



HAL
open science

Synthèse et caractérisation physico-chimique de polymères amphiphiles, les amphipols : application à l'étude structurale des protéines membranaires par cryo-microscopie électronique

Baptiste Michon

► **To cite this version:**

Baptiste Michon. Synthèse et caractérisation physico-chimique de polymères amphiphiles, les amphipols : application à l'étude structurale des protéines membranaires par cryo-microscopie électronique. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5252 . tel-04691838

HAL Id: tel-04691838

<https://theses.hal.science/tel-04691838v1>

Submitted on 9 Sep 2024

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

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

Université Paris Cité

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) n°562

Laboratoire de biologie physico-chimique des protéines membranaires

Synthèse et caractérisation physico-chimique de polymères amphiphiles, les amphipols. Application à l'étude structurale des protéines membranaires par cryo-microscopie électronique

Par Baptiste Michon

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Dirigée par Manuela Zoonens

Sera présentée et soutenue publiquement à Paris le 05/12/2022

Devant un jury composé de :

M Olivier Lambert, Directeur de recherche, IECB, Université de Bordeaux, Rapporteur,

Mme Yvette Tran, MCU-HDR, ESPCI, Université PSL, Rapporteur,

Mme Cécile Breyton, Directrice de recherche, IBS, Université Grenoble Alpes, Examinatrice,

M Vincent Chaptal, CR-HDR, IBCP, Université de Lyon, Examineur,

M Patrick Guenoun, Directeur de recherche, CEA, Université Paris Saclay, Examineur,

Mme Manuela Zoonens, Directrice de recherche, IBPC Paris, Directrice de thèse,

Mme Amélie Leforestier, Directrice de recherche, LPS, Université Paris Saclay, membre invitée,

Mme Anniina Salonen, MCU-HDR, LPS, Université Paris-Saclay, membre invitée.

Titre : Synthèse et caractérisation physico-chimique de polymères amphiphiles, les amphipols. Application à l'étude structurale des protéines membranaires par cryo-microscopie électronique

Mots clefs : activité, amphipol, cryo-microscopie électronique, détergent, film aqueux mince, interface air/eau, lipides, protéine membranaire, solubilisation, tensioactif, tension de surface

Résumé :

Le travail de thèse présenté ici suit deux axes de recherche avec, comme fil rouge, une famille de polymères amphiphiles, les amphipols, conçus pour l'étude des protéines membranaires.

L'obtention de structures tri-dimensionnelles (3D) fines des protéines est essentielle dans le processus de compréhension de leur fonctionnement, et l'identification d'éventuels sites d'intérêts, tels que des sites de liaison de substrats. Jusqu'en 2013, de telles structures étaient principalement obtenues par cristallographie des rayons X. L'essor de la microscopie électronique en tant qu'alternative a progressivement donné accès à des reconstructions 3D de grande précision (structures de quelques Å de résolution) à partir d'images bi-dimensionnelles (2D) de particules isolées, maintenues dans un environnement aqueux vitrifié par cryogénie (cryo-microscopie électronique, cryo-EM). La technique est toutefois venue avec son lot de difficultés à surmonter, notamment en ce qui concerne l'obtention de bonnes conditions d'imagerie (homogénéité de la glace, orientation aléatoire des particules, ...). C'est ici que l'amphipol A8-35 fait son entrée, son ajout empirique dans plusieurs études indépendantes ayant conduit à une amélioration significative des caractéristiques des échantillons observés.

Le premier objectif du travail effectué a été d'investiguer le rôle de l'A8-35 et celui d'un détergent très utilisé, le dodécylmaltoside (DDM), sur la préparation d'échantillons de cryo-EM. A cet effet, les propriétés physico-chimiques de solutions aqueuses contenant l'A8-35 et le DDM (stabilité de films minces, tension de surface, propriétés de mouillage) ont été comparées aux caractéristiques d'échantillons de cryo-EM (stabilité de films, distribution d'épaisseur de glace) préparés à concentrations variables pour chacun des tensioactifs. Les résultats obtenus, mettant notamment en évidence un gain de qualité et de reproductibilité des grilles préparées avec des solutions d'A8-35 dépassant une concentration seuil, ont ensuite été mis à profit pour améliorer l'étude structurale d'une protéine membranaire modèle, le récepteur m5-HT_{3A} de souris, maintenu en solution en présence d'A8-35.

A l'origine de son développement, l'amphipol A8-35 avait été proposé comme alternative aux détergents, ces derniers étant classiquement employés pour extraire les protéines de l'environnement membranaire et les maintenir en solution aqueuse en empêchant leur agrégation due à leur domaine transmembranaire hydrophobe. Toutefois, les détergents se montrent parfois « agressifs » vis-à-vis des protéines membranaires, induisant leur dénaturation partielle, voir leur dissociation. Les vellétés de s'affranchir de cet inconvénient ont conduit au développement de tensioactifs moins invasifs (amphipols, SMA, ...), ainsi qu'à l'échafaudage d'assemblages supramoléculaires (nanodisques, liposomes, ...). L'A8-35, bien qu'encore extensivement utilisé, s'est vu progressivement relégué au second plan en raison de la variabilité de ses propriétés d'extraction des protéines de l'environnement membranaire en fonction du système d'étude. Cette limitation a été levée grâce au développement de polymères dérivés de l'A8-35 porteurs de groupes hydrocarbonés cycliques, les CyclAPols.

Le second objectif du travail réalisé a été de poursuivre la synthèse et la caractérisation d'une banque de CyclAPols. A cet effet, ils ont été testés sur deux protéines membranaires modèles : la bactériorhodopsine, présente dans la membrane pourpre, et le transporteur BmrA, exprimé dans la membrane plasmique d'*E.coli*. Ils ont notamment été comparés de manière prometteuse aux actuels polymères de référence, les SMAs, tant sur le plan de

l'efficacité d'extraction des protéines membranaires avec préservation d'un environnement lipidique natif, que sur le plan de la stabilité des protéines et de la conservation de l'activité protéique, tout en mettant en évidence une variabilité des propriétés en fonction du système étudié.

Title: Synthesis and physico-chemical characterization of amphiphilic polymers, the amphipols. Application to the electron cryo-microscopy structural study of membrane proteins

Keywords: activity, air/water interface, amphipol, electron cryo-microscopy, detergent, lipids, membrane protein, solubilization, surface tension, surfactant, thin aqueous film

Abstract:

The present PhD work follows two research axes with, as guiding thread, a family of amphiphilic polymers designed for the study of membrane proteins, the amphipols.

Getting sharp tri-dimensional (3D) structures of proteins is key to understand how they work, and identify active sites, such as substrate-binding sites. Until 2013, such structures were mainly obtained through X-ray crystallography experiments, which required protein crystallization, a step of varying difficulty depending on the studied system. Electron microscopy rose as an alternative and progressively gave access to high-resolution 3D-reconstructions (resolution down to a few Å), based on bi-dimensional (2D) images of isolated particles in an aqueous, vitrified environment (electron cryo-microscopy, cryo-EM). Still, the technique came with its share of challenges, especially when it comes to achieving some control over sample preparation. This proved to be a bothersome bottleneck, as securing proper and reproducible imaging conditions (stable and homogeneous ice, randomly oriented particles, ...) is key to obtain sharp 3D-structures. That is where the amphipol A8-35 comes in action, due to its empirical use in several independent studies which led to a significant sample quality improvement.

The first aim of the present work was to look into the impact of A8-35 on cryo-EM sample preparation and compare the data with that of a frequently used detergent, dodecylmaltoside (DDM). To this end, the physico-chemical properties of A8-35-containing and DDM-containing aqueous solutions (thin film stability, surface tension, wetting properties) were compared to the characteristics of cryo-EM samples (film stability, ice thickness distribution) prepared at various concentrations of each surfactant. The results, which notably highlighted a significant quality and reproducibility gain for A8-35 concentrations above a threshold, were then put to use to improve the structural study of a model membrane protein, the mouse receptor m5-HT_{3A}, kept in solution by the A8-35.

At the beginning of its development, the amphipol A8-35 had been proposed as an alternative to detergents, which are classically used to extract proteins from their membrane environment and to keep them in an aqueous medium while preventing their aggregation by shielding their hydrophobic transmembrane domain. However, detergents sometimes proved to be too "aggressive" for the membrane proteins, provoking their partial denaturation, or even their dissociation. Aiming at avoiding such hazards, softer surfactants (amphipols, SMAs, ...) were developed, and supramolecular assemblies (nanodiscs, liposomes, ...) were designed. The A8-35, even if still widely used, was progressively left aside, due to its unreliable MP extracting properties, which depends heavily on the studied system. This restriction was overcome with the development of new polymers, derived from the A8-35, and bearing cyclic hydrocarbon groups, the CyclAPols.

The second aim of the present work was to keep going with synthesis and characterization of a library of CyclAPols. To this end, the CyclAPols were tested on two model membrane proteins: the bacteriorhodopsin, which can be found in the purple membrane, and the transporter BmrA, expressed in the plasma membrane of *E.coli*. More specifically, a promising comparison was operated between the CyclAPols and the current standard polymer for membrane protein study, the SMAs. It included a look at their capacity to extract membrane proteins while preserving a native lipidic environment, as well as at the conservation of protein stability and activity, and underlined some property variability depending on the studied system.

Contributions à des publications et participations à des conférences :

Publications à comités de lecture :

- B. Michon, U. López-Sánchez, J. Degrouard, H. Nury, A. Leforestier, E. Rio, A. Salonen and M. Zoonens, "Role of surfactants in electron cryo-microscopy film preparation", **submitted** (*Biophysical Journal*).
- A. Marconnet*, B. Michon*, B. Prost, A. Solgadi, C. Le Bon, F. Giusti, C. Tribet and M. Zoonens, "Influence of hydrophobic groups attached to amphipathic polymers on the solubilization of membrane proteins along with their lipids", *Analytical Chemistry*, **2022** (doi: 10.1021/acs.analchem.2c01746).
- C. Le Bon, B. Michon, J.-L. Popot and M. Zoonens, "Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy", *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2021**, *54*, e6. (doi: 10.1017/S0033583521000044)
- A. Marconnet, B. Michon, C. Le Bon, F. Giusti, C. Tribet and M. Zoonens, "Solubilization and stabilization of membrane proteins by cycloalkane-modified amphiphilic polymers", *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, 3459-3467. (doi: 10.1021/acs.biomac.0c00929)

*Co-premiers auteurs

Conférences nationales et internationales :

- 66th Biophysical Society annual meeting, 2022, San Francisco, États-Unis – Poster
- GDR APPICOM yearly meeting, 2021, Lyon, France – Présentation orale
- SFB-GEM virtual symposium, 2021, Visioconférence – Flash poster
- Rencontre annuelle 2020 du LIA, Hauteluce, France – Présentation orale

Remerciements

Un travail de thèse, c'est un engagement pas négligeable sur 3 grosses années. Naturellement, impossible d'y arriver seul, et la présente partie est là pour mettre à l'honneur quelques-uns des impétrants dont l'aide a été extrêmement appréciable et appréciée :)

Commençons par la partie scientifique à proprement parler. A l'heure où j'écris ces lignes, le manuscrit qui suit a déjà été rédigé. Je sais donc que mon envie de citer les multiples personnes m'ayant aidé dans les expérimentations, l'interprétation et la compréhension dans les parties associées a déjà pu être mise en application : une pensée toute particulière pour Anniina et Emmanuelle dans l'équipe Mmoi, Amélie et Jéril dans l'équipe SOBIO, ainsi qu'Hugues et Uriel à l'IBS Grenoble ^^ . Brève mention sur la période pré-thèse : s'il faut remonter au moment où j'ai mis le doigt dans l'engrenage, je dirais qu'une mention de M Faye s'impose (professeur de Physique-Chimie pendant mes années lycée), à remercier chaleureusement pour son enseignement de la rigueur expérimentale :). Grand merci également à Mme Poux et Mme Gadet, respectivement professeure de Physique et de Chimie en classe préparatoire, qui m'auront soutenu et supporté pendant 2 années, tout en me donnant le bagage nécessaire pour réussir à intégrer l'ESPCI ^^ . Et merci à tous les enseignants de l'école, qui auront continué à solidifier ce bagage, tout en transmettant rigueur intellectuelle, capacité expérimentale, ainsi que réalisme et pragmatisme quant au travail de recherche. Et mention spéciale pour Manuela, pour m'avoir fait confiance quant à ma capacité à mener ce projet à bien, et avoir prodigué tout l'accompagnement nécessaire pour que ça se déroule dans de bonnes conditions ^^ . Sans oublier de vifs et sincères remerciements pour les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté de lire et évaluer mon travail :).

Un projet de thèse, c'est aussi un cadre, et j'ai aussi eu beaucoup de chance sur cet aspect :). Qu'il s'agisse des soirées raclettes, au LPS comme à l'IBPC, des déjeuners du vendredi (« fat Friday » pour la version plus internationale et terre-à-terre ^^), les sorties pour prendre un verre dans le quartier latin, ou encore les soirées jeux de société, les occasions n'ont pas manqué pour se changer les idées, et discuter science (ou discuter tout court). Très grands mercis à toutes l'équipe Membrane et Mmoi, ainsi qu'au cercle d'amis d'école, pour toutes ces belles occasions ^^ .

Et le mot de la fin, gardé et réservé pour ma famille, qui m'aura soutenu et accompagné tout au long de ces années ^^ . Merci beaucoup, Maman et Papa, de ne jamais avoir douté, et de toujours avoir été là ^^ .

Structure générale du manuscrit

OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE	8
ABRÉVIATIONS.....	9
TABLES ET FIGURES.....	11
CHAPITRE 1 – CORRELATION ENTRE PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE SOLUTIONS DE TENSIO-ACTIFS ET CARACTERISTIQUES DE GLACE LORS D'ANALYSES DE CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE : CAS DE L'AMPHIPOL A8-35.....	13
CHAPITRE 2 – LES CYCLAPOLS : NOUVELLE GENERATION D'AMPHIPOLS.....	62
SYNTHESE	114
BIBLIOGRAPHIE	115

Objectifs généraux de la Thèse

L'origine du projet de ma thèse se trouve principalement dans l'observation d'un effet positif du remplacement d'un détergent (présent pour maintenir les protéines membranaires en solution après purification) par le polymère A8-35 lors de la préparation des grilles de cryo-EM. L'effet est décrit de manière particulièrement explicite dans les études de Flötenmeyer *et al.*¹ et Baker *et al.*², deux papiers qui m'auront accompagné tout au long de l'aventure. L'objectif premier a ainsi été d'essayer de comprendre pourquoi ou dans quelle mesure cet A8-35 pouvait se révéler une meilleure option que certains détergents pour la préparation de grilles. Outre la préparation de grilles avec différentes concentrations d'A8-35, relativement naturelle et intuitive vu le contexte, cela a impliqué la mise au point d'une méthode permettant une caractérisation à l'échelle de la grille, ainsi qu'une comparaison des caractéristiques entre grilles. En parallèle, une caractérisation plus orientée physico-chimie a été menée sur les mêmes solutions, dans l'optique de mettre en évidence d'éventuels liens entre ces propriétés et le comportement sur grille. A ce titre, ont ainsi été menés des tests sur la stabilité de films liquides et sur la variation de tension de surface à l'interface air/eau en présence d'A8-35, suivis de mesures de viscosité et drainage, avec en dernier lieu l'observation des propriétés de mouillage de surfaces de carbone. S'il est probable que d'autres formes de caractérisations soient également adaptées à considérer, ce sont celles mentionnées ci-avant qui sont apparues comme les plus potentiellement pertinentes au fil des observations, observations qui auront d'ailleurs fortement conditionné leur implémentation. L'intérêt de ces études résiderait dans l'amélioration du contrôle pouvant être appliqué sur la préparation de grilles, tant pour obtenir des échantillons homogènes de manière reproductible que pour limiter le problème récurrent d'orientation préférentielle.

Si le choix de l'A8-35 pour mener les études de cette première partie est facilement justifiable (outre la reproduction des observations de Flötenmeyer *et al.* et Baker *et al.*, l'A8-35 demeure la référence incontournable et majoritairement employée au sein de la famille des amphipols), cela n'efface pas les limites qui lui sont associées, en particulier en terme de capacité de solubilisation des membranes. Pour y remédier, de nouveaux amphipols à chaînes cycliques ont été développés, les CyclAPols³. Aux vues de leur capacité à solubiliser des systèmes variés⁴, les CyclAPols apparaissent comme des nouveaux venus prometteurs parmi les tensioactifs utilisés pour la manipulation des protéines membranaires, ce qui a motivé la poursuite de leur synthèse et de leur caractérisation. Plus précisément, le second objectif du présent projet était de continuer à rendre ces polymères connus et accessibles (ce qui passe par leur production et leur partage dans le cadre de collaborations), et de participer à leur validation. Ma contribution sur ce plan aura été d'explorer deux systèmes modèles, la bactériorhodopsine exprimée dans la membrane pourpre de *Halobacterium salinarum* et BmrA surexprimée dans *Escherichia coli*. Toutefois, toute discussion quant à l'efficacité des CyclAPols, ainsi qu'à l'éventuel caractère protéine-dépendant de leurs propriétés, bénéficiera grandement d'une multiplication des études et des systèmes testés, qui, avec un peu de chance, devrait faire suite aux preuves de concepts déjà publiées.

Abréviations

ADP : adénosine diphosphate

APol : Amphipol

ATP : adénosine triphosphate

BmrA : Bacillus subtilis multidrug resistance ABC transporter

C₆-C₂-50 : Amphipol greffé à 50 % de chaînes composées d'un cycle saturé de 6 carbones, relié au squelette polyacrylique par un espaceur de 2 carbones

C₆-C₂-50-Tz : C₆-C₂-50 fonctionnalisé avec un groupement tetrazine

C₈-C₀-50 : Amphipol greffé à 50 % de chaînes composées d'un cycle saturé de 8 carbones, directement relié au squelette polyacrylique sans espaceur

CAC : concentration d'agrégation critique

CCM : chromatographie sur couche mince

CD₃OD : méthanol deutéré

CID : Collision Induced Dissociation

CL : cardiolipine

CMC : concentration micellaire critique

cps : coups par seconde

Cryo-EM : cryo-microscopie électronique (electron cryo-microscopy)

CyclAPol : Amphipol à chaînes cycloalkyles saturées. Se réfère ici au duo C₆-C₂-50 et C₈-C₀-50

DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DCU : N,N'-dicyclohexylurée

DDM : n-dodecyl-β-D-maltopyranoside

DEC : domaine extracellulaire

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DP_n : degré moyen de polymérisation en nombre

DSA25E : Drop Shape Analyzer 25E (commercialisé par Krüss Scientifique)

DTM : domaine transmembranaire

E.coli : *Escherichia coli*

EtOH : éthanol

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

HsBR : bactériorhodopsine exprimée par *Halobacterium salinarum*

IPTG : isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside

LDH : lactate dehydrogenase

MWCO : seuil de retention des molécules (molecular weight cut-off)

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

nano-DSF : nano-differential scanning fluorimetry

ND : Nanodisque lipidique, ou nanodisque

NMP : N-Méthyl-2-pyrrolidone

OTG : n-octyl- β -D-thioglucopyranoside

PAA : acide polyacrylique

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

PEP : phosphoenol pyruvate

PK : pyruvate kinase

PM(s) : protéine(s) membranaire(s)

PG : phosphatidylglycerol

RMN : résonance magnétique nucléaire

SDS : dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE : gel de polyacrylamide en présence de SDS

SEC : chromatographie d'exclusion de taille (size exclusion chromatography)

SMA : copolymère de styrène et d'acide maléique (styrene maleic acid copolymer)

SMALP : SMA lipid particle

TCO : trans-cycloOctyne

Temps d'attente post-GD : temps d'attente post Glow-Discharge

TFA : acide trifluoroacétique

Tz : tetrazine

Tables et Figures

Figure d'introduction 1.1. Illustration des grilles utilisées en cryo-EM.....	18
Figure d'introduction 1.2. Structure de l'amphipol A8-35.....	21
Figure 1.1.1. Schéma illustratif d'une grille de cryo-EM.....	23
Figure 1.1.2. Illustration du procédé de cryo-fixation.....	24
Figure 1.1.3. Set d'images à faible grossissement (x 500) d'une grille préparée avec une solution d'Amphipol à 10^{-4} g/L.....	25
Figure 1.1.4. Set d'images à faible grossissement (x 500) d'une grille préparée avec une solution d'Amphipol à 1 g/L.....	26
Figure 1.1.5. Illustration de la technique de mesure d'épaisseur de glace.....	27
Figure 1.1.6. Courbe de calibration pour l'estimation d'épaisseur de glace.....	28
Figure 1.1.7. Impact de la concentration en A8-35 sur la stabilité et la distribution d'épaisseur de glace dans une grille de cryo-EM.....	29
Figure 1.1.8. Illustration des variations d'intensités pouvant être observées sur grille de cryo-EM.....	31
Figure 1.1.9. Illustration des différents types de rupture de films en cryo-EM.....	32
Figure 1.2.1. Illustration du montage de tirage de film.....	34
Figure 1.2.2. Variation du temps de vie de films.....	35
Figure 1.2.3. Illustration de la méthode de mesure d'épaisseur pour des films liquides suspendus.....	36
Figure 1.2.4. Résultats des expériences de tirage de film pour une gamme de solutions d'A8-35.....	37
Figure 1.2.5. Résultats d'études sur la viscosité et l'amincissement de films de solutions d'A8-35.....	38
Figure 1.2.6. Illustration du dispositif Tracker, utilisé pour la mesure de tension de surface.....	41
Figure 1.2.7. Etude de la variation de tension de surface air/eau pour une gamme de solutions d'A8-35.....	42
Figure 1.2.8. Illustration du principe d'analyse des propriétés de mouillage.....	45
Figure 1.2.9. Cinétiques d'étalement de solutions d'A8-35 sur une surface de carbone.....	46
Figure 1.3.1. Résultats des analyses physico-chimiques menées sur une gamme de solutions de DDM.....	49
Figure 1.3.2. Résultats de la caractérisation de grilles de cryo-EM préparées à partir de solutions de DDM à 2 concentrations, 0,1 et 1 mM.....	51
Figure 1.3.3. Nouvelle illustration des différents types de ruptures de films en cryo-EM.....	51
Figure 1.3.4. Cinétiques d'amincissement de films verticaux.....	53
Figure 1.3.5. Profil de purification par SEC des complexes m5-HT _{3A} /A8-35.....	55
Table 1.3.1. Paramètres expérimentaux pour la préparation des grilles de cryo-EM.....	56
Table 1.3.2. Statistiques de la collecte de données effectuée en cryo-EM.....	56
Figure 1.3.6. Exemple d'images acquises sur des grilles préparées à différentes concentrations d'A8-35.....	57
Figure 1.3.7. Set de données cryo-EM sur le récepteur m5-HT _{3A} en A8-35, acquis sur un échantillon contenant 2 g/L de récepteur et 0,3 g/L d'A8-35 libre.....	58
Figure 1.4.1. Reproduction des distributions d'épaisseurs de glace obtenues pour les grilles préparées à 1 g/L en A8-35.....	61
Figure d'introduction 2.1. Principaux exemples d'outils et d'environnements développés pour la manipulation des protéines membranaires.....	64
Figure d'introduction 2.2. Représentation classique des détergents.....	66
Figure d'introduction 2.3. Structure chimique des SMAs.....	67
Figure d'introduction 2.4. Structure chimique de l'amphipol historique, l'A8-35, ainsi que de 3 amphipols dérivés.....	68
Figure d'introduction 2.5. Structure de HsBR.....	69
Figure d'introduction 2.6. Structure de BmrA.....	69
Figure 2.1.1. Mécanisme de formation de la liaison amide via activation des fonctions carboxyliques par le DCC.....	71
Figure 2.1.2. Schéma illustratif des CyclAPols pour l'attribution des signaux RMN.....	73
Figure 2.1.3. Schéma illustratif des nouveaux CyclAPols, le C ₇ -C ₂ -50 et le C ₈ -C ₂ -50.....	74
Figure 2.1.4. Propriétés de solubilisation du C ₇ -C ₂ -50 et du C ₈ -C ₂ -50, comparativement aux CyclAPols de référence, le C ₆ -C ₂ -50 et le C ₈ -C ₀ -50.....	76
Figure 2.1.5. Mécanisme de formation de la liaison amide via activation des fonctions carboxyliques par le couple DCC/HOBt.....	77

Figure 2.1.6. Allure du mélange réactionnel avant ajout du méthanolate de sodium lors de la synthèse du C ₆ -C ₂ -50 fonctionnalisé à la tetrazine.....	78
Figure 2.1.7. Allure du polymère C ₆ -C ₂ -50-Tz après la première précipitation en milieu acide, puis filtration sur fritté.....	79
Figure 2.1.8. Spectres RMN (a) ¹ H et (b) ¹³ C du C ₆ -C ₂ -50-Tz.....	80
Figure 2.1.9. Estimation du taux de greffage des groupements Tz.....	81
Figure 2.2.1. Illustration du principe des mesures de fluorescence effectuées avec la sonde pyrène. 85	
Figure 2.2.2. Variation de l'efficacité de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC et de stabilisation de la HsBR.....	86
Figure 2.2.3. Variation de l'efficacité de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC.....	88
Figure 2.2.4. Cinétiques de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC.....	89
Figure 2.2.5. Etude de la variation de fluorescence du pyrène.....	91
Figure 2.2.6. Estimation de la CMC/CAC par mesure de la tension de surface à l'équilibre.....	92
Figure 2.3.1. Mise au point des conditions de solubilisation et purification de BmrA, exprimée dans <i>E.coli</i> , en présence de différents tensioactifs.....	97
Figure 2.3.2. Séparation des phospholipides par CCM.....	101
Figure 2.3.3. Analyses des lipides extraits d'échantillons de BmrA solubilisés en C ₆ -C ₂ -50, C ₈ -C ₀ -50, DDM et SMA(3:1).....	102
Table 2.3.1. Quantification des lipides extraits d'échantillons de BmrA solubilisés en C ₆ -C ₂ -50, C ₈ -C ₀ -50, DDM et SMA(3:1).....	102
Figure 2.3.4. Illustration de la séquence de réactions couplant la consommation d'ATP à une consommation de NADH.....	105
Figure 2.3.5. Variation de la fluorescence des tryptophanes lors de l'exposition d'échantillons de BmrA à une rampe manuelle de température.....	106
Figure 2.3.6. Exemples de spectres de fluorescence (excitation 285 nm) obtenus sur différents blancs.....	107
Figure 2.3.7. Variation de la fluorescence des tryptophanes lors de l'exposition d'échantillons de BmrA à une rampe de température automatisée (nano-DSF).....	108
Figure 2.3.8. Résultats des premières investigations sur l'activité ATPasique de BmrA en fonction de son environnement amphiphile.....	110
Figure 2.3.9. Protéolyse ménagée d'échantillons de BmrA solubilisés en DDM et en C ₈ -C ₀ -50.....	111
Figure 2.4.1. Images obtenues en microscopie électronique (coloration négative, marquage PTA) après solubilisation de liposomes de DMPC par le C ₈ -C ₀ -50.....	112

Chapitre 1 – Corrélation entre propriétés physico-chimiques de solutions de tensio-actifs et caractéristiques de glace lors d'analyses de cryo-microscopie électronique : cas de l'Amphipol A8-35

INTRODUCTION : AMPHIPOL A8-35 ET CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	15
CRYO-EM	15
<i>Bref historique.....</i>	15
<i>Principe de la cryo-EM</i>	16
<i>Quelques mots sur la préparation d'échantillon de cryo-EM.....</i>	17
<i>Vers un meilleur contrôle des propriétés de grille ?</i>	19
A8-35, SA VIE SON ŒUVRE	20
1. COMPORTEMENT DE SOLUTIONS D'A8-35 SUR GRILLES DE CRYO-EM	23
1.1. MATERIEL ET METHODES : PREPARATION ET IMAGERIE DE GRILLES DE CRYO-EM	23
1.1.1. <i>Préparation des solutions d'A8-35</i>	23
1.1.2. <i>Préparation de grilles de cryo-EM</i>	23
1.1.3. <i>Caractérisation de grilles : imagerie à faible grandissement.....</i>	24
1.1.4. <i>Calcul d'épaisseur de glace : fort grandissement, acquisition de paires stéréo</i>	27
1.1.5. <i>Mesures d'intensité, relation intensité/épaisseur de glace</i>	28
1.2. RESULTATS OBTENUS SUR LES CARACTERISTIQUES DE GLACE DES ECHANTILLONS DE CRYO-EM.....	29
1.2.2. <i>Comportements de film observés sur grille de cryo-EM</i>	30
1.2.2.1. Description des différentes géométries observées	30
1.2.2.2. Finesse de film : rupture pré- ou post-congélation.....	32
2. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DE SOLUTIONS D'A8-35	34
2.1. FILMS LIQUIDES SUSPENDUS : ESTIMATION DE LA STABILITE ET DU DRAINAGE.....	34
2.1.1. <i>Dispositifs expérimentaux : génération de films, mesures d'épaisseur</i>	34
2.1.1.1. Tirage de film, mesure du temps de vie.....	34
2.1.1.2. Mesure d'épaisseur par interférométrie	35
2.1.1.3. Nettoyage cuve + cadre, calibration des mesures d'épaisseur.....	37
2.1.2. <i>Résultats et discussion : temps de vie et drainage des films.....</i>	37
2.1.3. <i>Résumé : films liquides suspendus</i>	40
2.2. MESURES DE TENSION DE SURFACE	40
2.2.1. <i>Dispositif expérimental : TRACKER.....</i>	40
2.2.2. <i>Résultats et discussion : tension à l'équilibre et aux temps courts</i>	41
2.2.3. <i>Résumé : tension de surface.....</i>	44
2.3. PROPRIETES DE MOUILLAGE D'UNE SURFACE DE CARBONE	44
2.3.1. <i>Dispositifs expérimentaux : préparation de surfaces, profils de gouttes</i>	44
2.3.1.1. Préparation de surfaces : évaporation de carbone sous pression réduite	44
2.3.1.2. Dépôt et analyse de profils de gouttes : DSA25E.....	45
2.3.2. <i>Résultats et discussion : cinétiques de mouillage du carbone.....</i>	46
2.4. RESUME : SOLUTIONS D'A8-35, CRYO-EM VS ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	47

3. MISES EN APPLICATION : DDM, M5-HT_{3A}	48
3.1. ETUDE COMPARATIVE D'UN DETERGENT DE REFERENCE, LE DDM.....	48
3.1.1. <i>Matériel et méthodes : analyses physico-chimiques, étude cryo-EM</i>	48
3.1.2. <i>Résultats et discussion</i>	48
3.1.2.1. Analyses physico-chimiques de solutions de DDM	48
Résumé	50
3.1.2.2. Caractéristiques de grilles de cryo-EM préparées avec des solutions de DDM.....	51
Résumé : comparaison des comportements du DDM et de l'A8-35	52
3.1.2.3. Amincissements des films verticaux : cas des solutions de DDM.....	52
3.2. ETUDE STRUCTURALE DU RECEPTEUR M5-HT _{3A}	54
3.2.1. <i>Choix de m5-HT_{3A} : test des problématiques d'orientation préférentielle</i>	54
3.2.2. <i>Matériel et méthodes</i>	55
3.2.2.1. Préparation des échantillons m5-HT _{3A} /A8-35.....	55
3.2.2.2. Cryo-fixation sur grille de cryo-EM, acquisition du set de données	55
3.2.3. <i>Résultats et discussion : structure de m5-HT_{3A} en amphipol</i>	57
3.2.3.1. Impact de la concentration d'A8-35 sur la distribution de particules.....	57
3.2.3.2. Reconstruction 3D de m5-HT _{3A} en amphipol.....	58
CONCLUSION	59
PERSPECTIVES : AUTRES PARAMETRES IMPACTANT LES CARACTERISTIQUES DE GLACE	60
BIBLIOGRAPHIE	115

Introduction : amphipol A8-35 et cryo-microscopie électronique

La cryo-microscopie électronique (cryo-EM) est une technique d'imagerie notamment utilisée pour l'observation et l'étude structurale d'échantillons biologiques. Depuis 2013, la méthode d'analyse d'images à partir de particules isolées connaît un essor important en biologie structurale. A l'heure actuelle, le principal frein dans l'utilisation de cette technique réside dans la difficulté à maîtriser la préparation d'échantillons, contraignant parfois à démultiplier les conditions testées, ainsi que le nombre de répétitions. Le travail présent trouve son origine dans une remarque commune à plusieurs études structurales, mentionnant une amélioration de la qualité des échantillons en cas d'ajout d'amphipol A8-35. Outre la description de l'impact de l'A8-35 sur la préparation de grilles de cryo-EM, le travail effectué aura permis de proposer une amélioration de l'étude structurale d'une protéine membranaire de mammifère, le récepteur m5-HT_{3A} de souris, maintenu en solution en présence d'A8-35.

Cryo-EM

Bref historique

La preuve de concept quant à la focalisation d'un faisceau d'électrons à des fins d'imagerie remonte à 1931, avec le prototype de microscope de Max Knoll et Ernst Ruska. Bien que l'utilisation d'électrons permette théoriquement de considérablement repousser la limite de résolution comparativement à la microscopie optique (limite de diffraction de l'ordre de 10^{-3} nm en microscopie électronique, contre 0,2 μ m en microscopie optique), un long processus de mise au point et d'optimisation sera nécessaire, et ce n'est qu'en 1986 que l'invention vaudra à E. Ruska de recevoir le prix de Nobel de Physique⁵.

Les premières améliorations de résolutions se feront principalement avec l'augmentation du voltage utilisé pour l'accélération des électrons, avec des débuts à 50 kV dans les années 40, progressivement amélioré pour atteindre des valeurs de quelques centaines de kV d'une bonne partie des microscopes actuels, avec des exemples d'utilisations au-delà du MV^{6,7}. Parmi les importantes contributions dans le processus d'optimisation figurent également l'amélioration des lentilles électroniques nécessaires à la focalisation du faisceau/le développement de traitements permettant de corriger leurs aberrations^{8,9}, l'amélioration du vide au sein de la colonne¹⁰, le développement de sources d'électrons (notamment la technologie FEG, Field Emission Gun) permettant la génération d'un faisceau particulièrement parallèle et intense¹¹, ou encore l'amélioration de contraste notamment avec le développement des "phase plates"¹²⁻¹⁴.

La prouesse technique la plus décisive pour le développement de la microscopie électronique reste toutefois la mise au point de capteurs d'électrons à détection directe. En permettant une acquisition de haute résolution à la fois spatiale et temporelle, ces détecteurs ont résolu le dilemme qui forçait jusqu'alors à choisir entre vitesse d'acquisition, avec les systèmes de type caméra CCD, ou finesse de l'image, avec acquisition sur films photographiques, difficilement compatibles avec une multiplication des observations. Werner Kühlbrandt parlera en 2014 de "Révolution de la Résolution"¹⁵ à propos des perspectives ouvertes par ces nouveaux capteurs, qui ont permis une démultiplication des nouvelles structures de protéines obtenues depuis 2013¹⁶. Cette révolution vaudra le décernement à Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson du prix Nobel de Chimie en 2017.

Dans le cadre du travail présent, le seul aspect de la microscopie électronique abordé correspond à la microscopie électronique en transmission sur échantillon cryogénisé (cryo-MET), et plus particulièrement à son utilisation dans le cadre de l'obtention de reconstructions 3D de grande précision. Le domaine comprend toutefois un panel de techniques et de facettes infiniment plus variées. Outre la coloration négative, mentionnée un peu plus loin et souvent utile pour obtenir une première allure d'échantillon, on pourra ainsi citer les approches tomographiques (observation d'un échantillon sous plusieurs angles, permettant l'obtention d'informations structurales à grande échelle), la cristallographie électronique 2D (basée sur la diffraction de cristaux ordonnés, technique à l'origine de la première structure d'une protéine membranaire à 7 Å de résolution, obtenue par Henderson et Unwin¹⁷), la MicroED (pour « microcrystal electron diffraction », à la jonction entre cristallographie et cryo-MET¹⁸), tous les travaux d'imagerie de couches minces (cryo-sections comme des lamelles d'échantillon préalablement coulées dans une résine), ainsi que tout le pan de la microscopie électronique à balayage (MEB, analyse des électrons réfléchis, particulièrement employé pour l'obtention d'informations de surface).

Principe de la cryo-EM

La capacité à observer des échantillons en microscopie électronique, notamment des échantillons biologiques, représente un véritable défi technique. L'échantillon doit supporter le vide nécessaire pour établir un faisceau d'électrons sans dispersion, et la puissance du faisceau doit être suffisamment contrôlée et ajustable pour que la dose d'électrons reçue ne détruise pas l'échantillon. Dans le cas des échantillons biologiques en particulier, la présence d'eau liquide s'avère fondamentalement incompatible avec le travail sous vide, qui provoque l'évaporation rapide de l'eau, entraînant la destruction de l'objet d'étude. Ce problème peut être adressé avec la technique de coloration négative¹⁹, qui consiste à assécher l'échantillon en présence de sels lourds, fournissant une empreinte des matériaux présents à la fois contrastée et capable de supporter un vide poussé. Cette technique vient toutefois avec son lot d'inconvénients, avec notamment une limitation de la résolution (taille de l'agent de contraste), une limitation aux informations de surface (faible pénétration au sein des protéines) et une potentielle détérioration de l'échantillon (ou l'émergence d'artefacts) due au remplacement du milieu aqueux.

Une alternative a été proposée et développée en parallèle au cours des années 80, offrant la perspective d'observation d'objets conservés en milieu aqueux. Le principe repose sur la congélation ultra-rapide d'échantillons aqueux, permettant l'obtention d'un film de glace amorphe emprisonnant le matériel d'intérêt, et capable de résister au vide de la colonne^{20,21}. Le caractère amorphe de la glace présente un intérêt tout particulier, dans la mesure où la formation de cristaux pourrait provoquer une détérioration de l'objet d'étude, et interférerait dans tous les cas avec le faisceau d'électrons. L'obtention de transferts thermiques suffisamment rapides pour vitrifier de l'eau plutôt que la cristalliser impose toutefois d'importantes conditions, tant sur l'épaisseur des échantillons (de l'ordre de la centaine de nm, une plus grande épaisseur ralentissant le refroidissement du centre du film de manière trop importante. L'épaisseur de glace a également un impact fort sur la qualité des observations, conditionnant la proportion d'électrons diffusés de manière inélastique, ainsi que la possibilité de multiscattering en cas de superpositions d'objets dans l'axe du faisceau) que sur la méthode de congélation (notamment effectuée via plongée rapide dans un réservoir d'éthane liquide, approche proposée dès 1981²²). Une fois l'échantillon vitrifié, ce dernier peut être inséré dans la colonne d'un microscope électronique (en restant maintenu en-dessous de la température de dévitrification de la glace via utilisation de porte-objets refroidis à l'azote liquide). Cela reste à ce jour l'une des techniques phares de la cryo-EM.

La capacité à observer et imager des échantillons biologiques en milieux aqueux par microscopie électronique, bien qu'impressionnante en soi, n'est pas suffisante pour permettre d'obtenir une image très haute résolution de l'objet d'étude. Le point le plus limitant réside dans l'énergie du faisceau d'électrons : afin de ne pas provoquer de dommages d'irradiation à l'échantillon, la dose reçue doit être contrôlée et limitée, entraînant d'importants problèmes d'intensité et de contraste lors des observations. Ce point a été adressé avec l'idée de combiner et moyenniser un grand nombre d'images bruitées d'un même objet afin d'en obtenir une de meilleure résolution. Si l'on y ajoute le fait qu'un objet puisse théoriquement être vu sous une multitude d'orientations au sein d'un même échantillon, il devient possible de reconstruire l'enveloppe tri-dimensionnelle (3D) de l'objet à partir des lots d'images bi-dimensionnelles (2D) obtenues aux diverses orientations²³. Cette approche dite d'analyse de particules isolées (single-particle analysis) a grandement bénéficié dans ses débuts des travaux de Joachim Frank, portant notamment sur la compréhension de l'interaction des ondes électroniques avec les échantillons²⁴ et sur le développement d'outils numériques pour le regroupement de particules en classes 2D représentatives des différentes orientations^{25,26}. Bénéficiant également de l'accroissement de la puissance de calcul disponible, cette technique permet à ce jour l'obtention de structures à des résolutions quasi-atomiques, en continuant à faire couler pas mal d'encre quant à son développement et ses perspectives²⁷⁻³⁰.

Quelques mots sur la préparation d'échantillon de cryo-EM

La préparation d'échantillon de cryo-EM s'inscrit dans la continuité des tours de force qui ont fait de la microscopie électronique une technique de référence. Il s'agit en effet d'être capable de créer des films aqueux minces (de l'ordre de quelques dizaines de nm d'épaisseur) assez stables pour ne pas rompre avant d'être plongés dans le cryogène, tout en étant suffisamment manutentionnables pour non seulement opérer la plongée, mais aussi pouvoir être récupérés, éventuellement stockés, transférés dans un porte-objet, et finalement insérés dans la colonne du microscope, le tout sans jamais être exposés à des températures supérieures à environ -140°C ^{31,32}, afin d'éviter une dévitrification de la glace. Le principe consiste à déposer un échantillon liquide (volumes typiquement de l'ordre de quelques μL) sur un disque support d'environ 3 mm de diamètre (illustré en **Figure d'introduction 1.1**), constitué d'un réseau métallique couvert d'un film mince de carbone (10 à 20 nm d'épaisseur), percé de trous. Le réseau métallique, qui confère au support sa rigidité et sa solidité, est également à l'origine du nom courant de ces objets, les grilles de microscopie électronique. Après dépôt de l'échantillon sur la grille, la majorité du liquide est éliminé via application d'un papier absorbant, laissant idéalement un volume faible sur la couche de carbone, avec présence de films minces au sein des trous qu'elle contient. La grille est ensuite plongée dans le cryogène, le plus souvent de l'éthane liquide refroidi à une température proche de sa température de fusion ($-183,3^{\circ}\text{C}$) par de l'azote liquide. La solidité de la grille permet enfin sa manutention, qu'il s'agisse de stockage ou d'insertion dans le microscope. Toutefois, l'obtention d'échantillons de bonne qualité, plus particulièrement de films de glace homogènes, dans la bonne gamme d'épaisseur (idéalement légèrement plus épais que les particules observées : risque d'exclusion des particules du centre du film si celui-ci est trop fin, et perte de résolution à cause de la diffusion inélastique des électrons ou de la superposition de plusieurs particules dans le faisceau si le film est trop épais), avec une bonne répartition et une orientation aléatoire de l'objet d'étude, est loin d'être immédiat, comme l'atteste la multiplicité des paramètres sur lesquels il est possible de jouer.

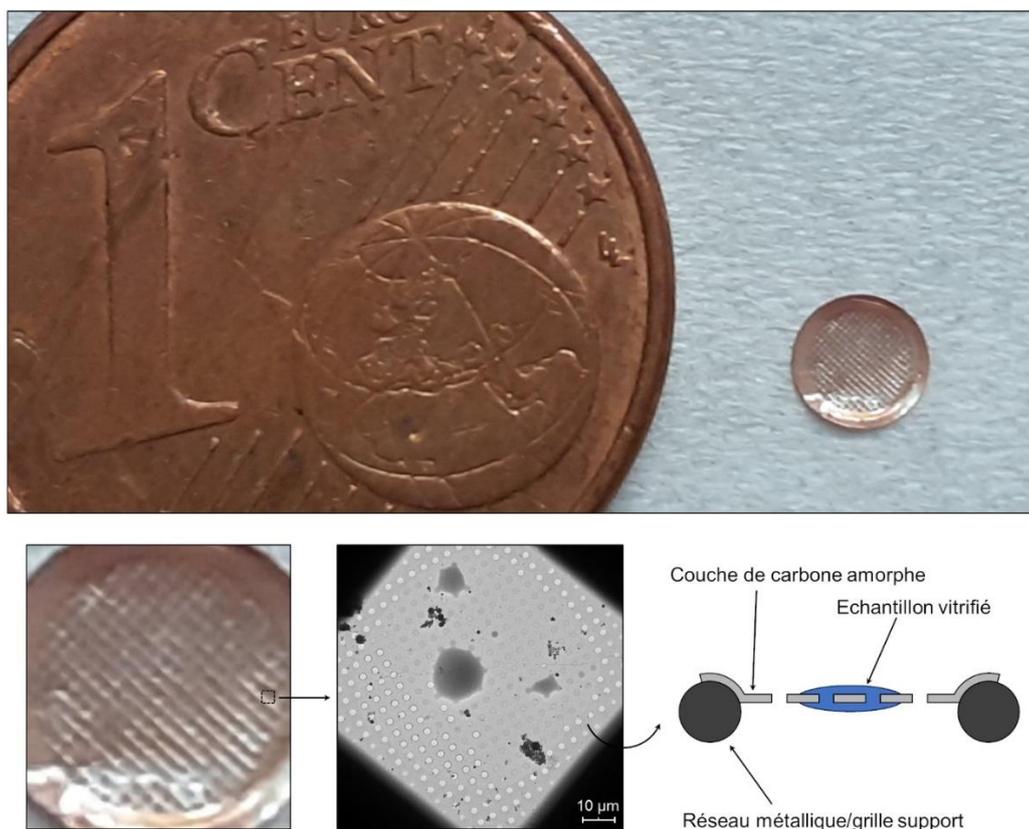


Figure d'introduction 1.1. Illustration des grilles utilisées en cryo-EM. Le réseau métallique est recouvert d'un mince film de carbone amorphe, visible sur l'image (x 500) d'un des carreaux du réseau, et schématisé en vision de coupe (dimensions non-respectées).

Se pose en premier lieu, avant même d'envisager une congélation, la question du type de grille à utiliser. La nature du métal (cuivre, nickel, or, ...) peut permettre de minimiser les faibles mouvements de l'échantillon au moment de son exposition au faisceau d'électron³³ ; la périodicité du réseau, décrite en terme de mesh (divisions/pouce), impose un compromis entre rigidité de la grille et surface observable/dimension des carreaux délimités par le réseau ; le film de carbone peut être composé de trous de taille variable (lacey carbon grids) ou de trous périodiques de taille fixe (holey carbon grids, grilles commercialisées avec des trous de diamètre allant de 0,6 µm à une dizaine de µm), à adapter en fonction des dimensions de l'objet d'étude ; la nature même du film, bien que très souvent composé de carbone amorphe, peut également être modifiée, comme avec l'utilisation de couches d'or pour limiter les déplacements causés par le faisceau³⁴. En parallèle, il est possible d'ajouter sur toutes ces grilles un mince film de carbone continu qui, malgré un impact négatif sur le bruit de fond, peut permettre d'améliorer la distribution de particules et limiter leur adsorption et éventuelle dénaturation à l'interface air/eau.

Quelle que soit la grille considérée, un traitement de sa surface pour accroître son hydrophilie est presque systématiquement opéré, typiquement via l'exposition de la grille à un plasma de faible intensité (étape de glow-discharge)³⁵. Outre l'élimination d'éventuelles contaminations adsorbées sur la grille, cette étape permet la génération de charges de surfaces qui favoriseront le mouillage de la grille au moment de l'application de l'échantillon³⁶. Comme ci-dessus avec les grilles, cette étape possède son lot de paramètres variant d'un utilisateur à l'autre, avec possibilité de jouer sur la durée et l'intensité du glow-discharge, mais aussi sur la nature du gaz utilisé (le plus souvent opéré avec l'air ambiant résiduel, avec parfois utilisation d'alternatives pour un meilleur contrôle sur la composition et les propriétés de grilles, comme de l'hydrogène³⁷ ou un mix oxygène/argon³⁸).

En dernier lieu vient la gestion de la congélation. Cette étape a été facilitée par la commercialisation et la démocratisation des robots de congélation, avec toutefois un lot de paramètres pouvant varier entre les utilisateurs (encore). La grille est suspendue verticalement dans une enceinte, où va se faire le dépôt d'échantillon et l'absorption de l'excès de liquide. L'enceinte est contrôlable en humidité (un taux élevé est souvent imposé pour limiter l'évaporation) ainsi qu'en température (ici, un compromis est à trouver, car une température basse limitera l'évaporation mais s'opposera également à l'étalement de l'échantillon, avec augmentation de la viscosité de l'eau). Après dépôt de l'échantillon, l'absorption de liquide (phase d'épongeage) est effectuée avec application d'un papier absorbant, avec possibilité de jouer sur la durée d'application, sur la force imposée, sur le nombre d'épongeages, ainsi que sur un éventuel temps d'attente entre le retraitement du papier et la plongée dans le cryogène, le tout pour essayer d'obtenir l'épaisseur optimale de liquide restant sur grille au moment de la congélation. Il est également à noter qu'en fonction du robot utilisé, l'application du papier peut être effectuée sur la face de dépôt, sur la face opposée (absorption du liquide au travers de la grille), voir sur les deux faces en même temps (double épongeage). Cette démultiplication des paramètres à ajuster souligne les efforts mis en place pour essayer d'avoir les outils permettant d'obtenir les caractéristiques d'échantillons souhaités. Cela explique aussi le développement en parallèle de techniques alternatives de préparation de grilles, visant notamment à s'affranchir de l'étape d'épongeage, qui n'offre un contrôle que trop marginal sur les écoulements au moment de l'absorption et sur la quantité de liquide restante³⁹.

Vers un meilleur contrôle des propriétés de grille ?

Bien que la préparation de grilles par étapes successives de dépôt d'échantillon/épongeage/congélation reste la méthode majoritairement utilisée à ce jour, de nouvelles approches sont en cours de développement afin de pallier aux principales faiblesses de la méthode actuelle. Ces faiblesses sont essentiellement liées à l'étape d'épongeage, qui, outre le manque de contrôle, présente aussi l'inconvénient que la très grande majorité de l'échantillon, plus de 99,9 %, n'est finalement déposé sur grille que pour être absorbé quelques secondes plus tard. Parmi les alternatives proposées, on pourra citer notamment une fonctionnalisation des grilles afin d'y immobiliser les objets d'études, permettant d'éliminer l'excès de liquide par évaporation (allant de pair avec une concentration de l'échantillon) en limitant le risque de dénaturation à l'interface air/eau⁴⁰ ; le dépôt localisé de volumes de l'ordre du nL à l'aide d'une tige microfluidique (pin-printing)⁴¹ ; la génération d'un spray en sortie de puce microfluidique, avec vaporisation à l'aide d'ondes acoustiques⁴² ou pulvérisation à haute tension (présentant l'intérêt de générer des gouttelettes chargées, limitant leur coalescence et favorisant leur étalement sur grille)⁴³ ; l'éjection contrôlée de gouttes de volume fixé (inkjet dispensing), pouvant aller du pL au nL, afin de mouiller une région restreinte de la grille (principe de fonctionnement de l'appareil Spotiton)^{44,45} ; suivi en direct de l'épaisseur de liquide sur grille, par suivi de la variation d'intensité d'un laser IR illuminant la grille⁴⁶ ou suivi du motif de diffraction du réseau de trous de la couche de carbone⁴⁷, pour une congélation au moment de l'atteinte de l'épaisseur voulue. La plupart de ces techniques profitent d'ailleurs de l'émergence d'un nouveau type de grilles, les grilles auto-séchantes (self-blotting grids), une conséquence indirecte de la mise au point de la création de nanofibres métalliques⁴⁸ : le remplacement des tiges métalliques constitutives de la grille de support par des faisceaux de nanofibres torsadées s'est en effet montré satisfaisant pour permettre l'absorption de petits volumes de liquides, jusqu'à une centaine de nL⁴⁹.

La volonté d'optimisation des propriétés de grilles se ressent également au travers des études visant à estimer l'épaisseur des films de glace après congélation. Devant la lourdeur des premières approches, basées sur la reconstruction tomographique du film, ou plus "simplement" sur l'estimation de la longueur d'un canal foré au sein du film en focalisant le faisceau d'électrons^{50,51}, de nouvelles méthodes ont été développées dans l'optique d'une utilisation de routine⁵². Il convient à ce titre de faire une mention spéciale à propos du développement et de la présentation récente (fin 2021) du logiciel MeasureIce, qui met à disposition de la communauté un outil permettant l'estimation en directe de l'épaisseur des films de glace, avec possibilité d'imposer un critère d'épaisseur lors du choix des trous pour les collectes de données⁵³.

Bien que le contrôle de l'épaisseur de glace soit crucial pour la qualité des observations, ce n'est pas le seul facteur d'importance. De par la géométrie des films au sein d'une grille, les objets d'études ont de multiples occasions de rencontrer les interfaces air/eau et de s'y adsorber^{54,55}. De telles occurrences sont délétères non-seulement pour les risques de dénaturation qu'elles font courir au matériel biologique, mais également pour la perte d'informations qu'elles entraînent (problème dit d'orientation préférentielle, une protéine adsorbée à l'interface sera vue majoritairement sous une seule orientation, réduisant la qualité ou empêchant l'obtention d'une reconstruction 3D)⁵⁶. Plusieurs approches existent pour essayer de s'en affranchir, avec notamment l'immobilisation des objets d'étude sur le support de congélation^{40,57} ainsi que la minimisation du temps d'attente avant congélation⁵⁸, sans que cela suffise à entièrement résoudre le problème⁵⁹. Un concept, décrit en détail par Gleaser *et al.*⁶⁰, a plus particulièrement été retenu dans le cadre du travail présent : l'utilisation d'un excès de tensioactif pour former une monocouche protectrice à l'interface air/eau, en plus d'augmenter significativement la stabilité du film, peut permettre de bloquer l'accès à l'interface, protégeant l'objet d'étude. Ce même effet peut être obtenu si l'on concède à sacrifier une fraction de la protéine d'étude pour former un film stabilisateur à base de protéines dénaturées à l'interface air/eau⁶¹. Néanmoins, dans le cas de matériel précieux durement obtenu après de multiples efforts d'expression et de purification, l'utilisation de tensioactifs paraît être plus adapté. Cette utilisation est mentionnée de manière explicite dans l'étude de Chen *et al.*⁶², où la présence d'un excès de détergent (CHAPSO) a permis de résoudre le problème d'orientation préférentielle rencontré. Il a notamment été aussi observé par Baker *et al.*², pour qui un double problème d'épaisseur de glace et d'orientation préférentielle a été sensiblement amoindri lors du remplacement d'un détergent (CHAPS) par un polymère amphiphile, l'A8-35.

A8-35, sa vie son œuvre

A l'origine, en 1996, le développement de l'amphipol (APol) A8-35 résulte d'une volonté de proposer de nouveaux tensioactifs capables de maintenir les protéines membranaires en solution⁶³. Il est composé d'un squelette d'acide polyacrylique greffé aléatoirement d'octylamines (à 25 %), sources principales d'hydrophobie, et d'isopropylamines (à 40 %), servant à neutraliser une partie des groupements carboxylates restants ((structure présentée en **Figure d'introduction 1.2**). A pH neutre ou basique, les carboxylates non-greffés (35 %) lui confèrent une importante solubilité dans l'eau (supérieure à 300 g/L⁶⁴). Il possède par ailleurs une CAC (concentration d'agrégation critique, équivalent à la CMC, concentration micellaire critique, pour un détergent) estimée à environ 0,002 g/L à partir de mesures de FRET (Förster resonance energy transfer) et de tension de surface⁶⁵, au-delà de laquelle les polymères s'assemblent en agrégats quasi-sphériques d'environ 40 kg/mol⁶⁴. Son nom, A8-35, est basé sur l'estimation initiale de sa masse molaire (8 kg/mol), ainsi que sur son

pourcentage de carboxylates non-greffés (à titre de comparaison, son précurseur avait été baptisé A8-75, pour les 75 % de carboxylates disponibles avant le greffage des isopropylamines). Bien que des travaux plus récents aient conduit à une ré-estimation de sa masse molaire (maintenant évaluée à 4,3 kg/mol⁶⁶), le nom d'origine a été conservé, en raison de l'utilisation déjà largement démocratisée de l'APol A8-35.

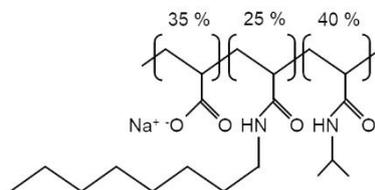


Figure d'introduction 1.2. Structure de l'amphipol A8-35.

La démocratisation de l'A8-35, ou des APols dans leur ensemble, a amplement tenu à la facilité avec laquelle ils peuvent être utilisés, notamment l'absence de la nécessité de travailler avec des tampons contenant du polymère en excès, à l'inverse des détergents qui doivent être présents à une concentration supérieure à leur CMC. Les APols peuvent aussi être fonctionnalisés ou adaptés à des usages spécifiques, notamment via réaction d'un groupement d'intérêt porteur d'une amine primaire sur un carboxylate libre du squelette polyacrylique. On notera ainsi des exemples d'APols fluorescents^{65,67,68}, d'APols marqués pour la purification ou la caractérisation (marqueur biotine⁶⁹, comme marqueurs histidine⁷⁰), ou encore d'APols deutérés pour les applications RMN^{71,72}. Des dérivés de l'A8-35 ont également été développés pour limiter ou s'affranchir de certains de ses inconvénients, comme la perte de solubilité à pH acide (avec la reprotonation des carboxylates⁶⁴), ou l'agrégation engendrée par l'exposition à certains cations divalents, notamment Ca^{2+} ⁷³. Ont ainsi été développées plusieurs branches alternatives d'APols, avec une version zwitterionique de l'A8-35 (les PC-APols, dont le nom vient des phosphorylcholines greffées sur les carboxylates laissés libres par les autres fonctionnalisations⁷⁴), une version sulfonatée (les SAPols, pour lesquels les isopropylamines sont remplacés par des groupements taurine⁷⁵), ainsi qu'une gamme d'APols neutres (les NAPols, avec une solubilité en solution aqueuse octroyée par des groupements glucose^{76,77}).

Avec la multiplicité des utilisations des APols (près d'une centaine de protéines membranaires avaient déjà été transférées et étudiées en APols en 2018⁷⁸), et l'essor en parallèle de la cryo-EM, ces derniers se sont fatalement retrouvés présents dans certaines préparations de grilles. En 2020, ce n'était ainsi pas moins d'une soixantaine de structures différentes de protéines membranaires qui avaient été obtenues en utilisant des polymères amphiphiles, dont plus de la moitié (34 occurrences) avec l'A8-35¹⁶. Au-delà de la validation implicite de son intérêt en cryo-EM par le simple fait qu'il soit régulièrement employé, quelques études font mention explicite de l'impact positif de l'A8-35 sur la préparation d'échantillon, comparativement à d'autres systèmes. On pourra par exemple citer l'étude de la NADH déshydrogénase par Flötenmeyer *et al.*¹, qui compare notamment des échantillons préparés en Triton X-100 avec des échantillons pour lesquels le Triton X-100 a été échangé pour l'A8-35, avec pour effet une amélioration de la distribution des particules observées grâce à l'obtention de glace plus homogène. Un tel impact est également mentionné dans l'étude de Baker *et al.*², avec une nette amélioration de l'épaisseur de glace en passant d'un environnement détergent (CHAPS) vers A8-35, ainsi qu'une réduction d'un problème d'orientation préférentielle lors du passage à d'un mélange A8-35/n-octyl glucoside.

Dans le cadre du travail présent, ces démonstrations ont été mises en parallèle avec l'observation suivante : l'A8-35 étant exclusivement utilisé comme environnement final après une première solubilisation en détergent (l'échange du détergent vers l'APol est aussi appelé protocole de piégeage), il est rarement le premier environnement à être testé lors de la préparation de grilles ; qu'un nombre significatif de structures soient malgré tout obtenues avec l'A8-35 signifie donc probablement que l'échange s'est avéré salutaire quant à l'effet stabilisateur de l'APol vis-à-vis de la protéine d'intérêt et/ou l'obtention de bonnes conditions d'imagerie. C'est ainsi que le projet d'étudier en détail l'impact de l'A8-35 sur la préparation des grilles de cryo-EM, plus particulièrement sur la stabilité et l'homogénéité de la glace au sein de ces grilles, a vu le jour, avec comme principales avancées les résultats présentés dans le chapitre ci-après.

1. Comportement de solutions d'A8-35 sur grilles de cryo-EM

L'objectif de cette étude a été de vérifier que l'Amphipol A8-35 avait bien un impact significatif sur les caractéristiques de glace des grilles de cryo-EM, et de le quantifier le cas échéant. La première étape a consisté à mettre au point des méthodes de caractérisation adaptées à une description à l'échelle de la grille, tant d'un point de vue exploitabilité que distribution d'épaisseur. Ces méthodes ont ensuite été appliquées à des grilles préparées avec une gamme de solutions d'A8-35. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe SOBIO du LPS Orsay, avec l'aide inestimable d'Amélie Leforestier et Jéril Degrouard.

1.1. Matériel et méthodes : préparation et imagerie de grilles de cryo-EM

1.1.1. Préparation des solutions d'A8-35

L'Amphipol A8-35 a été obtenu chez Anatrace. Le polymère commercial a été redispersé dans de l'eau et lyophilisé avant utilisation. Toutes les solutions de tensio-actif ont été préparées en tampon Tris/NaCl 20/150 mM pH8, préparé avec de l'eau ultra-pure (résistivité 18,2 M Ω .cm, obtenue avec un système milliQ de Merck Millipore, appelée eau milliQ par la suite), du Trizma base et du chlorure de sodium (Sigma Aldrich), et équilibré en pH avec de l'acide chloridrique 37% (VWR). La préparation d'une gamme de solution inclue : la préparation d'une solution mère par pesée de la masse souhaitée de polymère sec, dispersion dans le volume approprié de tampon, et agitation pendant 1 h à température ambiante pour garantir la bonne homogénéisation et réhydratation du polymère ; des dilutions en série ont été réalisées pour obtenir les concentrations voulues, recouvrant une gamme allant de 10⁻⁴ à 3 g/L.

1.1.2. Préparation de grilles de cryo-EM

Toutes les observations de cryo-EM à base de solutions pures de tensioactifs ont été effectuées sur grilles Quantifoil R2/2 Cu 200 mesh (illustration en **Figure 1.1.1**).

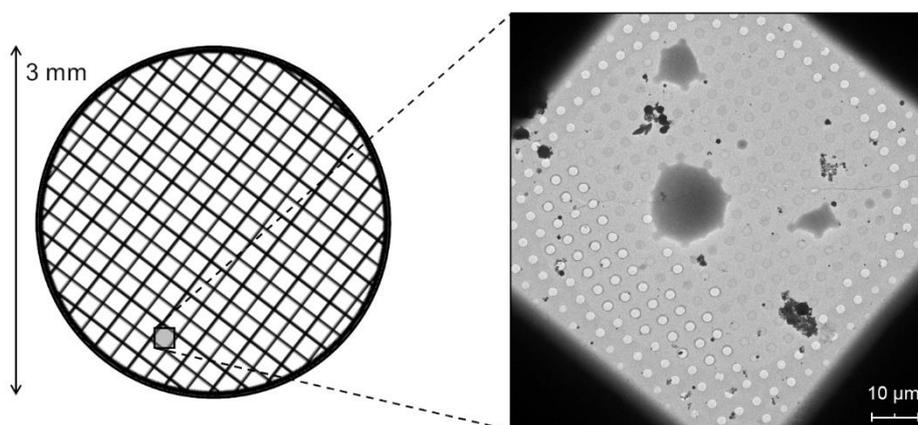


Figure 1.1.1. Schéma illustratif d'une grille de cryo-EM : disque de 3 mm de diamètre, constitué d'un réseau métallique, conférant à la structure sa rigidité et solidité, et d'un film mince de carbone (10 à 20 nm d'épaisseur) percé de trous, au sein desquels les observations sont effectuées. La nature du métal (cuivre, nickel, or, ...) influence le mouvement de l'échantillon lors de l'exposition au faisceau d'électrons³³, tandis que la taille et la périodicité des trous dans la couche de carbone modifient sa solidité, et sont à adapter en fonction de la macromolécule à visualiser. Dans l'étude présente, les grilles utilisées sont des R2/2 Cu 200 mesh, soit : trous de 2 μ m de diamètre, à intervalles de 2 μ m, sur un réseau de cuivre comportant 200 divisions/pouce (période d'environ 127 μ m, carreaux d'environ 85 μ m de côté en raison de l'épaisseur du support métallique).

La première étape consiste à laver les grilles par trempage dans une solution d'éthyl acétate, puis à les traiter au glow-discharge sous pression réduite d'Argon (0,5 bar, Argon alphas grade 2, 5 mA pendant 30 s). Le dépôt d'échantillon, l'épongeage et la congélation (illustration en **Figure 1.1.2**) ont été effectués avec un Vitrobot Mark IV, entre 30 et 60 min après glow-discharge, à température ambiante et saturation en humidité. Pour chaque grille, 3,0 μL de solution de tensio-actif ont été déposés, épongés pendant 2 s (force 15), puis rapidement ($t \approx 500$ ms) plongés dans le cryogène (éthane liquide refroidie à l'azote liquide). Les grilles ainsi cryo-fixées ont soit été directement analysées, soit stockées dans des réservoirs d'azote liquide jusqu'à leur traitement.

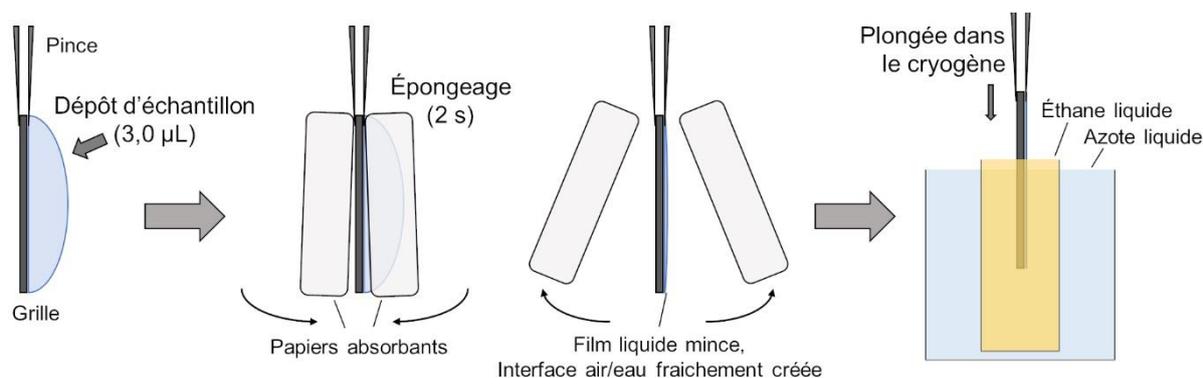


Figure 1.1.2. Illustration du procédé de cryo-fixation. La grille est au préalable trempée dans de l'acétate d'éthyle (nettoyage d'éventuels résidus liés au procédé de fabrication des grilles) et passée au glow-discharge (traitement plasma, augmentation de l'hydrophilie via création de charges de surface). L'échantillon (3,0 μL) est déposé sur grille avec une micropipette. Dans le cas de solutions fortement concentrées en tensio-actif, une attention particulière doit être consacrée au dépôt : la faible tension de surface air/eau de la solution conduit un mouillage rapide du cône si l'embout n'est pas assez proche de la grille. L'excès de liquide est retiré par épongeage (application de papiers absorbants, double épongeage dans le cas du Vitrobot). Le décollage des papiers absorbants laisse un mince film liquide supporté par la couche de carbone, rapidement ($t \approx 500$ ms) vitrifié dans le cryogène (ici, éthane liquide refroidie à l'azote liquide). La congélation est effectuée lorsque le cryogène présente un début de solidification (température proche de $-183,3$ °C).

1.1.3. Caractérisation de grilles : imagerie à faible grandissement

Les grilles ont été montées sur un cryo-porteur Gatan 626, puis insérées dans un JEOL 2010 F, opéré à 200 kV. Chaque grille a fait l'objet d'une séquence d'acquisition de 30 à 40 images à faible grandissement ($\times 500$), avec une intensité d'exposition constante, sans filtre ni diaphragme. Deux sets d'images, acquis sur deux grilles différentes, l'une préparée avec une solution d'A8-35 à 10^{-4} g/L et l'autre avec 1 g/L en A8-35, sont présentés en **Figure 1.1.3** et **Figure 1.1.4**, respectivement. Les conditions d'observation ont été choisies pour imager un carreau complet (environ 350 trous). Pour chaque concentration d'amphipol testée, 3 à 4 grilles ont été préparées avec pour chacune d'elles des sets d'images associés contenant en moyenne $11\,000 \pm 4\,000$ trous.

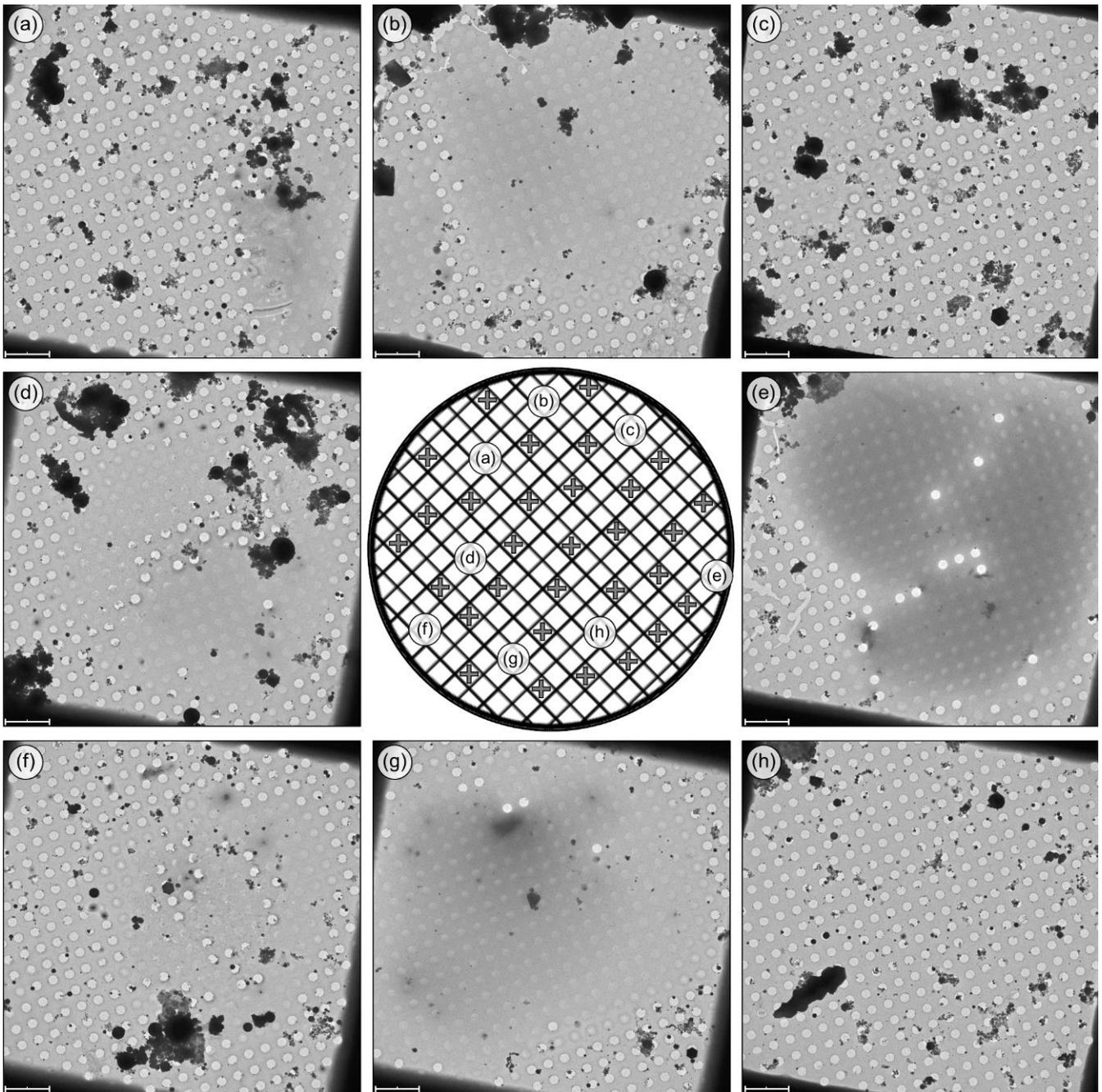


Figure 1.1.3. Set d'images à faible grandissement ($\times 500$) d'une grille préparée avec une solution d'Amphipol à 10^{-4} g/L : 38 images, dont les coordonnées sont reportées sur le schéma central. Pour ce set, 14 494 trous ont été identifiés, dont 8 437 vides (58,2 %). (a-h) aspect de 8 carreaux, répartis à travers la grille. Echelles : 10 μm .

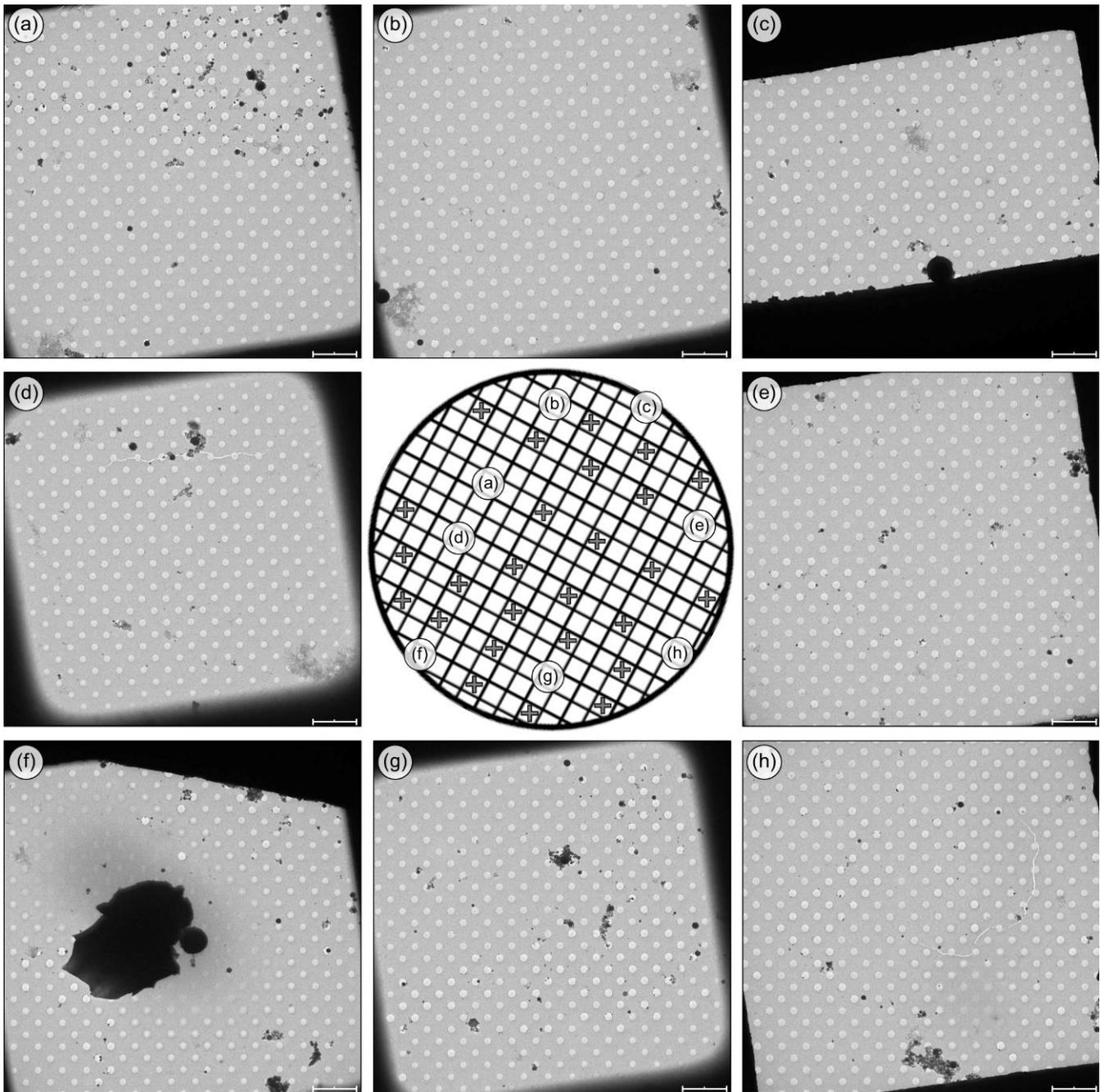
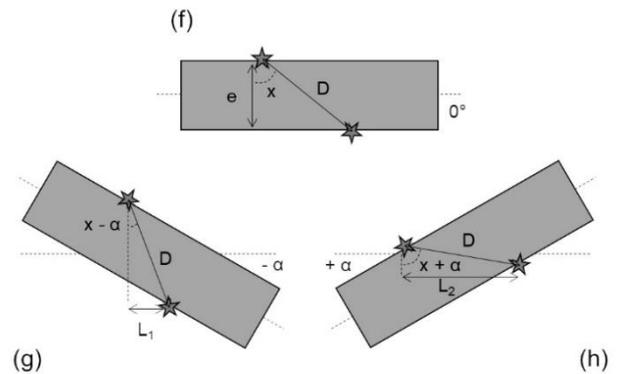
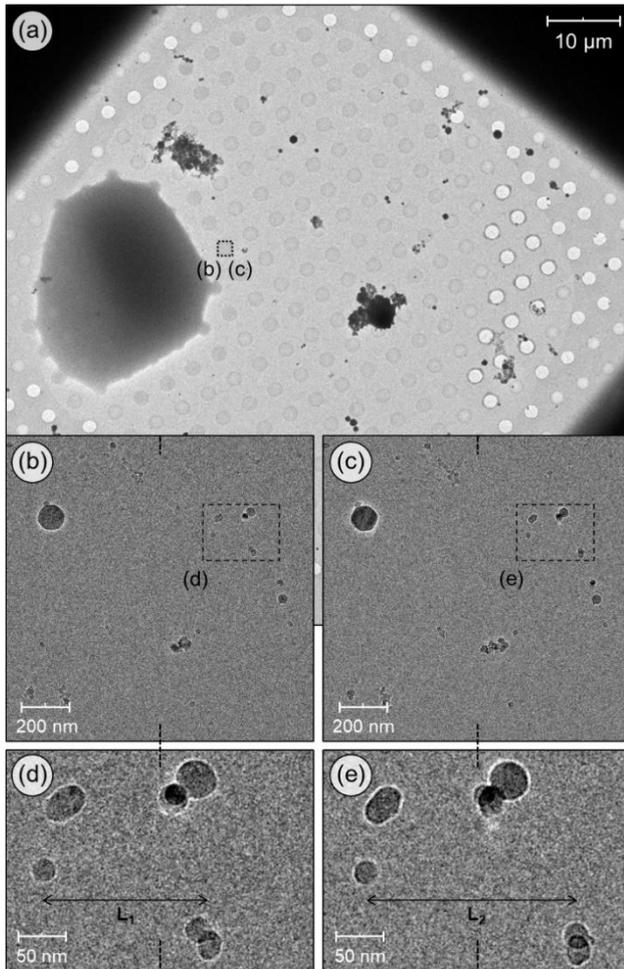


Figure 1.1.4. Set d'images à faible grandissement ($\times 500$) d'une grille préparée avec une solution d'Amphipol à 1 g/L : 34 images, dont les coordonnées sont reportées sur le schéma central. Pour ce set, 11 918 trous ont été identifiés, dont 1 240 vides (10,4 %). (a-h) aspect de 8 carreaux, répartis à travers la grille. Echelles : 10 μm .

1.1.4. Calcul d'épaisseur de glace : fort grandissement, acquisition de paires stéréo

Des sets supplémentaires d'image ont été acquis à fort grandissement (x 30 000) au sein de trous préalablement identifiés (illustration en **Figure 1.1.5**, panneau de gauche) : paires d'images stéréo (inclinaison à +15°/-15°), avec une intensité d'exposition constante, et un défocus de 3 000 nm. Ces paires stéréo ont permis de calculer l'épaisseur de glace à partir du changement de distance apparente entre des impuretés adsorbées de part et d'autre du film de glace (**Figure 1.1.5**, panneau de droite).



D'après (g) :

$$\sin(x - \alpha) = \frac{L_1}{D} = \sin(x) \cdot \cos(\alpha) - \sin(\alpha) \cdot \cos(x) \quad (I)$$

D'après (h) :

$$\sin(x + \alpha) = \frac{L_2}{D} = \sin(x) \cdot \cos(\alpha) + \sin(\alpha) \cdot \cos(x) \quad (II)$$

(II) - (I) :

$$\sin(x + \alpha) - \sin(x - \alpha) = 2 \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(x) = \frac{L_2 - L_1}{D}$$

$$\text{soit } \cos(x) = \frac{L_2 - L_1}{2 \cdot D \cdot \sin(\alpha)}$$

Enfin, d'après (f) : $\cos(x) = \frac{e}{D}$

Ainsi :
$$e = \frac{L_2 - L_1}{2 \cdot \sin(\alpha)} \quad (III)$$

Figure 1.1.5. Illustration de la technique de mesure d'épaisseur de glace.

Gauche, images d'une grille de cryo-EM à différents grandissements et angles. (a) Image à faible grandissement (x 500) d'une grille préparée avec une solution d'A8-35 à 0,003 g/L, avec mise en évidence d'un des trous utilisés pour l'acquisition de paires stéréo. (b-c) Zoom sur une paire d'images acquise à fort grandissement (x 30 000), avec inclinaison à -15° et +15°, respectivement. (d-e) Zoom sur les zones mises en évidence sur les images (b) et (c), respectivement. La modification de la distance apparente entre 2 impuretés résultant d'une adsorption de part et d'autre du film de glace est proportionnelle à son épaisseur. Les distances apparentes (ici L₁ et L₂) sont mesurées après projection sur un plan perpendiculaire à l'axe de rotation (lignes en pointillées).

Droite, calcul de l'épaisseur de glace à partir de l'acquisition de paires stéréo. (f-h) Schémas illustratifs du calcul d'épaisseur : schémas en coupe d'un film de glace, avec une paire d'impuretés adsorbée sur chaque face. (f) sans angle. (g) inclinaison à -α. (h) inclinaison +α. Pour tous les schémas : e représente l'épaisseur locale du film ; D représente la distance réelle entre les impuretés (indépendant de l'inclinaison) ; x représente l'angle entre « l'axe des impuretés » et la normale au film, en l'absence d'inclinaison. L₁ et L₂, mesurées sur les paires stéréo, représentent les distances apparentes entre les impuretés et dépendent de l'angle d'inclinaison de la grille. Les considérations trigonométriques permettant de relier l'épaisseur e à la différence de distance apparente L₂ - L₁ sont détaillées ci-dessus.

Limites de l'approche : le calcul proposé en **Figure 1.1.5** ne prend pas en compte l'épaisseur des impuretés, ni d'éventuels écarts à la planéité du film de glace. Afin de limiter ces potentielles sources de biais, seules les plus petites impuretés (diamètre apparent < 20 nm) ont été utilisées pour les analyses, et des paires proches du centre des films, où les variations d'épaisseurs sont les plus faibles, ont été sélectionnées.

Etant donnée la quantité de trous visualisés, les calculs précis d'épaisseur ont été utilisés pour étalonner une approche d'estimation plus rapide, basée sur la mesure d'intensité moyenne au sein de trous observés à faible grandissement.

1.1.5. Mesures d'intensité, relation intensité/épaisseur de glace

L'intégralité du traitement d'images de cryo-EM a été effectué avec le logiciel ImageJ.

La mesure d'intensité moyenne au sein de trous contenant un film intact a été effectuée sur une zone circulaire centrée, de diamètre 1,6 μm , excluant ainsi les bords de film, sujets aux plus fortes variations d'épaisseurs. Les trous vides ont également fait l'objet de mesures d'intensités moyennes, utilisées comme standard interne pour détecter et corriger d'éventuelles variations mineures d'exposition entre les acquisitions. En raison du bon contraste trous vides/carbone, ces mesures contrôles ont été réalisées par détection automatique (création d'un masque par binarisation d'une copie de l'image faible grandissement, avec choix du seuil pour faire ressortir les trous vides ; application au masque de la fonctionnalité d'analyse de particule d'ImageJ : mesure d'intensité au sein des particules quasi-circulaires d'environ 2 μm de diamètre, report de mesure sur l'image non binarisée).

Dans le cas des trous ayant été utilisés pour l'acquisition de paires stéréo (**Figure 1.1.5**), les intensités moyennes ont été corrélées aux épaisseurs calculées sur un modèle de dépendance logarithmique, en adéquation avec les travaux récents sur la mesure d'épaisseur de glace en cryo-EM^{79,80}. La courbe obtenue, présentée en **Figure 1.1.6**, a été utilisée pour convertir l'intégralité des intensités mesurées en épaisseurs estimées. Cela a permis de tracer une distribution d'épaisseur à l'échelle de l'échantillon pour chacune des grilles observées. Enfin, les aires des toutes les distributions ont été normalisées, afin de s'affranchir des problématiques liées aux variations de quantités de trous exploitables entre grilles.

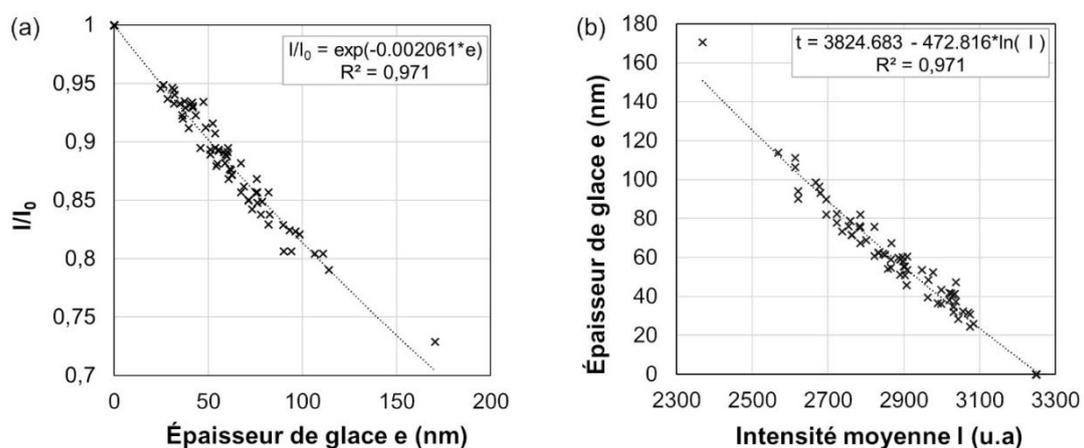


Figure 1.1.6. Courbe de calibration pour l'estimation d'épaisseur de glace. L'intensité moyenne d'un film, mesurée à faible grandissement (x 500), est corrélée avec son épaisseur, calculée à partir de paires stéréo acquises à fort grandissement (x 30 000). (a) Tracé de l'intensité en fonction de l'épaisseur, format correspondant à celui utilisé dans l'article de Brown *et al*⁸⁰. (b) Tracé de l'épaisseur en fonction de l'intensité, utilisé pour la conversion de toutes les intensités mesurées en épaisseurs estimées.

1.2. Résultats obtenus sur les caractéristiques de glace des échantillons de cryo-EM

1.2.1. Impact de la concentration d'A8-35 sur la stabilité et l'épaisseur des films

La majorité des résultats présentés ici sont publiés et discutés dans la référence suivante : B. Michon, U. López-Sánchez, J. Degrouard, H. Nury, A. Leforestier, E. Rio, A. Salonen and M. Zoonens, "Role of surfactants in electron cryo-microscopy film preparation", **submitted** (*Biophysical Journal*).

Les variations de propriétés de glace, observées pour des concentrations d'A8-35 allant de 10^{-4} à 3 g/L, sont présentées en **Figure 1.1.7**.

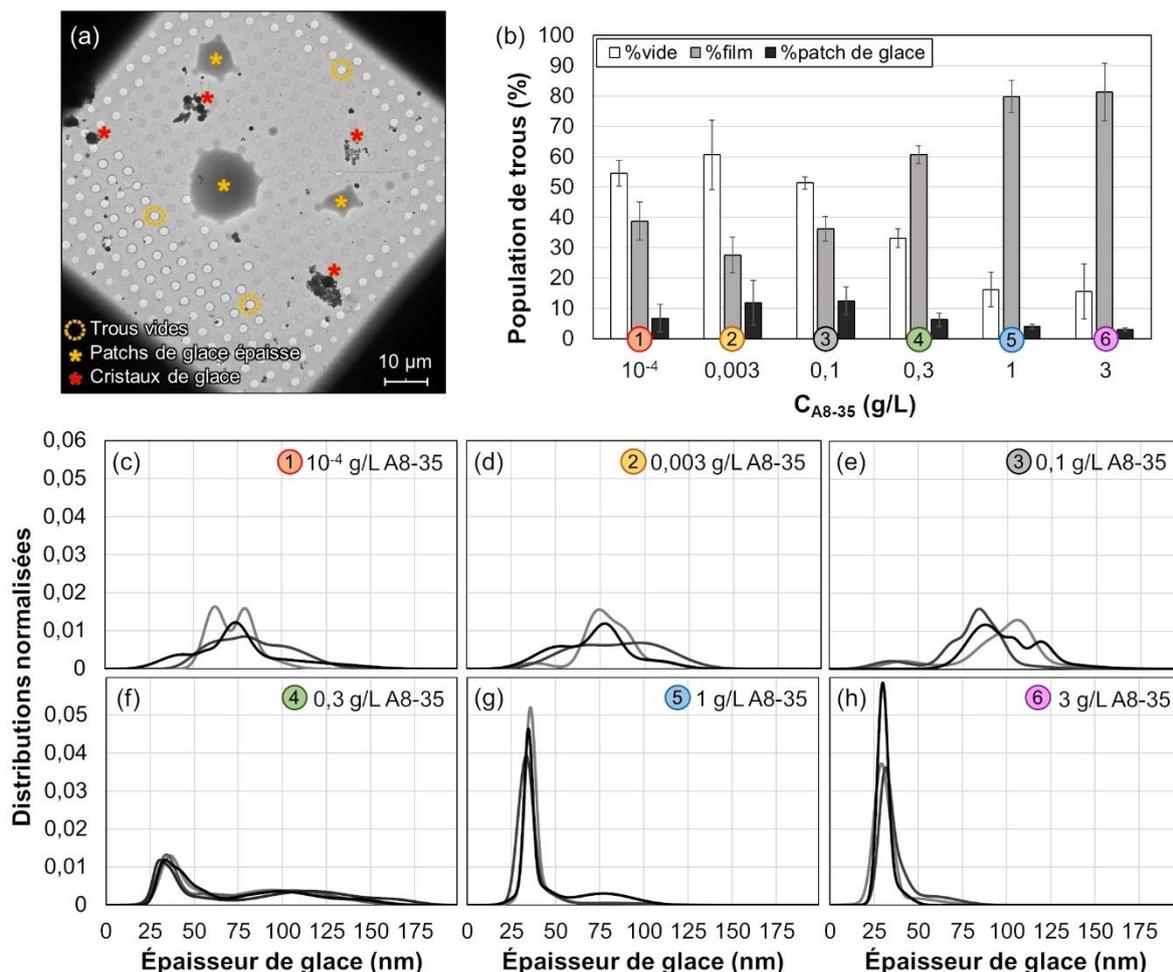


Figure 1.1.7. Impact de la concentration en A8-35 sur la stabilité et la distribution d'épaisseur de glace dans une grille de cryo-EM. (a) Image à faible grandissement (x 500) d'un carreau de grille (échantillon à 0,003 g/L en A8-35). Les trous clairs à bords nets sont vides (128 sur cette image, dont 3 indiqués, ) , ceux recouverts par l'un des 3 patches de glace () ont été catégorisés dans la population « épais » et n'ont pas fait l'objet de mesures d'intensités. Tous les autres trous ont été utilisés pour de l'estimation d'épaisseur. (b) Variation de la proportion de chaque population avec la concentration en polymère A8-35. (c-h) Distributions d'épaisseurs de glace pour des concentrations d'A8-35 allant de 10^{-4} à 3 g/L. Entre 3 et 4 grilles différentes ont été analysées (sets de 30 à 40 images obtenues à faible grandissement, $11\,000 \pm 4\,000$ trous/set) pour chaque concentration, chacune conduisant à une distribution d'épaisseur.

En premier lieu, les problématiques de stabilité ont été considérées : chaque trou observable a été catégorisé (trou vide / régime intermédiaire / film trop épais pour une mesure, **Figure 1.1.7 (a)**), permettant de mettre en évidence la variation de proportion entre chaque population avec la concentration d'A8-35 (**Figure 1.1.7 (b)**). Aucune différence nette n'a pu être relevée pour les faibles concentrations (inférieures ou égales à 0,1 g/L), pour lesquelles une majorité de trous sont vides. A l'inverse, la proportion de films intacts augmente significativement pour les concentrations supérieures (0,3 g/L et plus), jusqu'à atteindre un plateau vers 80% de trous exploitables pour une mesure d'épaisseur de glace.

Ces observations ne permettant toutefois pas de décrire efficacement les variabilités entre grilles d'une même concentration, voir l'inhomogénéité au sein d'une même grille (phénomène visible en **Figure 1.1.3**), une attention particulière a été accordée à la répartition et aux variations d'épaisseur de la glace, avec pour résultats les distributions présentées en **Figure 1.1.7 (c-h)**. De nouveau, pas de différence significative pour les concentrations inférieures ou égales à 0,1 g/L : large gamme d'épaisseurs observées, et reproductibilité négligeable d'une grille à l'autre. Ce dernier point est nettement amélioré en montant à une concentration de 0,3 g/L : 2 modes sont identifiables sur toutes les grilles, le premier composé de films fins (35 ± 10 nm), l'autre d'une large gamme de films plus épais (allant de 50 à 160 nm d'épaisseur). Un accroissement supplémentaire de la concentration entraîne l'affinement significatif des distributions, ne laissant qu'un unique mode de films fins.

Si l'augmentation de la proportion de films intacts avec la concentration de tensio-actif pouvait être attendue (l'utilisation de tensio-actifs pour la stabilisation de films liquides et de mousses est classique, quoique la complexité des mécanismes associés soit suffisante pour motiver des études entières sur la question), le seuil au-delà duquel cet effet devient visible a de quoi surprendre. Le plus intuitif aurait été d'avoir une transition proche de la concentration d'agrégation critique (ou CAC, concentration de formation des premiers agrégats de polymères ; équivalent de la concentration micellaire critique, ou CMC, pour les détergents) de l'A8-35. Cette dernière, cependant, est de l'ordre de 0,002 g/L⁶⁵, soit 2 ordres de grandeurs en-dessous du seuil observé pour l'augmentation de stabilité. De plus, un argumentaire purement basé sur l'apparition d'agrégats ne semble pas suffisant pour proposer une explication satisfaisante au gain de reproductibilité, puis au contrôle d'épaisseur observés aux plus fortes concentrations. Afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes qui impactent les caractéristiques de glace sur grille de cryo-EM, et d'identifier les paramètres d'intérêts, une étude des propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses d'A8-35 a été effectuée, exposée en détail dans la section idoine.

1.2.2. Comportements de film observés sur grille de cryo-EM

1.2.2.1. Description des différentes géométries observées

L'analyse des distributions ayant mis en évidence l'existence d'une large gamme d'épaisseurs de films, un focus visuel sur une région présentant des hétérogénéités d'intensité a été effectué, et est présenté en **Figure 1.1.8**.

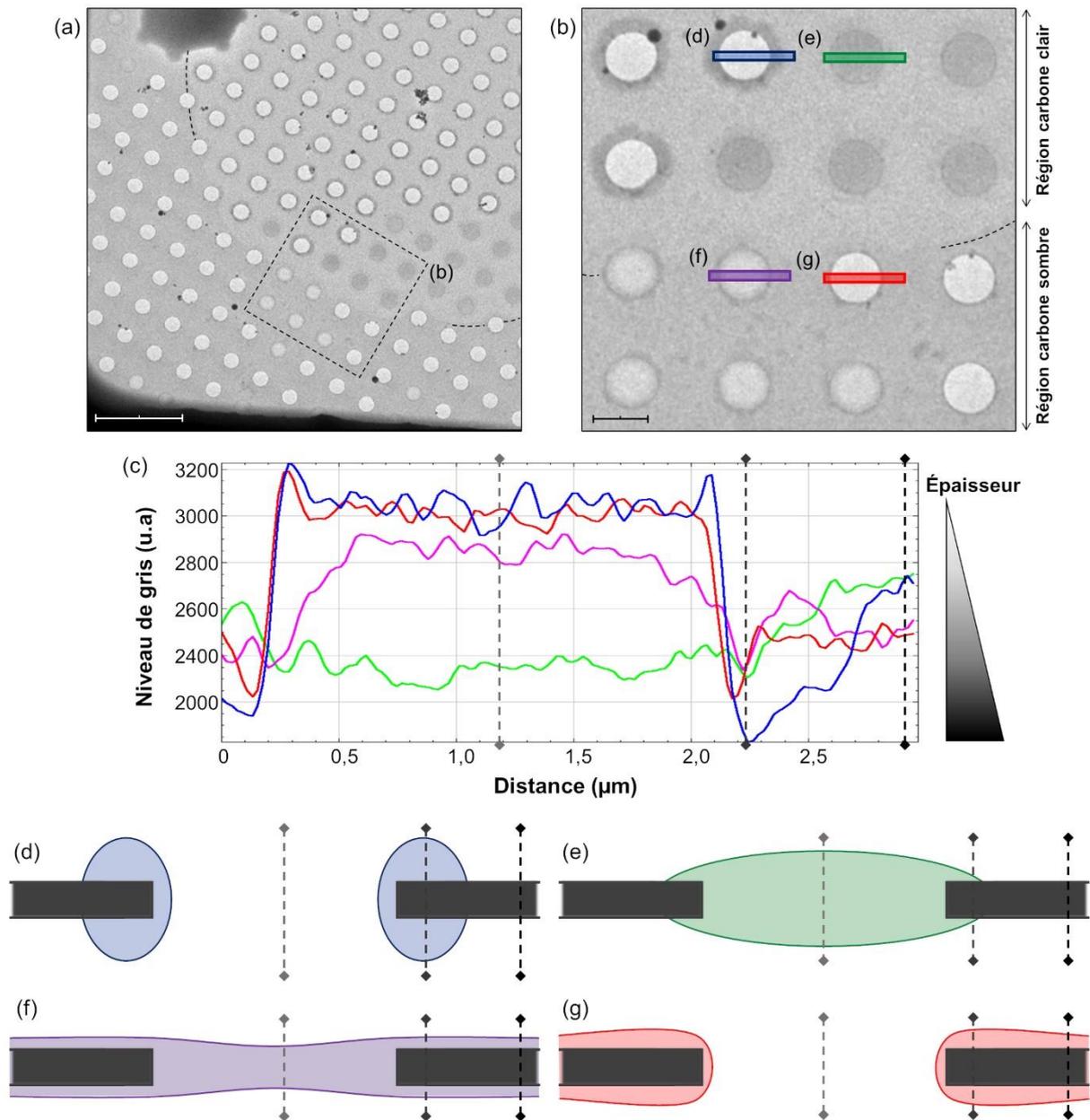


Figure 1.1.8. Illustration des variations d'intensités pouvant être observées sur grille de cryo-EM. (a) Focus sur un coin de carré d'une grille préparée avec une solution d'A8-35 à 0,1 g/L. En se focalisant sur la couche de carbone, 2 régions sont visibles : région de carbone sombre proche des bords du carreau, et région plus claire, proche du centre du carreau. Echelle : 10 µm. (b) Zoom sur la frontière entre les 2 régions : films épais (≈ 110 nm) là où le carbone est le plus clair, films fins (≈ 40 nm) côté carbone sombre. Echelle : 2 µm. (c) Profils d'intensités tracés suivant les 4 lignes indiquées en (b). Plus l'intensité est faible, plus l'épaisseur locale est importante. (d-g) Schémas illustratifs (non dessinés à l'échelle) des géométries proposées pour les trous vides et pleins dans chaque région.

Proche des bords du carreau (parties basses et gauches de la **Figure 1.1.8 (a)**), un excès de liquide couvrait encore la couche de carbone au moment de la congélation : le support métallique a soit servi de réservoir de liquide, soit empêché un contact complet du papier absorbant dans sa proximité immédiate. En comparaison, la région centrale, plus claire, présente probablement une couche de carbone complètement séchée. Les différents types de trous (vides/pleins) de chaque région sont illustrés en **Figure 1.1.8 (b)**, décrits d'un point de

vue variation d'intensité en **Figure 1.1.8 (c)**, et schématisés en **Figure 1.1.8 (d-g)**. Dans la région sèche, le liquide est accumulé dans les trous, ne mouillant le carbone qu'en proximité immédiate des trous, et conduisant à la formation d'épais films convexes (**Figure 1.1.8 (e)**). Si ces films cassent, le liquide s'accumule en bordure des trous, toujours sans mouiller le carbone (**Figure 1.1.8 (d)**), formant l'anneau sombre caractéristique entourant les trous vides de cette région. Dans la région mouillée, l'accumulation locale de liquide n'est pas favorable : l'étalement du liquide conduit à des films fins et concaves (**Figure 1.1.8 (f)**), sans accumulation possible sur les bords en cas de rupture, l'eau en excès étant absorbée par la couche de liquide recouvrant déjà le carbone (**Figure 1.1.8 (g)**). Sur la base de cette observation, une étude de mouillage de carbone a été menée, dont les résultats seront commentés dans la partie propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses d'A8-35.

1.2.2.2. Finesse de film : rupture pré- ou post-congélation

Pour aller un peu plus loin, un même type de géométrie peut légèrement varier avec la concentration en A8-35. L'exemple le plus explicite est le mode de films fins, schématisés en **Figure 1.1.8 (f)**. Ce mode, qui devient bien défini et reproductible à haute concentration en A8-35 ($\geq 0,3$ g/L, **Figure 1.1.7 (f-h)**), subit une légère diminution d'épaisseur avec la concentration (épaisseur moyenne de 37 nm, 35 nm et 30 nm à 0,3 g/L, 1 g/L et 3 g/L, respectivement). Outre l'impact potentiel sur l'observation de systèmes biologiques, une faible épaisseur pouvant conduire à une exclusion des complexes du centre du film, cet affinement peut également entraîner une fragilisation des films, comme illustré en **Figure 1.1.9**.

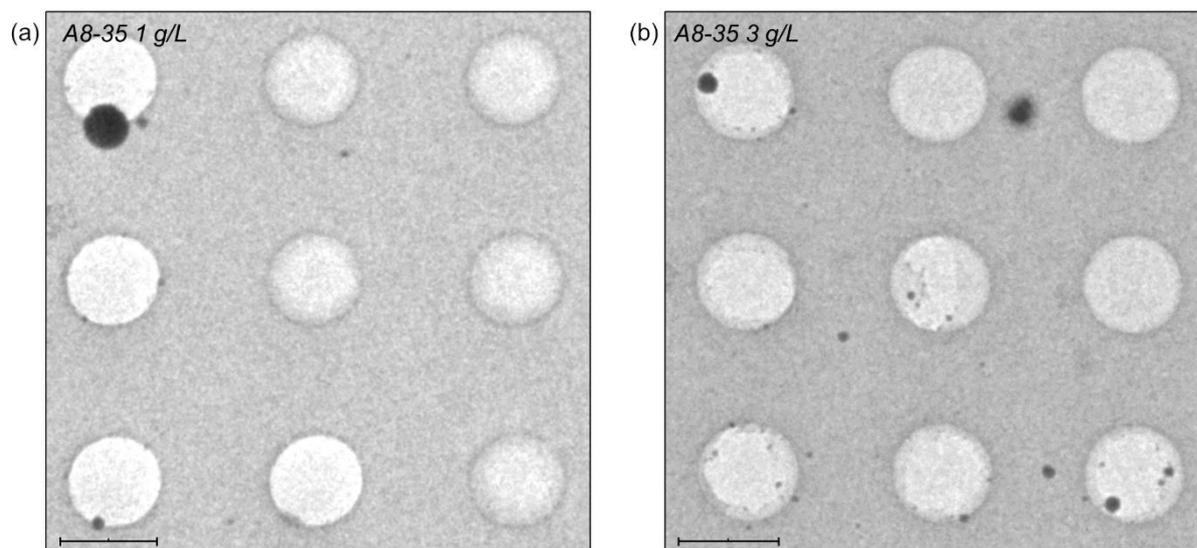


Figure 1.1.9. Illustration des différents types de rupture de films en cryo-EM. Les images présentées résultent de zooms effectués sur des acquisitions à faible grandissement ($\times 500$). Echelle 2 μm . (a) Grille préparée à 1 g/L en A8-35. Les bords nets des trous vides, ainsi que l'absence d'anneau sombre sur leur contour, indiquent qu'il s'agit d'une configuration similaire à celle décrite en **Figure 1.1.8 (g)**. (b) Grille préparée à 3 g/L en A8-35. Les restes de glace aux contours irréguliers au sein de 6 des 9 trous montrés indiquent que les ruptures ont probablement eu lieu après solidification des films.

Jusqu'à-là, les trous présentant une absence de films exploitables ont été qualifiés de « trous vides ». Cette appellation décrit de manière convenable les 2 cas de figures les plus courants : trou complètement sec post-épongeage (absence totale de film) ; présence initiale d'un film, mais rupture avant congélation. Plus précisément, ces 2 cas englobent l'intégralité des trous vides observés pour toutes les concentrations d'A8-35 testées, à l'exception de la plus élevée, 3 g/L : sur ces grilles exclusivement, des trous inexploitables, contenant encore

des fragments de film, peuvent être observés (**Figure 1.1.9 (b)**). La netteté et l'irrégularité de leurs bords indiquent que les films étaient à l'état solide au moment de la rupture : l'hypothèse actuelle est qu'à cette concentration, la faible épaisseur des films post-congélation limite leur solidité, entraînant parfois leur rupture lors de la manutention, là où aux autres concentrations, l'épaisseur plus importante garantie qu'un film ne pourra rompre qu'avant congélation. Une observation similaire a d'ailleurs été reportée par Drulyte *et al.*⁸¹, qui décrit des occurrences de ruptures similaires, le plus souvent lors d'un travail avec des trous de grand diamètre (entraînant une épaisseur plus faible au centre des films) et/ou en présence de détergent. Ainsi, si l'augmentation de la concentration d'A8-35 au-delà d'un certain seuil permet d'améliorer la stabilité des films liquides, augmentant la proportion exploitables (cf **Figure 1.1.7 (b)**), l'utilisation de concentrations trop élevées peut compromettre la solidité des films congelés, en raison des épaisseurs résultantes trop faibles. Il y a donc un optimum de concentration d'A8-35 pour la préparation de grille, qui, à la lumière des résultats qui précèdent, se trouve strictement entre 0,1 et 3 g/L pour les paramètres expérimentaux de cette étude.

A ce stade, l'impact de la concentration en A8-35 sur les caractéristiques de glace et les conséquences en termes de physionomie de films/trous observés sur grille de cryo-EM ont été mis en évidence. Afin d'identifier des paramètres physico-chimiques d'intérêts, une batterie d'analyses a été menée sur des solutions de polymère, avec pour objectif de trouver d'éventuelles corrélations avec les comportements en cryo-EM, et de proposer des mécanismes cohérents avec l'évolution desdits comportements.

2. Analyses physico-chimiques de solutions d'A8-35

2.1. Films liquides suspendus : estimation de la stabilité et du drainage

La première caractéristique considérée a été la stabilité des films : peu importe le contrôle d'épaisseur de glace sur une grille de cryo-EM, la rupture d'une majorité de films avant congélation limitera nécessairement la quantité d'informations accessibles. Pour cette étude, la stabilité a été estimée via génération automatisée de films et mesure de leur temps de vie ainsi que des cinétiques d'amincissement, en collaboration avec l'équipe Mmoi du LPS Orsay, avec l'aide très salutaire d'Emmanuelle Rio, Marina Pasquet et François Boulogne.

2.1.1. Dispositifs expérimentaux : génération de films, mesures d'épaisseur

2.1.1.1. Tirage de film, mesure du temps de vie

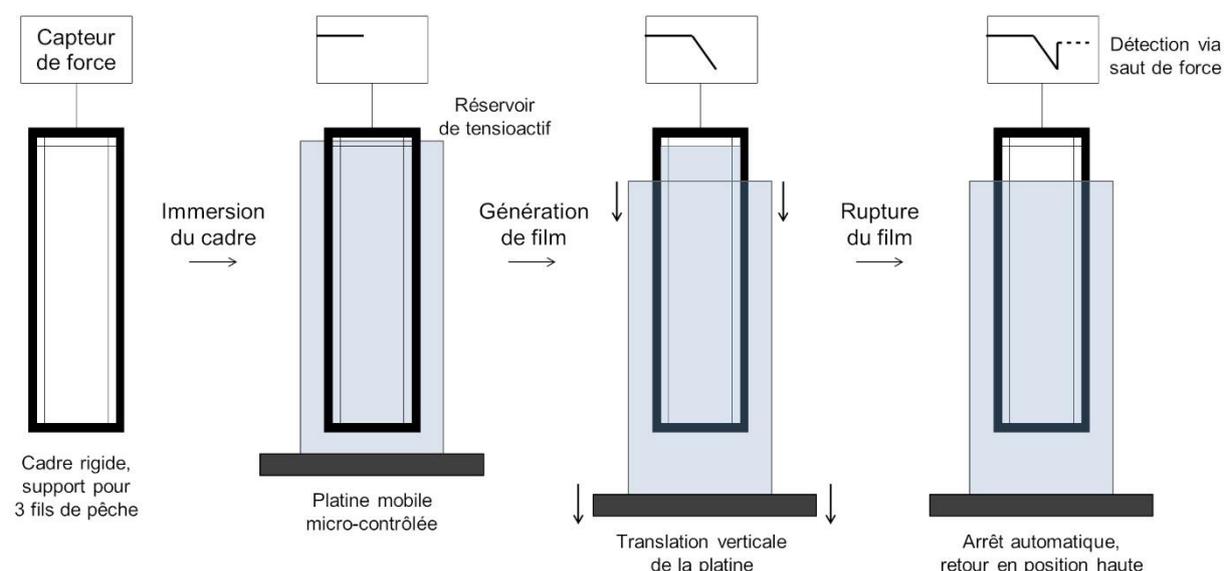


Figure 1.2.1. Illustration du montage de tirage de film. Un cadre rigide, fixé à un capteur de force, est immergé dans une cuve de tensioactif dont la position verticale est ajustée via une platine micro-contrôlée. Un film liquide est généré en descendant la cuve à vitesse constante. La force qu'applique le cadre sur le capteur est monitorée en continu, et permet de détecter la rupture du film, en raison de la discontinuité associée.

L'appareil de tirage de film utilisé, présenté en **Figure 1.2.1**, a été construit par Laurie Saulnier au cours de son doctorat⁸². Le principe consiste à immerger un cadre support dans une solution de tensioactif via translation d'une platine, avant de générer un film liquide suspendu via descente de la cuve à vitesse constante. Le suivi de la force appliquée au cadre permet une détection de la rupture du film, autorisant une automatisation du cycle immersion du cadre / génération de film / rupture.

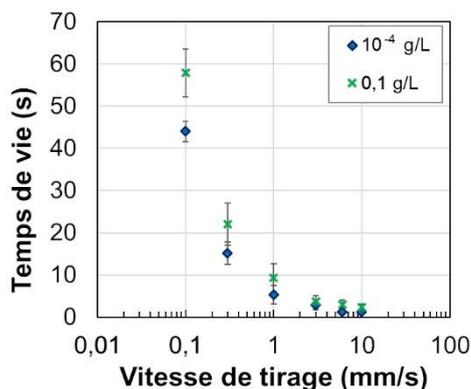


Figure 1.2.2. Variation du temps de vie de films composés de solutions aqueuses d'A8-35 à 2 concentrations, 10^{-4} et 0,1 g/L, en fonction de la vitesse de tirage.

Les premières expérimentations effectuées sur ce montage ont révélé 2 paramètres principaux à prendre en compte pour le bon déroulé des tirages. Une gamme de tests avec plusieurs vitesses de tirage, dont 2 exemples sont présentés en **Figure 1.2.2**, a montré qu'un compromis était de mise : à haute vitesse, la discrimination de comportement entre solutions de différentes concentrations est compromise, tandis qu'à basse vitesse, la durée d'expérience et l'incertitude sur les mesures prennent une ampleur significative. Une vitesse intermédiaire de 2 mm/s a ainsi été choisie pour l'ensemble des tirages (300 films par concentration testée). Le 2^e paramètre, le contrôle du taux d'humidité environnante, a été souligné par une importante variabilité des temps de vie en fonction de la période d'expérimentation. Afin de s'en affranchir, et de se rapprocher des conditions expérimentales propres à la préparation de grilles en cryo-EM, tous les tirages ultérieurs ont été effectués dans une boîte fermée et saturée en humidité. Le contrôleur d'humidité a été construit avec l'aide de François Boulogne, sur la base de son article sur les approches de fabrication maison⁸³.

2.1.1.2. Mesure d'épaisseur par interférométrie

Des mesures additionnelles ont été effectuées afin d'estimer les dynamiques d'écoulement au sein des films. A cet effet, le montage de tirage décrit précédemment a été adapté comme illustré en **Figure 1.2.3**. L'objectif est d'inclure une fibre optique, reliée à une lampe halogène, afin d'éclairer en incidence normale le film généré. Le faisceau réfléchi, composé d'une superposition entre la réflexion sur la première face du film (interface air/eau) et celle sur la seconde face (interface eau/air), après traversée du film sur toute son épaisseur, est collecté par une 2^{nde} fibre optique, et redirigé vers un spectromètre (**Figure 1.2.3 (b)**). Le spectre résultant (**Figure 1.2.3 (c)**) donne accès à la variation de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde, qui obéit à la relation suivante (dans l'approximation d'une interférence à 2 ondes) :

$$R = A \cdot \sin\left(\frac{4\pi \cdot n \cdot e}{\lambda} + \varphi\right) + B \quad [1]$$

où R est la réflectivité, A est l'amplitude, φ est la phase, B est la valeur moyenne, n est l'indice de réfraction (ici indice de l'eau), λ est la longueur d'onde et e est l'épaisseur du film. La période entre minimas et maximas de réflectivité permet ainsi d'accéder à la grandeur d'intérêt, l'épaisseur e du film (**Figure 1.2.3 (d)**).

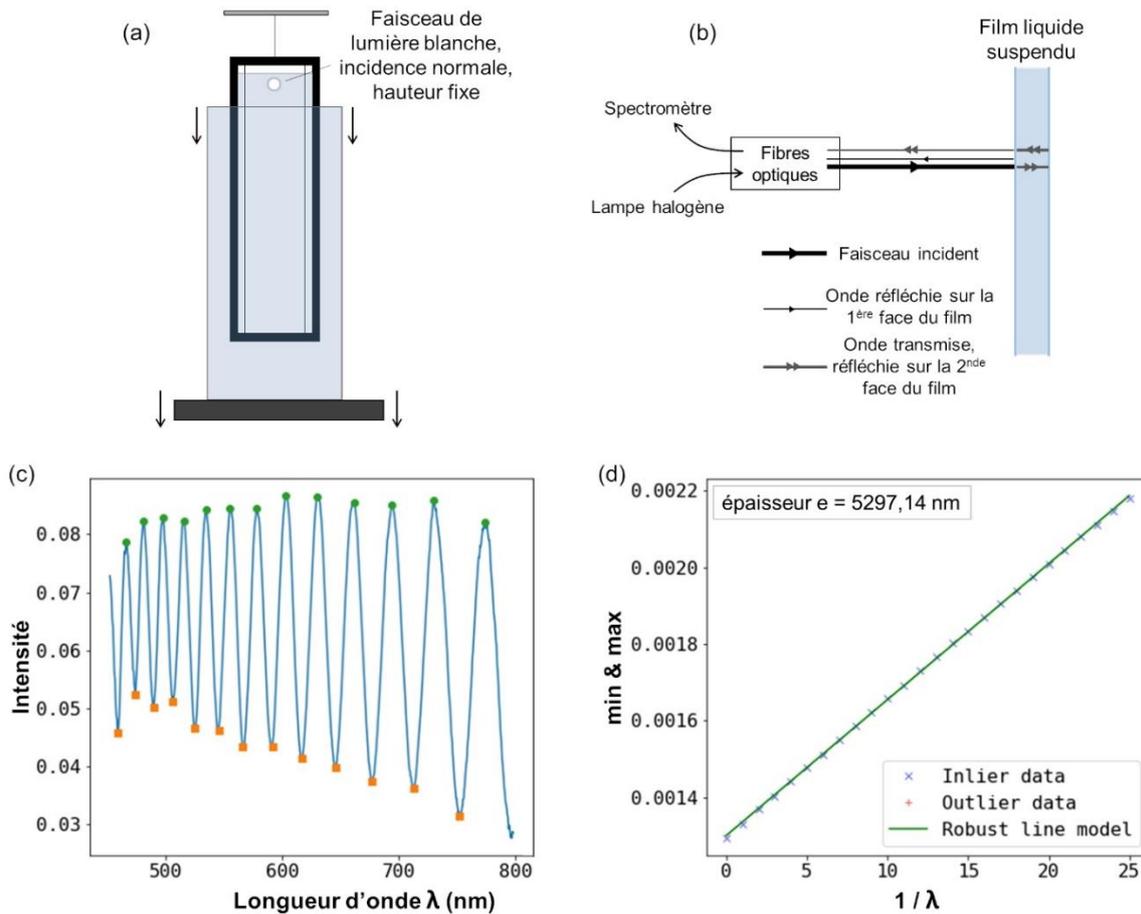


Figure 1.2.3. Illustration de la méthode de mesure d'épaisseur pour des films liquides suspendus. (a) Adaptation du montage de tirage de film : un réseau de fibres optiques est installé à hauteur fixe de manière à éclairer le film généré en incidence normale. L'ensemble platine + cuve reste le seul élément mobile du dispositif. (b) Vue de profil du dispositif. L'éclairage en lumière blanche se fait avec une lampe halogène. Un réseau de fibres récupère l'ensemble des ondes réfléchies et les redirige vers un spectromètre. Par soucis de lisibilité, seules 2 ondes ont été représentées. (c) Exemple de spectre collecté. La variation d'intensité en fonction de la longueur d'onde résulte de la relation [1] : la période entre minimas et maximas permet ainsi de remonter à l'épaisseur du film. (d) Calcul de l'épaisseur du film, basé sur le repérage des minimas et maximas du spectre présenté en (c). L'intégralité du traitement de spectre et des mesures d'épaisseurs a été fait via Python, à l'aide d'un code développé et partagé par Marina Pasquet.

Pour toutes les solutions étudiées, les mesures d'épaisseur ont été effectuées à hauteur fixe, à 2 mm du haut du film liquide. Les acquisitions ont été faites à raison de 30 spectres/s, permettant de tracer l'évolution de l'épaisseur du film en fonction du temps. Les courbes finales résultent d'un moyennage effectué sur 50 répétitions.

Limite de la méthode : l'affinement du film entraîne un espacement des minimas et maximas. En dessous d'une épaisseur seuil, 500 nm, la période devient supérieure à la largeur du spectre enregistré, invalidant la méthode de calcul. La mesure d'épaisseurs inférieures à 500 nm est néanmoins souvent utile, et peut être effectuée en utilisant une méthode de renormalisation initialement proposée par A. Sheludko⁸⁴. Basée sur un calcul de réflectivité prenant en compte la totalité des ondes réfléchies, cette approche a notamment été explicitée et implémentée par Laurie Saulnier dans son travail de thèse⁸². Dans le cas du travail présent, pratiquement aucun des films générés n'a duré suffisamment longtemps pour atteindre une épaisseur proche de 500 nm, rendant superflue l'utilisation de cette approche.

2.1.1.3. Nettoyage cuve + cadre, calibration des mesures d'épaisseur

A chaque changement de solution, la cuve et le cadre servant de support aux films ont été rincés 10 fois à l'eau courante, puis 10 fois à l'eau milliQ. La qualité du nettoyage a ensuite été vérifiée avec une séquence de tirage de films dans de l'eau milliQ, en réitérant la séquence de rinçage dans le cas où des films arrivaient à être générés. Lors de l'implémentation des mesures d'épaisseur, la lampe halogène a été allumée 20 minutes en amont, afin de garantir une intensité stable et maximale. Par ailleurs, l'acquisition de 2 spectres de référence a été effectuée : un spectre 'noir' (absence de réflexion, acquis en l'absence de film) et un spectre 'blanc' (réflexion totale, acquis en plaçant un wafer de silicium au contact du cadre support), permettant la calibration des mesures, ainsi que la vérification du bon alignement du faisceau.

2.1.2. Résultats et discussion : temps de vie et drainage des films

Les variations de temps de vie des films ont été observées pour une gamme de solutions d'A8-35 allant de 10^{-4} à 1 g/L (**Figure 1.2.4**).

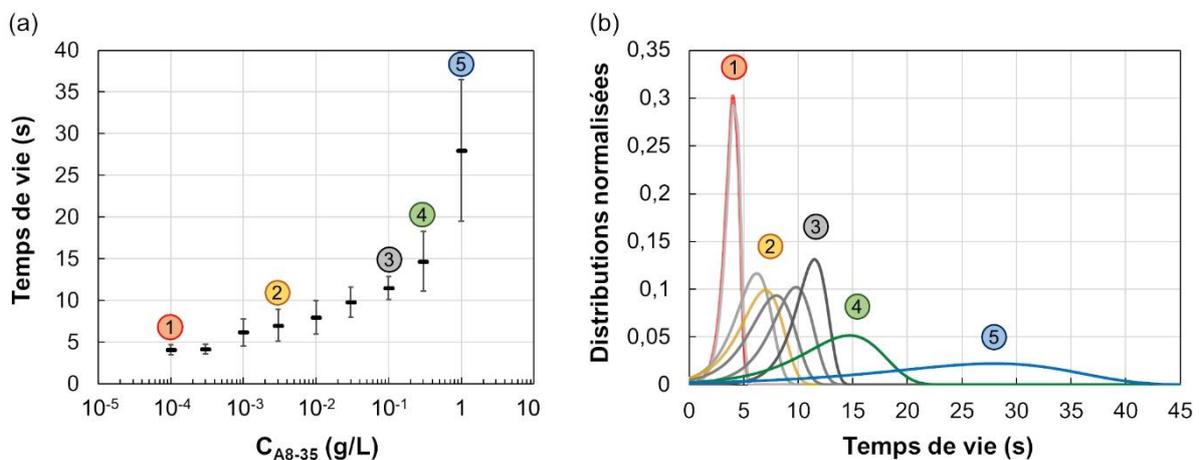


Figure 1.2.4. Résultats des expériences de tirage de film pour une gamme de solutions d'A8-35. Les conditions mises en valeur correspondent aux concentrations utilisées pour l'étude sur grilles de cryo-microscopie (**Figure 1.1.7**). (a) Variation du temps de vie moyen des films en fonction de la concentration en A8-35. Les points reportés correspondent à la moyenne et à l'écart-type de séries de 300 mesures consécutives, effectuées dans un environnement fermé saturé en humidité. (b) Représentation des distributions de temps de vie associées à chacune des séries de mesures. Aucune série de mesure n'a pu être effectuée pour des concentrations supérieures à 1 g/L : en raison de la taille du cadre utilisé (90 mm) et de la vitesse de tirage (2 mm/s), le cadre sort du réservoir de liquide au bout de 45 s, modifiant la géométrie du film suspendu. Afin d'éviter ce biais, les séries incluant des cas de stabilité excessive de film (temps de vie > 45 s) n'ont pas été prises en compte.

Un changement de comportement est observable à la concentration seuil de 0,1 g/L : pour les concentrations inférieures, l'augmentation du temps de vie est lente, triplée sur 3 décades ; au-delà de ce seuil, l'augmentation d'un même facteur 3 se fait sur une seule décade de concentration. Pour une meilleure description des comportements, les distributions de temps de chaque série de films ont été représentées (**Figure 1.2.4 (b)**) en adoptant un profil type valeur maximale, d'abord proposé par *Poulain et al.*⁸⁵, puis repris par Jonas Miguët dans son travail de thèse⁸⁶. L'équation utilisée est la suivante :

$$E(t) = \frac{1}{\sigma} e^{\left(\frac{1-\mu_m}{\sigma}\right)} e^{-e^{\left(\frac{t-\mu_m}{\sigma}\right)}} \quad [2]$$

où μ_m est un paramètre de valeur maximale, autour de laquelle se trouve la plupart des points de la distribution (ici proche du temps de vie moyen), et σ est un paramètre de dispersion (ici proche de l'écart-type). Cette équation permet de décrire de manière adéquate l'asymétrie observée dans les distributions. Dans le cas des films liquides suspendus, la cause de cette asymétrie est la coexistence de 2 mécanismes de déstabilisation, l'un stochastique (adsorption aléatoire d'une poussière hydrophobe sur le film, entraînant sa rupture), l'autre plus déterministe (nucléation d'un trou après affinement excessif du film). Ici, la prédominance de l'un ou l'autre des mécanismes est fortement impactée par la concentration en A8-35 : distributions resserrées aux concentrations les plus faibles (en particulier 10^{-4} et $3 \cdot 10^{-4}$ g/L), signe que l'épaisseur critique est rapidement atteinte, ce qui limite les possibilités de rupture stochastique ; à l'inverse, élargissement des distributions aux fortes concentrations (0,3 et 1 g/L), où l'importante stabilité des films augmente les chances de rupture stochastique avant que l'épaisseur critique ne soit atteinte.

Ces premières expériences soulignent 2 points principaux : il existe un seuil de concentration, 0,1 g/L, au-delà duquel le temps de vie des films augmente rapidement, en bonne adéquation avec les observations faites sur grille de cryo-EM ; l'influence de la concentration sur le temps de vie impact également l'équilibre entre mécanismes de déstabilisation des films, en jouant sur l'intervalle de temps accessible pour une rupture stochastique avant que l'épaisseur critique ne soit atteinte. Afin de compléter cette part de l'étude, des tests de suivi d'amincissement des films ont été effectués, présentés en **Figure 1.2.5 (a)**.

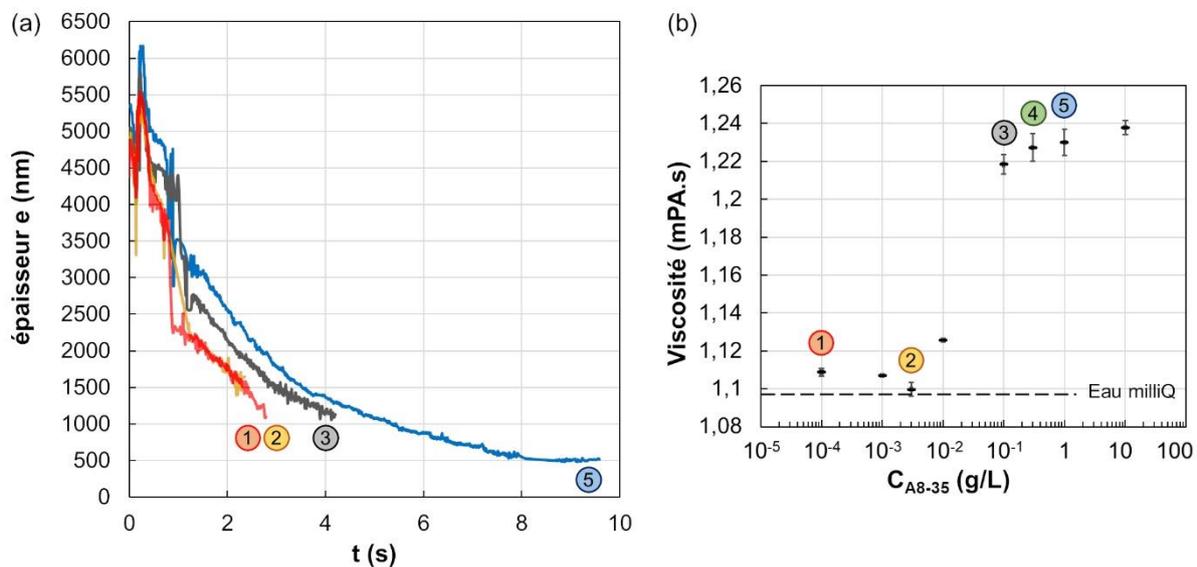


Figure 1.2.5. Résultats d'études sur la viscosité et l'amincissement de films de solutions d'A8-35. (a) Cinétiques d'amincissements de films suspendus (montage décrit en **Figure 1.2.3**). Pendant la première seconde de génération de film, la détection des ondes réfléchies (et la mesure d'épaisseur qui en découle) se sont avérées difficiles et peu reproductibles, probablement en raison d'une courbure d'interface, présente à proximité de la surface du réservoir de liquide. Passé ce délai, les courbes obtenues pour une même concentration sont pratiquement superposables. (b) Variation de la viscosité de solutions d'A8-35 sur une gamme de concentrations allant de 10^{-4} à 10 g/L. La viscosité d'un échantillon d'eau milliQ mesurée dans les mêmes conditions a également été reportée. Un grand merci à Laura Wallon, qui a géré l'intégralité de l'étude sur la viscosité.

Les cinétiques d'amincissement de films ont été suivies pour 4 concentrations parmi celles étudiées en cryo-EM, en incluant la concentration seuil, 0,1 g/L, celle proche de la CAC, 0,003 g/L, ainsi que les 2 extrêmes de la gamme, 10^{-4} g/L et 1 g/L (bien que la concentration la plus élevée testée sur grille de cryo-EM soit de 3 g/L, il a semblé plus pertinent de se limiter à 1 g/L, pour laquelle une distribution de temps de vie était accessible). Les résultats montrent des vitesses d'amincissement identiques pour les 2 concentrations les plus faibles, 10^{-4} et 0,003 g/L. Le passage à 0,1 g/L marque un ralentissement significatif de l'amincissement (films faisant encore $2,10 \pm 0,04$ μm d'épaisseur après 2 s, contre $1,75 \pm 0,12$ μm aux concentrations inférieures), encore accrue pour la concentration la plus élevée, 1 g/L (films de $2,51 \pm 0,05$ μm d'épaisseur après 2 s). Pour les films suspendus verticaux, les principaux facteurs jouant sur l'amincissement sont l'évaporation et l'écoulement du liquide composant le film, ou drainage. Compte-tenu des conditions expérimentales (environnement saturé en humidité), l'évaporation est négligeable : les cinétiques d'amincissement en **Figure 1.2.5 (a)** indiquent donc un ralentissement de l'écoulement au sein des films avec la concentration en polymère.

Dans la situation présente, l'hypothèse la plus plausible était de considérer une augmentation de la viscosité : le phénomène est courant lors du travail avec des polymères en solution⁸⁷, et peut constituer un frein majeur aux écoulements de manière générale. Cette hypothèse a été testée via mesure de viscosité sur une gamme de solutions d'A8-35, présentée en **Figure 1.2.5 (b)**. On y observe une faible viscosité, très proche de celle de l'eau, pour les solutions peu concentrées. La viscosité commence à augmenter pour les concentrations strictement supérieures à 0,003 g/L, soit au niveau de la CAC de l'A8-35. Toutefois, l'augmentation reste de faible amplitude, la plus forte viscosité mesurée n'étant supérieure à celle de l'eau que de 12,8 %, et la différence entre les solutions à 0,1 et 1 g/L est peu significative. Sur la base de ces éléments, il semble clair que la contribution de la viscosité n'est pas à écarter entièrement, mais que ce n'est pas le facteur unique ou principal expliquant les différences de drainage observées auparavant.

D'autres phénomènes, notamment l'effet Marangoni, seraient de bonnes pistes alternatives pour expliquer le ralentissement du drainage : dans les grandes lignes, il s'agit d'un phénomène d'écoulement provoqué par un gradient de tension de surface. Dans le cas des films suspendus verticaux contenant des tensioactifs, un tel gradient est généré par l'écoulement gravitaire du liquide composant le film : l'écoulement généré par effet Marangoni est alors opposé à l'écoulement gravitaire, ralentissant le drainage. Ces considérations pourraient s'appliquer au dispositif présent, incluant un film centimétrique en contact avec un important réservoir de liquide. Elles ont toutefois semblé peu propices à un parallèle avec les phénomènes observés sur grilles de cryo-EM, où le réservoir de liquide est supprimé lors de l'épongeage, et où la taille caractéristique des films est de l'ordre du μm . Si la tension de surface n'a pas été utilisée ici pour la description des phénomènes de drainage, elle n'en reste pas moins un des ingrédients de choix dans la stabilisation de films minces, ce qui en a fait le prochain paramètre étudié.

2.1.3. Résumé : films liquides suspendus

Les mesures de temps de vie des films ont mis en évidence une concentration seuil, 0,1 g/L, au-delà de laquelle la stabilité des films augmente rapidement. Ce seuil correspond bien avec les observations de cryo-EM, notamment l'augmentation de la proportion de films intacts à 0,3 g/L et au-delà (**Figure 1.1.7 (b)**). Toutefois, ces seules considérations sont insuffisantes pour expliquer le reste des observations : proportions de trous vides/films intacts similaires pour les concentrations entre 10^{-4} et 0,1 g/L, alors que le temps de vie des films est triplé sur la même plage de concentrations ; gain de reproductibilité et affinage des distributions aux fortes concentrations, alors que l'amincissement des films verticaux est ralenti par l'augmentation de la concentration. Une étude dirigée sur la tension de surface a donc été amorcée, afin de compléter la compréhension actuelle du système.

2.2. Mesures de tension de surface

La tension de surface, notée γ , aussi appelée tension interfaciale ou tension superficielle, est une valeur reflétant l'énergie nécessaire à la création et au maintien d'une interface. Dans le cas d'une interface air/eau, coûteuse en énergie, la tension de surface est abaissée par l'adsorption de tensioactifs, qui exposent leurs domaines hydrophiles et hydrophobes côté eau et air, respectivement. La tension de surface constitue ainsi un ressort classique et puissant pour étudier le comportement de tensioactifs en solution. L'objectif initial de cette étude était de reproduire des études antérieures sur la tension de surface de l'A8-35 en solution⁶⁵, en adaptant la gamme de concentration à celle utilisée lors de l'analyse de grilles de cryo-EM. Le parallèle effectué avec la cryo-EM a ensuite conduit à orienter la réflexion et les interprétations vers les variations de tension de surface aux temps courts. Cette étude a été effectuée en collaboration avec l'équipe Mmoi du LPS Orsay, avec l'aide plus particulière et très appréciée d'Anniina Salonen.

2.2.1. Dispositif expérimental : TRACKER

Les mesures de tension de surface ont été effectuées avec un appareil TRACKER, commercialisé par Teclis Scientifique. Cet appareil permet la mesure de tension d'une interface liquide/gaz ou liquide/liquide via génération d'une goutte ou bulle de volume contrôlé, puis analyse de son profil⁸⁸ (**Figure 1.2.6**).

Toutes les mesures de tension de surface ont été effectuées en géométrie bulle montante, avec formation d'une bulle d'air dans une cuve en verre contenant 25 mL de solution de tensioactif. Le nettoyage de la cuve et de la seringue a été fait par immersion pendant 10 min dans une solution chaude de Deconex 22LIQ-x, diluée environ 20 fois. Chaque pièce a ensuite été rincée intensivement à l'eau milliQ et séchée sous flux d'air. Le bon nettoyage et l'absence de tensioactif résiduel a été testé avant chaque expérience en vérifiant la valeur et la stabilité de la tension de surface d'une bulle d'air dans un bain d'eau milliQ (72,8 mN/m à 20°C). Pour chaque solution étudiée, les mesures ont été précédées de l'expulsion automatique de 2 bulles, afin de garantir l'étude d'une interface air/eau neuve et fraîche. La variation de tension à l'interface d'une bulle de 5 μ L a ensuite été suivie en direct avec le logiciel constructeur. En raison de la durée des analyses, la cuve a systématiquement été couverte, de manière à limiter l'évaporation et empêcher l'éventuelle contamination des solutions.

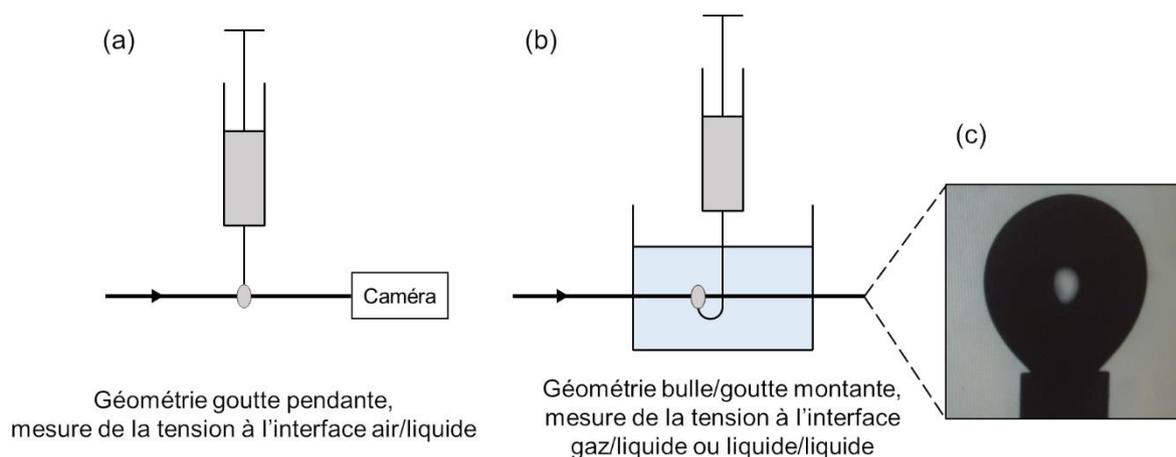


Figure 1.2.6. Illustration du dispositif Tracker, utilisé pour la mesure de tension de surface. En fonction du type d'interface étudié, une disposition (a) goutte pendante, où la seringue contient le liquide d'intérêt, ou (b) bulle/goutte montante, où un gaz/liquide est injecté dans une cuve remplie d'un liquide de densité supérieure, peut être adoptée. L'imagerie du profil de la goutte ou de la bulle, illustrée en (c), permet d'appliquer un rétrocontrôle sur le volume, ainsi qu'un calcul en direct de la tension de surface, basé sur l'équation de Young-Laplace.

2.2.2. Résultats et discussion : tension à l'équilibre et aux temps courts

Un paramètre classiquement regardé lors de mesures de tension de surface est la variation de la tension de surface à l'équilibre, $\gamma_{\text{éq}}$. $\gamma_{\text{éq}}$ reflète la couverture de l'interface à un temps infini, et est corrélé à la concentration de tensioactif en solution. En particulier, la variation de $\gamma_{\text{éq}}$ peut être utilisée pour estimer la CMC/CAC d'un détergent/polymère : sous la concentration critique, une augmentation de la concentration de tensioactif favorise son adsorption à l'interface air/eau, augmentant le degré de couverture à l'équilibre, diminuant ainsi $\gamma_{\text{éq}}$; au-dessus de la concentration critique, la concentration de tensioactif isolé est fixe et maximale, une augmentation de la concentration globale n'engendre qu'un accroissement de l'association sous forme de micelles ou d'agrégats. Le dépassement de la concentration critique est ainsi marqué par un plateau de $\gamma_{\text{éq}}$. L'étude de la tension de surface de solutions d'A8-35, présentée en **Figure 1.2.7**, a ainsi débutée avec une tentative de mesure de variation de $\gamma_{\text{éq}}$.

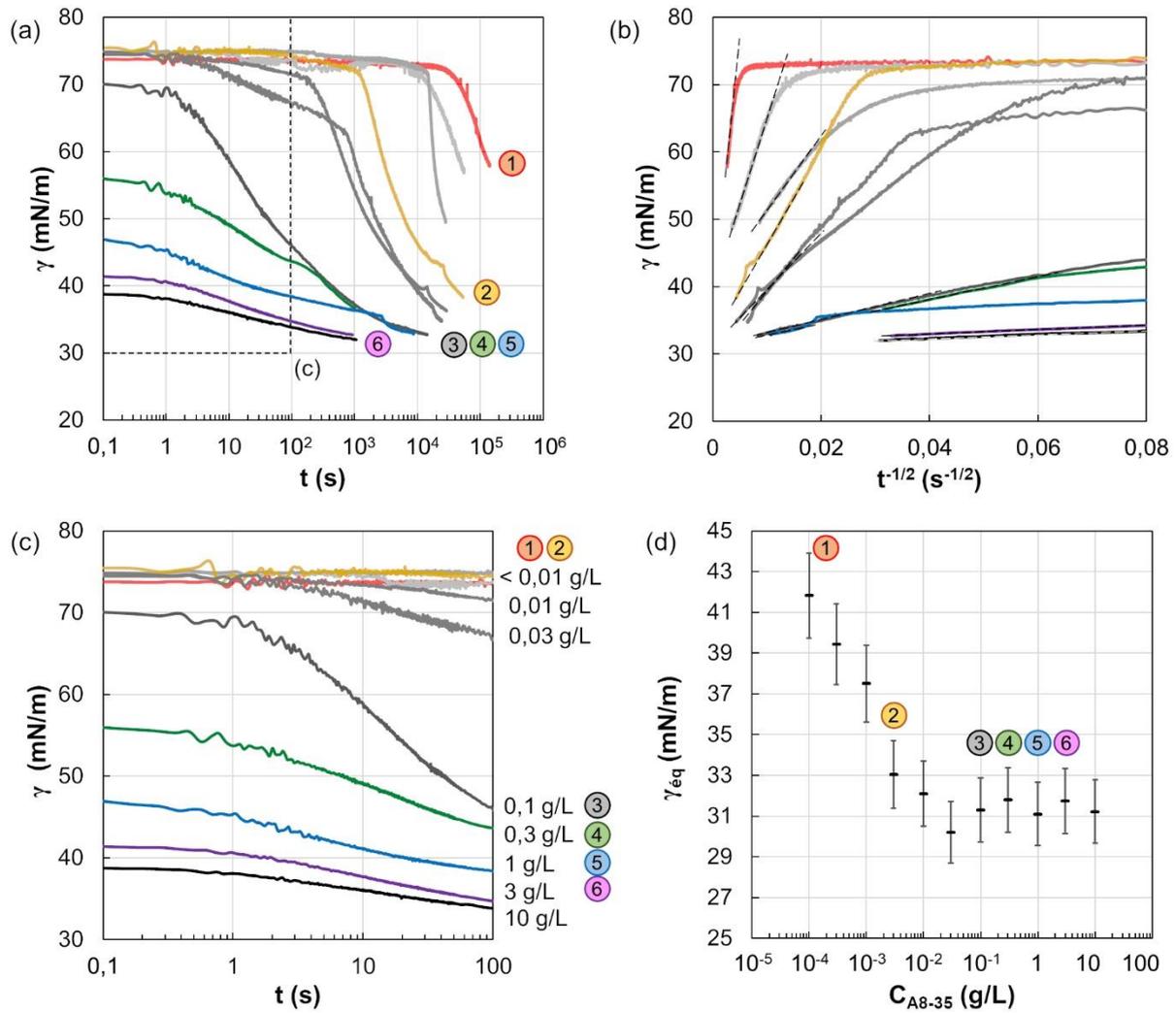


Figure 1.2.7. Etude de la variation de tension de surface air/eau pour une gamme de solutions d'A8-35. (a) Variation de la tension de surface en fonction du temps. (b) Focalisation sur les temps longs, avec retraçage des courbes en fonction de $t^{-1/2}$: pour t assez grand, la relation entre γ et $t^{-1/2}$ devient affine, permettant l'extrapolation de la tension de surface à l'équilibre ($\gamma_{\text{éq}}$). (c) Agrandissement des courbes de variation de γ aux temps courts. (d) Variation de $\gamma_{\text{éq}}$ avec la concentration en A8-35. Compte-tenu des durées nécessaires pour atteindre des plateaux de tension, les valeurs de $\gamma_{\text{éq}}$ ont été extrapolées à partir du comportement aux temps longs des solutions.

Le suivi temporel de la tension de surface d'une solution contenant l'A8-35 (**Figure 1.2.7 (a)**) a rapidement montré que les temps d'attente pour s'approcher de $\gamma_{\text{éq}}$ seraient trop élevés pour les faibles concentrations (décroissance encore significative de la tension de surface après 40 h de mesure pour la solution à 10^{-4} g/L, par exemple). Ce type de difficulté n'est pas nouveau, et peut être circonvenu en étudiant le comportement asymptotique de la tension de surface aux temps longs. Initialement proposé par Fainerman *et al.*⁸⁹, ce comportement est modélisé par l'équation suivante :

$$\gamma(t)_{t \rightarrow \infty} = \gamma_{\text{éq}} + \frac{RT\Gamma^2}{C} \sqrt{\frac{\pi}{2Dt}} \quad [3]$$

où RT est le coefficient de Boltzmann, C est la concentration de tensioactif, D est le coefficient de diffusion, et Γ est la surface occupée par le tensioactif lorsque l'interface est saturée. Ainsi, pour t assez grand, une relation affine doit être obtenue entre γ et $t^{-1/2}$, qui permet d'extrapoler la valeur de $\gamma_{\text{éq}}$ (ordonnée à l'origine). La variation de γ en fonction de $t^{-1/2}$, permettant de

vérifier l'atteinte du domaine de comportement affine, est présentée en **Figure 1.2.7 (b)**, tandis que la variation avec la concentration des $\gamma_{\text{éq}}$ ainsi extrapolées est présentée en **Figure 1.2.7 (d)**. Ces résultats sont en bonne adéquation avec l'étude réalisée par Giusti *et al.*⁶⁵, pour la détermination de la CAC de l'A8-35, avec un plateau final proche de 31 mN/m et une rupture de pente, indicative de la CAC, entre 10^{-3} et 10^{-2} g/L. Bien que la capacité à reproduire des résultats de la littérature soit intrinsèquement un bon motif de réjouissance, les résultats en eux-mêmes confirment l'un des points soulevés dans l'étude cryo-EM : le changement des propriétés de glace sur grille de cryo-EM s'opère entre 0,1 et 0,3 g/L, sensiblement au-dessus de la CAC de l'A8-35. En raison de l'absence de variation de $\gamma_{\text{éq}}$ dans cette gamme de concentrations, ni la tension de surface à l'équilibre ni la CAC n'apparaissent comme des paramètres pertinents pour l'expliquer. Un autre angle d'approche est néanmoins ressorti, en particulier après visualisation du domaine 'temps courts' de la **Figure 1.2.7 (a)**.

A l'inverse de l'étude de $\gamma_{\text{éq}}$, donnant une indication sur le degré maximal de couverture de l'interface à une concentration donnée, l'étude de la variation de γ aux temps courts va être orientée sur la comparaison des cinétiques d'adsorption sur une interface fraîchement créée. L'idée ici est de faire un parallèle avec la fin de la préparation des grilles de cryo-EM (illustrée en **Figure 1.1.2**) : après application du papier absorbant pour retirer l'excès d'échantillon, la grille est rapidement plongée dans le cryogène. Plus précisément, au moment où le papier est décollé de la grille, une interface air/eau neuve et exempte de tensioactif adsorbé est créée. Par ailleurs, pour la majorité des robots commerciaux de congélation d'échantillon, et notamment pour le Vitrobot IV utilisé pour la préparation des grilles étudiées dans la partie cryo-EM, la durée minimale entre la fin de l'épongeage et la plongée dans le cryogène est de l'ordre de 1 s⁵⁸. En d'autres termes, seuls les phénomènes d'adsorption sur une interface neuve qui s'opèrent en moins d'une seconde vont pouvoir avoir lieu avant la congélation. Avec cette considération, en regardant les cinétiques de variation de γ aux temps courts, représentées en **Figure 1.2.7 (c)**, deux régimes sont visibles : absence de couverture d'interface pendant la première seconde aux concentrations inférieures à 0,1 g/L ; couverture significative et croissante pendant la première seconde pour les concentrations supérieures à 0,1 g/L. Le cas 0,1 g/L marque la transition entre les deux régimes, avec une diminution nette de γ sur la première minute, qui reste néanmoins de faible amplitude au cours de la première seconde. On retrouve ainsi le même seuil de 0,1 g/L que rencontré précédemment, avec un début d'explication :

- pour toute concentration inférieure ou égale à 0,1 g/L, les cinétiques de couverture d'interface sont trop lentes pour permettre une adsorption de tensioactif avant congélation. La variation de concentration n'impacte donc en rien la stabilité des films.
- pour les concentrations supérieures à 0,1 g/L, une couverture partielle d'interface a le temps de se mettre en place, dont l'ampleur augmente avec la concentration. La présence croissante de tensioactif à l'interface engendre une stabilité accrue des films (déjà observée dans la partie du même nom), diminuant la proportion de trous vides.

Les diminutions de tension de surface observées ouvrent également une piste pour expliquer les 2 phénomènes restants observés sur grille de cryo-EM, à savoir le manque de reproductibilité à faible concentration, et l'affinement des distributions à fortes concentrations : la diminution de γ , indicative d'une diminution du coût en énergie de l'interface, favorise sa déformation. Dans le cas des grilles de cryo-EM, cela signifie qu'un patch de liquide mal épongé pourra plus facilement se déformer / s'étaler en cas de diminution de sa tension de surface. Cette hypothèse expliquerait l'atténuation des hétérogénéités d'épaisseurs et la disparition des patches de glace épaisse observées sur grille pour les fortes concentrations d'A8-35. Afin de vérifier cette hypothèse tout en poursuivant le parallèle avec la cryo-EM, le test du mouillage d'une surface de carbone par des solutions d'A8-35 a donc été mis en place.

2.2.3. Résumé : tension de surface

Le suivi de la variation de tension de surface et l'estimation de sa valeur à l'équilibre a permis de reproduire des résultats de la littérature, et de valider qu'une autre approche était nécessaire pour expliciter les phénomènes observés en cryo-EM. En faisant le parallèle avec la préparation de grilles de cryo-EM, un focus sur les cinétiques de couverture d'interface aux temps courts (≤ 1 s) a été effectué. La concentration de 0,1 g/L a ainsi été remise en évidence, seuil critique en-dessous duquel les cinétiques d'adsorption à l'interface air/eau sont trop lentes pour modifier significativement la couverture d'interface sur un temps caractéristique de l'ordre de la seconde. La variation de tension de surface pouvant également se traduire par une modification des propriétés de mouillage, un test visant à mesurer l'étalement de gouttes de solutions d'A8-35 sur des surfaces de carbone a été mis en place.

2.3. Propriétés de mouillage d'une surface de carbone

La géométrie d'une goutte déposée sur une surface résulte de l'équilibre entre force gravitaire, qui pousse à son étalement, et le coût énergétique lié à la stabilisation des interfaces air/liquide et liquide/solide. Cette géométrie peut être caractérisée à l'aide de l'angle de contact θ , angle entre la surface support et la tangente locale à la surface de goutte, illustré en **Figure 1.2.8** : pour un volume de goutte donné, la valeur de θ est directement liée aux surfaces des interfaces air/liquide et liquide/solide. En particulier, une valeur faible de θ indiquera une importante surface de contact entre le liquide et le support, signe de bonnes propriétés de mouillage. L'objectif de cette étude était de mesurer la variation d'angle de contact de gouttes de solutions d'A8-35 sur des surfaces de carbone, toujours dans une optique de parallèle avec l'analyse des grilles de cryo-EM, qui sont recouvertes d'un fin film de carbone perforé sur lequel sont déposés les échantillons. Cette étude a requis la préparation de surfaces recouvertes de carbone, faites par évaporation sous pression réduite, avec l'aide précieuse et le soutien d'Amélie Leforestier et Jéril Degrouard, avant de procéder aux mesures d'angles de contact, faites en collaboration avec l'équipe Mmoi, et l'aide plus particulière de Laura Wallon.

2.3.1. Dispositifs expérimentaux : préparation de surfaces, profils de gouttes

2.3.1.1. Préparation de surfaces : évaporation de carbone sous pression réduite

Les surfaces recouvertes de carbone ont été préparées par évaporation sur des lamelles de microscope en verre de 24 x 24 mm, avec un appareil Leica EM ACE600. Le dispositif est notamment utilisé pour le dépôt de couches de carbone amorphe, d'épaisseur finement contrôlée, sur grilles de cryo-EM⁹⁰. Son principe consiste à soumettre une source consommable (bâtonnet ou brin) à une série de pulses, chacun entraînant la pulvérisation d'une fine couche de carbone dans la chambre de dépôt. L'homogénéité de la couche est garantie par un travail à pression réduite et la rotation du plateau supportant les surfaces, tandis que l'épaisseur est suivie en direct au cours du dépôt à l'aide d'un cristal de quartz. Dans le cas présent, les surfaces ont été préparées par lots de 6, avec un dépôt d'une couche de $25,5 \pm 5$ nm de carbone, en utilisant une source double brins (changée entre chaque lot), sous pression $< 8,0 \cdot 10^{-5}$ mbar, avec une rotation du plateau à vitesse maximale. Les surfaces ont été stockées individuellement et à plat dans des boîtes de Petri recouvertes de parafilm, de manière à éviter la détérioration ou la contamination du dépôt de carbone, et utilisées moins de 8 h après leur préparation.

2.3.1.2. Dépôt et analyse de profils de gouttes : DSA25E

Les propriétés de mouillage d'une surface de carbone ont été mesurées à l'aide d'un dispositif DSA25E (Drop Shape Analyzer), commercialisé par Krüss Scientifique. L'appareil est composé d'un plateau mobile en x-y, supportant la surface étudiée, d'un porte-seringue motorisé, permettant de former une goutte de volume contrôlé et de la déposer sur la surface, et d'un dispositif d'imagerie, servant au contrôle du dépôt et à l'analyse du profil de goutte. Son utilisation pour estimer les variations de propriétés de mouillage est illustré en **Figure 1.2.8**.

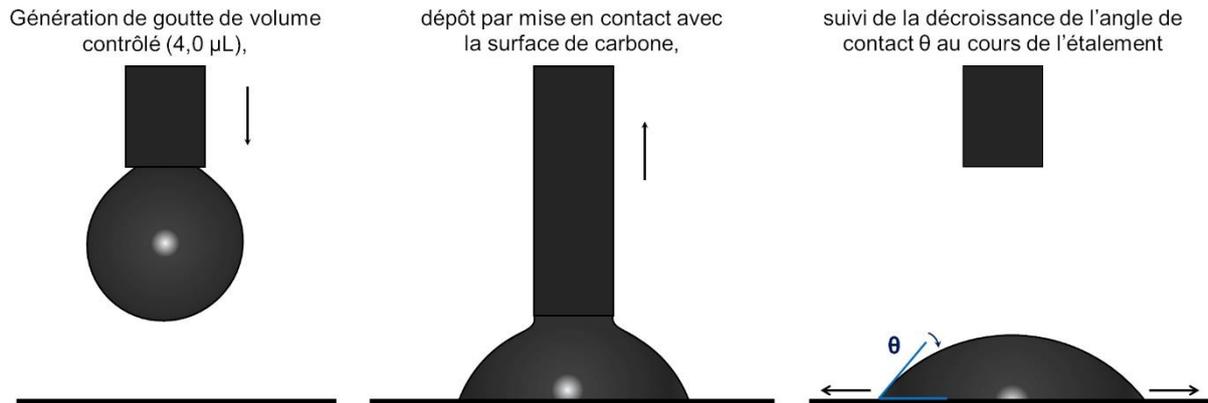


Figure 1.2.8. Illustration du principe d'analyse des propriétés de mouillage. Post-dépôt, l'imagerie du profil de goutte permet de mesurer l'angle θ entre la surface de carbone et la tangente à la surface de goutte, qui va décroître avec l'étalement.

La seringue et son embout ont été intensivement lavées à l'eau milliQ à chaque changement de solution. Les surfaces de carbone s'étant révélées trop fragiles pour supporter un nettoyage sérieux, elles ont été changées entre chaque mesure. A chaque changement de lot de surfaces, la qualité de la couche de carbone a été testée sur l'une des surfaces via dépôt d'une goutte d'eau milliQ et suivi de son étalement. Pour chaque solution étudiée, 3 cinétiques d'étalement ont été acquises puis moyennées. L'intégralité du traitement d'image a été effectué à l'aide du logiciel constructeur, ADVANCE.

Remarque : en premier lieu, l'objectif était de comparer la différence d'affinité de solutions de tensioactifs pour les surfaces de carbone via une mesure statique d'angle de contact. L'hypothèse était que le profil serait stable dans le temps, avec une goutte plus ou moins aplatie en fonction de la concentration en tensioactif. Les observations issues de ces expériences ont montré qu'il n'était pas possible d'exploiter directement des angles de contact à partir de gouttes stables (variabilité significative des angles mesurés dans le temps), mettant rapidement en évidence l'importance d'opter pour des considérations cinétiques, les variations de profil de goutte étant détectables à l'œil nu.

Limites de la technique : la formation de gouttes stables et l'analyse de leur profil fonctionnent parfaitement à faible ou moyenne concentration de tensioactif. En cas de concentration trop élevée, l'étalement rapide des gouttes peut compromettre la mesure d'angle de contact, notamment lorsque l'angle devient très faible et/ou lorsque les bords de la goutte sortent du champ de la caméra. Par ailleurs, les gouttes formées peuvent commencer à mouiller et remonter le long de l'embout de la seringue (conséquence directe de la diminution de tension de surface des dites gouttes). Il est alors nécessaire de reprendre le dépôt à zéro et de nettoyer l'embout de manière intensive : des traces résiduelles de tensioactifs sur l'extérieur de l'embout favorise la répétition de mouillages, et l'occurrence d'un mouillage compromet

fortement le bon contrôle du volume de liquide déposé, une fraction non-négligeable du liquide restant sur l'embout. Outre un nettoyage ou changement régulier de l'embout, la meilleure manière d'éviter ces mouillages indésirables reste de procéder rapidement au dépôt dès que la goutte a été formée.

2.3.2. Résultats et discussion : cinétiques de mouillage du carbone

Les cinétiques d'étalement de gouttes de solutions d'A8-35, suivies via les mesures d'angle de contact, sont présentées en **Figure 1.2.9**.

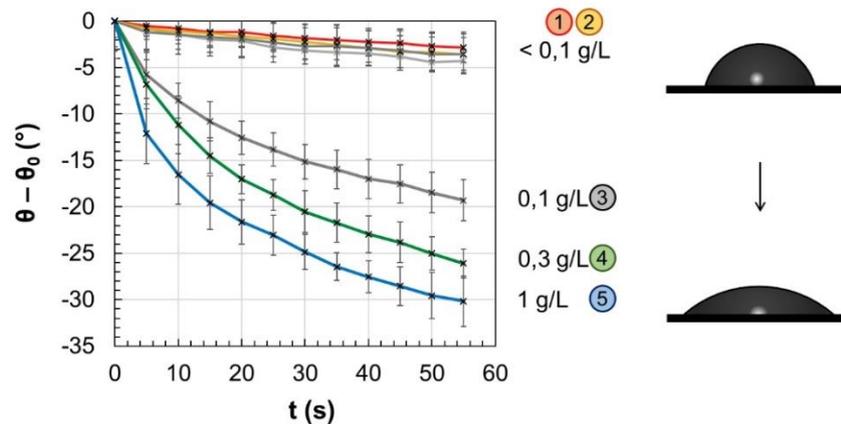


Figure 1.2.9. Cinétiques d'étalement de solutions d'A8-35 sur une surface de carbone. Pour chaque condition, la différence entre l'angle de contact initial θ_0 et l'angle θ mesuré au cours de l'étalement a été reportée. Les courbes représentées résultent du moyennage de 3 cinétiques.

Aucune différence significative n'a été observée pour les concentrations strictement inférieures à 0,1 g/L, avec une diminution lente et reproductible de θ . La cinétique d'étalement s'accélère à partir de 0,1 g/L, faisant de nouveau ressortir cette concentration comme seuil. L'augmentation de la concentration d'A8-35 au-delà de 0,1 g/L continue d'accroître les vitesses d'étalement, et rend plus complexe le bon contrôle et la bonne reproduction des expériences. Ces résultats sont a priori à mettre en parallèle avec ceux des variations de tension de surface aux temps courts (**Figure 1.2.7**) : l'étalement est favorisé lorsque la concentration en A8-35 est suffisamment importante ($\geq 0,1$ g/L) pour permettre une diminution significative de la tension de surface sur la gamme de temps considéré (ici de l'ordre de la minute) ; l'abaissement de tension de surface réduit alors le coût en énergie lié à l'augmentation de superficie de l'interface air/eau qui se produit au cours de l'étalement. Néanmoins, le paramètre de la tension de surface n'étant pas le seul impliqué dans la description du comportement d'une goutte sur une surface, il n'est pas à exclure que cette très bonne concordance entre les mesures de tension de surface et les cinétiques d'étalement soit une particularité des solutions d'A8-35 plus qu'un comportement généralisable.

Du point de vue de la comparaison avec les comportements observés sur grilles de cryo-EM, il est nécessaire de se cantonner à une description qualitative. Bien que l'on ait, dans les deux cas, étalement d'une solution d'A8-35 sur surface de carbone, les différences restent nombreuses et non-négligeables, avec notamment : facteur de l'ordre de 10^8 entre le volume d'une goutte de 4,0 μL et celui d'un patch de glace observé sur grille de cryo-EM ; différence dans le pattern de surface, uniforme vs percée de trous ; et différence dans l'historique de mouillage, goutte sur surface sèche vs sur une surface mouillée de laquelle l'excès de liquide a été absorbé. Ceci étant dit, les observations faites sur les cinétiques d'étalement suffisent pour proposer une explication des comportements observés sur grilles, plus particulièrement des distributions d'épaisseurs (**Figure 1.1.7 (c-h)**) :

- pour les concentrations inférieures ou égales 0,1 g/L, la lenteur des cinétiques compromet toute forme d'étalement avant congélation : on obtient ainsi des distributions inhomogènes et non-reproductibles, a priori représentatives de la distribution de liquide sur la grille après décollement des papiers absorbants.
- à 0,3 g/L, les cinétiques commencent à être suffisamment rapides pour permettre un étalement partiel avant congélation : les plus gros patches de liquides résiduels ne sont pas encore complètement étalés, conduisant à la large gamme de films épais ; en parallèle, le mode de films fins commence à émerger, indicatif d'un étalement complet sur une partie de la grille.
- à 1 g/L et au-delà, les cinétiques d'étalement sont assez rapides : l'affinement des distributions d'épaisseur résulte d'un étalement quasi-complet avant congélation, qui conduit à une couche de glace uniforme, d'où le mode unique de films fins obtenu à ces concentrations.

2.4. Résumé : solutions d'A8-35, cryo-EM vs analyses physico-chimiques

L'étude du comportement de solutions d'A8-35 sur grilles de cryo-EM a souligné le rôle important joué par la concentration de polymère : en-dessous d'une concentration seuil, proche de 0,1 g/L avec les conditions expérimentales de cette étude, la proportion de trous exploitables est faible, et la reproductibilité dans la distribution d'épaisseur de glace est inexistante ; au-delà du seuil de 0,1 g/L, une stabilité accrue des films est obtenue, en parallèle avec une amélioration significative de la reproductibilité, ainsi qu'un affinement des distributions d'épaisseurs dans le cas des concentrations les plus élevées. Afin de proposer des pistes d'explication, une série d'analyses physico-chimiques a été effectuée sur des gammes de solutions d'A8-35, portant notamment sur la stabilité de films, les variations de tension de surface et les cinétiques d'étalement sur carbone. Chaque approche a permis de retrouver un seuil proche de 0,1 g/L, en apportant des éléments de compréhension complémentaires et cohérents.

Dans l'état actuel, les hypothèses retenues se basent essentiellement sur des considérations cinétiques : le mode opératoire pour la préparation de grilles ne laisse qu'un intervalle de temps de l'ordre de la seconde pour la mise en place de phénomènes physiques. Sous la concentration seuil, les cinétiques d'étalement de liquide et de couverture d'interface air/eau sont trop lentes pour avoir un effet significatif avant congélation, conduisant à des comportements similaires indépendants de la concentration. Au-delà du seuil, la couverture d'interface est assez rapide pour permettre une augmentation de la stabilité des films, en cohérence avec les tests centrés sur la stabilité. Par ailleurs, les cinétiques d'étalement deviennent suffisantes pour aplanir les patches de liquide résiduels avant congélation, conduisant à l'affinement des distributions d'épaisseurs.

Arrivé à ce stade, une paire de tentatives pour étayer ces hypothèses et en tirer des applications concrètes a été initiée. Dans un premier temps, un parallèle a été fait avec un détergent classiquement utilisé en cryo-EM, le n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) : la même série d'analyses physico-chimiques que précédemment a été effectuée sur une gamme de solutions de DDM, et les résultats obtenus ont été utilisés pour estimer la plage de concentrations d'intérêt pour la préparation de grilles en cryo-EM. Dans un second temps, la compréhension actuelle du comportement de l'A8-35 sur grille a été mise à contribution pour réitérer et améliorer l'étude structurale en amphipol d'une protéine membranaire modèle, le récepteur pentamérique m5-HT_{3A}.

3. Mises en application : DDM, m5-HT_{3A}

3.1. Etude comparative d'un détergent de référence, le DDM

Le DDM est un détergent de la famille des maltosides, la 2^e famille de détergents la plus représentée dans l'étude structurale en cryo-EM des protéines membranaires, parmi l'intégralité des tensioactifs utilisés à l'étape de vitrification des échantillons¹⁶. Ses propriétés en termes de formule, de masse molaire (510,6 g/mol), de CMC (0,17 mM dans l'eau milliQ), et de potentiel pour l'étude des protéines membranaires étaient déjà connues et décrites en 1986⁹¹. En plus d'être un détergent de référence en biochimie et en biologie structurale des protéines membranaires, le DDM présentait l'avantage pour notre étude de contraster fortement avec l'A8-35 : passage d'un polymère chargé comportant des chaînes alkyl multiples à un détergent neutre à chaîne simple et de masse molaire 10 fois inférieure. Une comparaison avec le DDM a ainsi été initiée, afin de tester la validité des hypothèses pour expliquer les caractéristiques de grilles de cryo-EM, ainsi que leur extension potentielle à des tensioactifs autres que l'A8-35.

Sur la base des observations effectuées lors de l'étude des solutions d'A8-35, la logique suivie pour l'étude des solutions de DDM a été inversée : dans un premier temps, la gamme de solutions a été soumise à la série d'analyses physico-chimiques ; les résultats obtenus ont ensuite été utilisés pour déterminer la paire de concentrations hypothétique délimitant la plage d'intérêt pour la préparation de grilles de cryo-EM. Toute cette étude a été menée de nouveau en collaboration avec les équipes Mmoi et SOBIO du LPS Orsay, dont la patience et la bienveillance n'auront jamais failli :)

3.1.1. Matériel et méthodes : analyses physico-chimiques, étude cryo-EM

Toutes les techniques d'analyses physico-chimiques présentées en **Section 2** ont été réemployées sans modifications pour l'étude menée sur le DDM.

Les paramètres utilisés pour la préparation de grilles de cryo-EM et leur imagerie, détaillés en **Section 1**, ont également été conservés. Pour les premières grilles, une corrélation entre mesures précises d'épaisseur de glace, calculées via acquisition de paires stéréo, et les intensités moyennes associées, mesurées en faible grandissement, a été réitérée. Ces mesures ont été incluses dans le tracé de la courbe de calibration présentée en **Figure 1.1.6**, après vérification de leur adéquation avec celles effectuées sur les grilles d'A8-35. La caractérisation de grilles a ainsi été effectuée avec les mêmes modalités que pour l'A8-35 : préparation de 3 grilles par concentration, acquisition d'un set d'images de faible grandissement pour chaque grille, quantification de la proportion de chaque type de trous, estimation des épaisseurs de glace à partir des intensités moyennes mesurées, et tracé des distributions d'épaisseur.

3.1.2. Résultats et discussion

3.1.2.1. Analyses physico-chimiques de solutions de DDM

Les résultats des analyses physico-chimiques menées sur les solutions de DDM sont présentées en **Figure 1.3.1**.

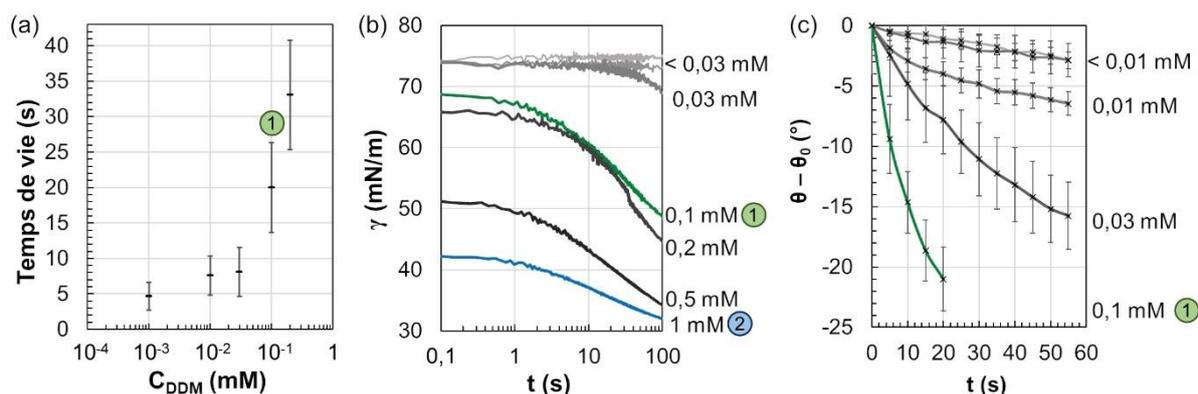


Figure 1.3.1. Résultats des analyses physico-chimiques menées sur une gamme de solutions de DDM. (a) Variation du temps de vie moyen de films liquides verticaux, générés via le montage de tirage de films. (b) Variation de la tension de surface aux temps courts. (c) Variation des cinétiques d'étalement sur surface de carbone.

De manière intéressante, les variations de comportement observées pour le DDM font ressortir une plage de concentrations plutôt qu'une unique valeur seuil. D'un point de vue stabilité de films, le temps de vie moyen commence à augmenter sensiblement entre 0,03 et 0,1 mM (**Figure 1.3.1 (a)**). En se focalisant sur les cinétiques de couverture d'interface air/eau (**Figure 1.3.1 (b)**), la condition 0,1 mM peut être retrouvée : elle marque le début des cinétiques suffisamment rapides pour permettre une couverture partielle d'interface lors de la première seconde. Toutefois, cette même concentration correspond également à une cinétique d'étalement sur carbone trop rapide pour être suivie sur plus de 20 s (**Figure 1.3.1 (c)**). Ce dernier point est particulièrement important à souligner : les cinétiques d'abaissement de tension de surface air/eau et d'étalement sur surface de carbone peuvent être significativement moins corrélées que ce que l'étude sur l'A8-35 pouvait laisser présupposer.

L'étude sur le DDM fait ressortir une autre différence majeure : conformément aux prévisions initiales, et contrairement au comportement de l'A8-35, les transitions de comportement sont observées à des concentrations proches de la CMC, voir inférieures. Pour les détergents, l'atteinte de la CMC marque l'atteinte d'un plateau de concentration en monomères libres, qui va de paire avec le début de formation de micelles. Par ailleurs, les micelles ne sont pas figées une fois formées, leurs composants continuant à être en équilibre dynamique et en échange rapide avec le reste des monomères. Un détergent bénéficiera ainsi d'une importante mobilité et disponibilité pour aller aux interfaces/interagir avec d'autre entités. Pour l'A8-35, une légère différence de comportement a été reportée. La structure de l'A8-35 résulte du greffage de chaînes alkyl, hydrophobes, sur un squelette d'acide polyacrylique, hydrophile dans la gamme de pH qui garantit la non-protonation des fonctions carboxylates⁶³. La densité de chaînes, couplée à la faible longueur du squelette polymère, ne permet pas à une molécule unique de se replier suffisamment autour d'un cœur hydrophobe et n'exposer que son domaine hydrophile. En résulte une auto-association en agrégats de 9-10 polymères en moyenne, conceptuellement semblables à des micelles, lorsque la CAC est atteinte ou dépassée^{64,65,92}. Ces assemblages, toutefois, sont notablement moins dynamiques que des micelles, avec des intervalles de temps entre les échanges allant de quelques minutes à plusieurs heures, en fonction de la force ionique⁹³. Ainsi, la concentration seuil nettement supérieure à la CAC obtenue pour l'A8-35 pourrait découler de la faible disponibilité des polymères compris dans les agrégats, justifiant la nécessité d'atteindre des concentrations élevées d'agrégats pour permettre l'occurrence d'échanges sur des temps caractéristiques de quelques secondes.

Résumé

Les caractérisations physico-chimiques de solutions de DDM présentées ici mettent en évidence une concentration seuil pour la stabilité de films et la cinétique de couverture d'interface air/eau, proche de 0,1 mM, mais cette concentration correspond à une cinétique déjà très rapide d'étalement sur carbone, plutôt qu'à la transition entre cinétique négligeable et cinétique rapide comme observé dans le cas de l'analyse des solutions d'A8-35. La réflexion dans le choix des concentrations de DDM à tester pour la préparation des grilles de cryo-EM avait pour objectif d'estimer une gamme pertinente tant d'un point de vue biochimique que physico-chimique pour garantir, sur la base de nos précédents résultats, la qualité de la glace (proportion importante de films exploitables, reproductibilité des distributions d'épaisseurs). Les choix de concentrations ont été effectués à partir des réflexions suivantes :

- après analyse de l'ensemble des tensioactifs utilisés au moment de la vitrification des protéines membranaires sur grilles de cryo-EM, les concentrations en DDM les plus fréquemment utilisées sont apparues comme étant 0,5 mM et 1 mM (26,3 % et 34,7 % des occurrences, respectivement, ces deux conditions englobant ainsi plus de 60 % des cas où le DDM a été utilisé).

- dans le cas de notre étude physico-chimique, une borne inférieure à 0,1 mM (c'est-à-dire sous la CMC) a été mise en évidence, avec une diminution du temps de vie des films et des cinétiques de couverture d'interface. En parallèle, l'analyse des tensioactifs utilisés en cryo-EM a révélé que le DDM n'était que très rarement utilisé à des concentrations inférieures à 0,1 mM (2,1 % des occurrences). La condition de 0,1 mM a ainsi été retenue, d'une part parce que se placer en-dessous aurait risqué de trop limiter la quantité de films exploitables, et d'autre part parce que la cinétique d'étalement rapide sur carbone était particulièrement adéquate pour tester la pertinence de ce paramètre en tant qu'explication pour l'affinement des distributions d'épaisseurs.

- sur le plan borne supérieure, le principal facteur limitant observé au cours de l'étude présente à forte concentration de tensioactif réside dans la finesse excessive des films de cryo-EM. Dans le cadre des caractérisations effectuées, cette finesse est une cause actuellement attribuée à une fragilisation des films post-congélation. Dans le cadre d'études structurales, elle pourrait également entraîner une exclusion de la macromolécule étudiée du centre du film, si les tailles deviennent trop proches. La condition à 1 mM (5,9 fois la CMC) a été retenue principalement pour tester la pertinence des arguments sur le temps de vie et la cinétique de couverture d'interface en tant qu'explication de l'augmentation de la proportion de films exploitables sur grille. Cette concentration avait également le bon goût d'être celle la plus souvent utilisée lors d'études structurales en cryo-EM impliquant du DDM. L'autre concentration sérieusement envisagée, 0,5 mM, a finalement été écartée afin de se placer dans une condition de stabilité maximale des films liquides, quitte à voir émerger une fragilisation des films post-congélation.

A ce stade, si plus de conditions avaient pu être testées, l'ordre de priorité aurait été le suivant :

- 0,01 mM. Avec le faible temps de vie de films et les cinétiques lentes, cette concentration aurait permis de tester si ces arguments sont suffisants pour expliquer la forte proportion de trous vides et l'absence de reproductibilité observées pour les faibles concentrations en A8-35.

- un ou deux points de gamme dans l'intervalle [0,1 – 1 mM]. Vu les cinétiques d'étalement sur carbone de la solution à 0,1 mM en DDM, il est peu probable qu'un cas de transition similaire au 0,3 g/L en A8-35 puisse être obtenu. Par contre, ces points permettraient de sonder beaucoup plus finement la dépendance à la concentration de la stabilité des films de cryo-EM, notamment. Sur la base des expériences déjà menées, le plus pragmatique serait de considérer des points à 0,2 et 0,5 mM, choix toutefois à adapter en fonction des caractéristiques de grilles obtenues aux concentrations plus prioritaires.

3.1.2.2. Caractéristiques de grilles de cryo-EM préparées avec des solutions de DDM

Les caractérisations de grilles de cryo-EM, préparées avec des solutions de DDM à 0,1 et 1 mM sur la base des analyses physico-chimiques qui précèdent, sont présentées en **Figure 1.3.2**, tandis qu'une illustration de films rompus pour ces deux concentrations est présentée en **Figure 1.3.3**.

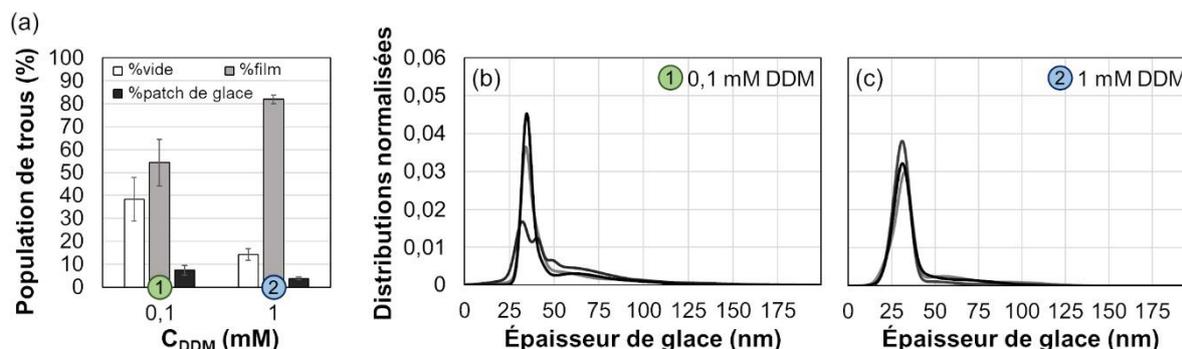


Figure 1.3.2. Résultats de la caractérisation de grilles de cryo-EM préparées à partir de solutions de DDM à 2 concentrations, 0,1 et 1 mM. (a) Variation de la proportion des populations de trous avec la concentration en détergent. (b-c) Distributions d'épaisseurs de glace pour les 2 séries de 3 grilles, préparées respectivement à partir de solutions à 0,1 et 1 mM en DDM.

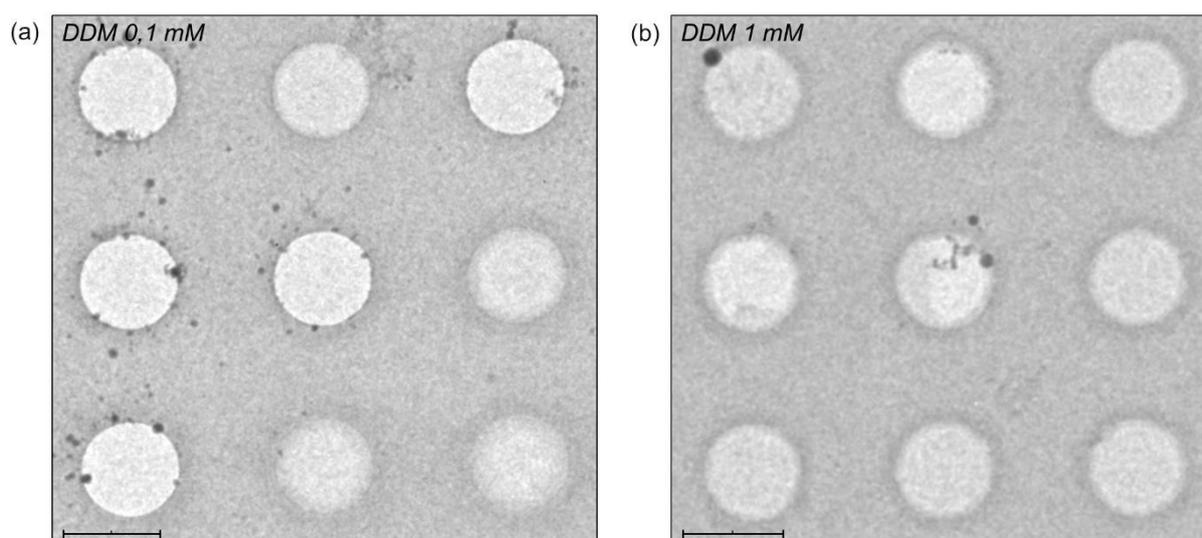


Figure 1.3.3. Nouvelle illustration des différents types de ruptures de films en cryo-EM. Les images présentées résultent de zooms effectués sur des acquisitions à faible grandissement ($\times 500$). Echelle 2 μm . (a) Grille préparée à 0,1 mM en DDM. (b) Grille préparée à 1 mM en DDM. L'équivalent pour l'A8-35 a été présenté en **Section 1.2.2, Figure 1.1.9**.

Les grilles préparées à 1 mM en DDM exhibent un comportement similaire à celui obtenu à fortes concentrations (1 et 3 g/L) en A8-35, avec une importante proportion de films exploitables (de l'ordre de 80 %), une distribution d'épaisseur de glace reproductible, et la présence d'un unique mode de films fins (31 ± 6 nm). Par ailleurs, comme pour les grilles à 3 g/L en A8-35, des films brisés aux contours irréguliers (**Figure 1.3.3**) indiquent l'occurrence de ruptures post-congélation. La condition DDM à 0,1 mM n'a pas d'équivalent aussi directe : la proportion de films exploitables, 54 ± 10 %, présente une importante variabilité en restant comparable à celle obtenue à 0,3 g/L en A8-35 (60 ± 3 %) ; en même temps, les distributions d'épaisseur tendent déjà vers le format monomodal plus caractéristique des fortes

concentrations en A8-35. Ces résultats sont plutôt en bonne adéquation avec les observations à l'origine du choix des concentrations :

- à 0,1 mM en DDM, une stabilité intermédiaire de films est obtenue, en cohérence avec l'évolution du temps de vie moyen des films générés à cette concentration, avec une variabilité potentiellement causée par une cinétique de couverture d'interface encore un peu lente (**Figure 1.3.1 (a) et (b)**). En parallèle, la cinétique rapide d'étalement sur carbone permet aux patches de liquide résiduel de suffisamment s'étaler entre la fin de l'épongeage et la congélation pour que les distributions d'épaisseur soient monomodales.
- augmenter la concentration jusqu'à 1 mM entraîne un accroissement de la stabilité des films liquides, qui conduit à l'obtention d'une forte proportion de film exploitables. Cela entraîne également une diminution de l'épaisseur moyenne des films (35 ± 4 nm à 0,1 mM, contre 31 ± 6 nm à 1 mM), allant de pair avec l'observation de ruptures de films post-congélation, et renforçant l'hypothèse d'une fragilisation de films en cas de finesse excessive.

Résumé : comparaison des comportements du DDM et de l'A8-35

Une série d'hypothèses sur la corrélation entre propriétés physico-chimiques et comportement sur grille de cryo-EM de solutions de tensioactifs a été formulée à partir des études menées sur le polymère A8-35. Ces hypothèses ont été mises à l'épreuve en réalisant une étude sur le détergent DDM. En effet, en partant d'analyses physico-chimiques, le comportement sur grille de solutions de DDM à concentrations données a pu être décentement prévu. Ces mêmes analyses ont permis d'estimer une plage approximative de concentrations de DDM pour obtenir une certaine qualité de grille, sur le plan de la reproductibilité et de la proportion de films exploitables. Bien que cette étude eût pu grandement bénéficier d'analyse sur grille de concentrations supplémentaires (au moins une inférieure à 0,1 mM, et deux dans l'intervalle [0,1 – 1 mM]), elle aura quand même permis de renforcer les hypothèses proposées initialement, et d'envisager leur application à des tensioactifs chimiquement peu semblables. D'autres études complémentaires peuvent toutefois s'avérer souhaitables : en particulier, l'identification d'un paramètre permettant d'estimer la concentration à partir de laquelle l'affinement des films risque de provoquer leur fragilisation serait une belle addition à la compréhension actuelle du système. Cela renforcerait également l'intérêt de toutes ces analyses dans une optique d'application pour des études structurales : proposer des conditions pour avoir théoriquement un grand nombre de trous exploitables et d'épaisseur homogène, c'est pas mal ; ajouter une information sur ladite épaisseur, notamment pour éviter un conflit de taille et une concentration du système observé en bordure de trous, c'est mieux.

3.1.2.3. Amincissements des films verticaux : cas des solutions de DDM

Une dernière série de mesures opérées sur le DDM n'a pas encore été mentionnée : il s'agit de celle centrée sur le suivi de l'amincissement des films verticaux, présentée en **Figure 1.3.4**. Comme pour l'A8-35, un lien direct entre ces suivis d'amincissement et les caractérisations de grilles de cryo-EM n'a pas pu être explicité. Son existence n'est toutefois pas à exclure, et dans tous les cas, les résultats obtenus ont semblé mériter à la fois mention et leur propre discussion.

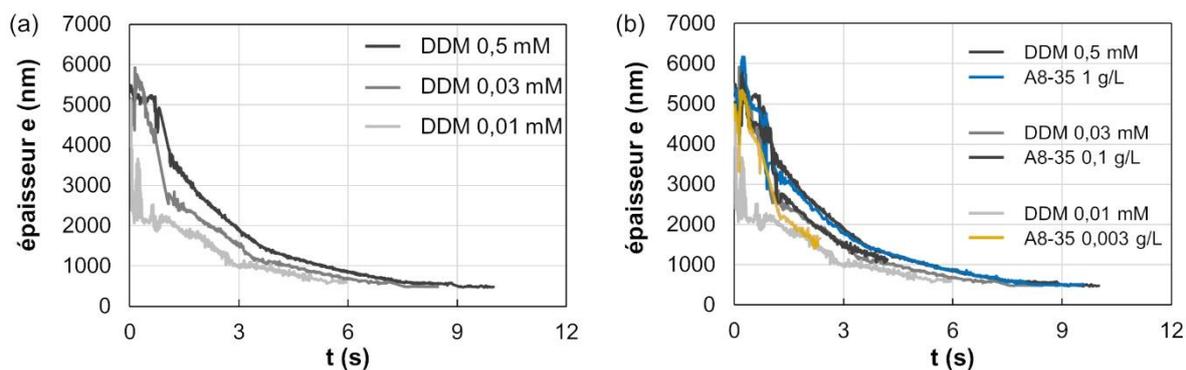


Figure 1.3.4. Cinétiques d'amincissement de films verticaux. (a) Cinétiques pour des films générés à partir de 3 solutions de DDM. (b) Superposition des cinétiques d'amincissement obtenues à partir de solutions de DDM et d'A8-35. De même que lors de l'étude sur l'A8-35, les mesures d'épaisseurs se sont avérées difficiles et peu reproductibles au cours de la première seconde, probablement en raison d'une courbure d'interface coïncidant avec le début de génération du film.

Comme pour l'A8-35, un ralentissement des cinétiques d'amincissement des films suspendus avec l'augmentation de la concentration en DDM peut être observé. En superposant les données obtenues en DDM et en A8-35 (**Figure 1.3.4 (b)**), un recouvrement partiel entre les courbes peut même être observé. Cette superposition souligne notamment qu'à cinétique d'amincissement proche, les films générés à partir de solutions de DDM ont un temps de vie supérieur/peuvent atteindre des épaisseurs plus faibles que ceux générés en A8-35 avant de rompre. La première explication considérée, qui est celle d'une meilleure couverture des interfaces air/eau du film dans le cas du DDM induisant une résilience accrue, entre toutefois en conflit avec les mesures de tension de surface : en prenant l'exemple des solutions de DDM à 0,03 mM et d'A8-35 à 0,1 g/L, la cinétique de couverture d'interface devrait plutôt favoriser la stabilité des films d'A8-35 (en se référant aux mesures de tension de surface en **Figures 1.2.7 (c)** et **1.3.1 (b)** pour l'A8-35 et le DDM, respectivement). La similarité des cinétiques d'amincissement permet d'écarter l'hypothèse d'une augmentation de stabilité ayant pour cause un ralentissement du drainage, que ce soit en raison d'un accroissement de la viscosité ou d'une augmentation des phénomènes de régénération marginale. La piste actuellement privilégiée serait une différence de rigidité d'interface air/eau en fonction du tensioactif adsorbé, DDM ou A8-35, et du degré de couverture. Il est théoriquement possible d'accéder à ce type d'information avec l'appareil TRACKER (**Section 2.2.1**), utilisé pour les mesures de tension de surface. Dans les grandes lignes, ces expériences se feraient avec un volume de bulle variable dans le temps plutôt que fixe : le gonflement/dégonflement de la bulle induit une dilatation/compression de l'interface, avec un temps de réponse dépendant de sa rigidité. Dans le cas des films verticaux, il est possible qu'une rigidité excessive d'interface entraîne une rupture prématurée lors de la génération du film, faute de capacité à se déformer. Toutefois, les expériences pour tester cette hypothèse n'ont à ce jour pas encore passé le stade de projet.

L'autre point d'intérêt soulevé par les cinétiques d'amincissement réside dans la forme des courbes obtenues avec les solutions de DDM : en particulier pour les solutions à 0,01 et 0,03 mM, une rupture de pente nette et reproductible peut être observée environ 3 s après le début de la génération de film (**Figure 1.3.4 (a)**). Ces accoudements peuvent éventuellement marquer la bascule entre 2 modes de ralentissement du drainage, potentiellement résultante d'un confinement des écoulements au sein du film (notamment l'opposition entre écoulement gravitaire et régénération marginale, en remarquant en parallèle que les 2 ruptures de pente les plus visibles se produisent lorsque les films atteignent une épaisseur de l'ordre du μm). Toutefois, des mesures additionnelles seraient nécessaires avant de pouvoir avancer

sérieusement cette idée. En continuant avec le dispositif de tirage de films, l'exploration autour de ce phénomène pourrait se faire avec un élargissement de la gamme de concentrations testées, pour mieux cerner l'impact sur l'épaisseur et le moment auxquels la rupture de pente se produit. Les pentes avant et après accoudement, ainsi que les angles qu'ils forment, pourraient également être pertinents à considérer, compte-tenu de la variation visible en **Figure 1.3.4 (a)**. Quelques tests portant sur la vitesse de génération de films pourraient également être instructifs : jusque-là, tous les films ont été générés à 2 mm/s ; des événements ayant lieu à temps proches se produisent donc également pour des tailles de films proches, ici de l'ordre de 6 mm. Les modifications de vitesse seront toutefois à interpréter avec précaution, compte-tenu du nombre de facteurs potentiellement impactés par ce paramètre (on pourra remonter ici les considérations de rigidité d'interface, dont la réponse dépendra fortement de la fréquence d'excitation). Ici encore, les expériences proposées n'ont pas encore passé le stade de projet. Par ailleurs, vu les points soulevés, il serait probablement légitime (et plus réaliste) de prévoir une campagne de caractérisation spécifiquement dédiée aux phénomènes d'amincissements.

3.2. Etude structurale du récepteur m5-HT_{3A}

3.2.1. Choix de m5-HT_{3A} : test des problématiques d'orientation préférentielle

En cryo-EM, un autre problème couramment rencontré (et pas encore abordé dans les études présentées ci-avant) réside dans la présence même de protéines dans les échantillons. Les protéines, qu'elles soient membranaires ou solubles, peuvent s'adsorber à l'interface air/eau, conduisant à des phénomènes de dénaturation et/ou d'orientation préférentielle. De telles occurrences sont à éviter en raison de la perte d'information qu'elles entraînent : la reconstruction tri-dimensionnelle (3D) d'une protéine se faisant à partir d'observations bi-dimensionnelles (2D) sous autant d'angles que possibles, la prédominance d'une orientation au détriment des autres risque de limiter la résolution finale de la reconstruction. Plusieurs approches ont été développées pour limiter ce problème. L'une d'entre elles consiste à ajouter un détergent à haute CMC dans l'échantillon⁶² : l'objectif est alors d'empêcher l'adsorption des protéines à l'interface air/eau en la couvrant d'une couche protectrice de détergent⁵⁶. Une partie des résultats et interprétations de l'étude sur l'A8-35 portant justement sur les cinétiques de couverture d'interface, une étude des éventuelles propriétés protectrices des amphipols contre l'orientation préférentielle des protéines a été initiée sur une protéine membranaire modèle, le récepteur homomérique de type 3 à la sérotonine de la souris (m5-HT_{3A}).

Le récepteur m5-HT_{3A} appartient à la famille des canaux ioniques pentamériques activés par un ligand. En 2018, sa structure à haute résolution (obtenue entre 3,2 et 4,5 Å selon la conformation du récepteur en présence de différents ligands) a été résolue par cryo-EM, en présence du détergent C₁₂E₉⁹⁴. Le choix de ce récepteur comme système modèle a été largement motivé par l'existence d'une longue recherche des conditions expérimentales pour obtenir des grilles de qualité suffisante permettant de résoudre sa structure. Dans cette étude préliminaire, l'utilisation de l'A8-35 avait été entreprise et un certain nombre de problèmes ont été rapportés⁹⁵. Les sets de données soulignaient en effet un cas d'orientation préférentielle, avec une forte prépondérance des vues de-dessus, couplé à un problème suspecté d'épaisseur excessive de glace, le tout limitant la résolution de la reconstruction 3D à 7 Å. Il est à noter que la dernière étape du protocole de préparation des échantillons impliquait une purification par chromatographie d'exclusion de taille (SEC), garantissant l'absence de polymère libre, i.e. de polymère non-associé au domaine transmembranaire du récepteur. En effet, sur la base des différences de tailles, le passage en SEC sépare les complexes m5-HT_{3A}/A8-35 (~250 kDa rien que pour le récepteur seul) des agrégats

uniquement composés d'A8-35 de taille beaucoup plus faible (~43 kDa)⁶⁴. Cette protéine modèle se prêtait ainsi tout particulièrement à un test de minimisation de l'orientation préférentielle via ajout d'un excès d'A8-35. Cette étude a été menée à l'IBS de Grenoble en collaboration avec Hugues Nury et Uriel López-Sánchez, qui ont admirablement géré la quasi-totalité des expérimentations et analyses associées.

3.2.2. Matériel et méthodes

3.2.2.1. Préparation des échantillons m5-HT_{3A}/A8-35

Le récepteur m5-HT_{3A} a été exprimé et purifié en suivant le protocole publié par Polovinkin *et al.*⁹⁴. Le transfert d'un environnement C₁₂E₉ (détergent utilisé pour la purification du récepteur) vers un environnement A8-35 a été effectué suivant un protocole d'échange standard⁹⁶, tel qu'utilisé dans l'étude préalablement menée du m5-HT_{3A} en amphipol⁹⁵. Les complexes m5-HT_{3A}/A8-35 ainsi obtenus ont été purifiés par SEC, dont le profil est présenté en **Figure 1.3.5**. Cette purification entraîne notamment l'élimination des éventuelles protéines agrégées et contaminants, ainsi que de tout excédent d'agrégats de polymère de petite taille par rapport aux complexes. Après collecte du pic d'éluion contenant les complexes et concentration des échantillons pour atteindre une concentration de 2 ou 5 g/L en m5-HT_{3A}, des volumes choisis de solutions concentrées d'A8-35 ont été ajoutés avant dépôt sur grille de cryo-EM, afin d'atteindre les concentrations voulues de polymère libre, 0,3 g/L et 1 g/L, sur la base des résultats précédemment obtenus en **Sections 1 et 2**.

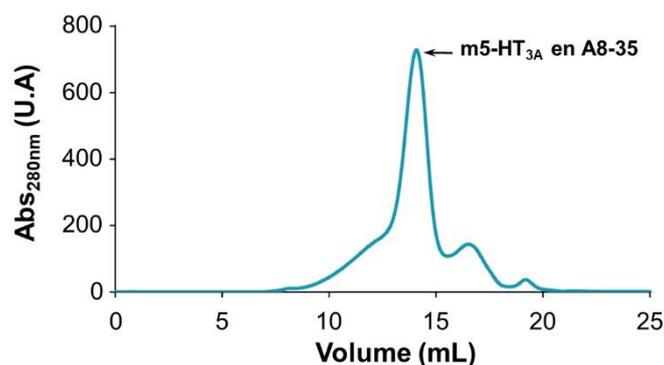


Figure 1.3.5. Profil de purification par SEC des complexes m5-HT_{3A}/A8-35.

3.2.2.2. Cryo-fixation sur grille de cryo-EM, acquisition du set de données

L'analyse cryo-EM du récepteur m5-HT_{3A} par la technique d'analyse des particules isolées a été effectuée en reprenant les paramètres utilisés dans la précédente étude du récepteur m5-HT_{3A} en amphipol⁹⁵, induisant quelques divergences par rapport aux conditions utilisées dans les études sur grille des gammes d'A8-35 et de DDM. Un récapitulatif des paramètres utilisés dans les deux types d'études est fourni en **Table 1.3.1**.

Etudes	Analyse structurale du récepteur m5-HT _{3A} en environnement A8-35	Comportement sur grille de cryo-EM de solutions d'A8-35 et de DDM
Grilles : fournisseur, périodicité, matériaux, mesh	Quantifoil, 1,2/1,3, Cu/Rh, 300	Quantifoil, 2/2, Cu, 200
Glow-discharge	Air, 25 mA, 40 s	Ar, 5 mA, 30 s
Dépôt d'échantillon : robot, volume d'échantillon, température, humidité	Vitrobot Mark IV, 3,0 µL, 6°C, 100%	Vitrobot Mark IV, 3,0 µL, 20°C, 100%
Epongeage : durée, force, attente avant vitrification	10 s, 0, 0,5 s	2 s, 15, minimale

Table 1.3.1. Paramètres expérimentaux pour la préparation des grilles de cryo-EM utilisés dans le cadre de l'étude structurale du récepteur m5-HT_{3A} et dans le cadre la caractérisation sur grilles des gammes de solutions d'A8-35 et de DDM.

Après congélation, les grilles ont été observées sur un microscope électronique Glacios, équipé avec une caméra K2 Summit, commercialisée par Gatan. Les détails sur la collecte et le traitement des données sont fournis en **Table 1.3.2.**

Collecte et traitement des données	m5-HT _{3A} en A8-35
Codes EMDB	EMD-15471
Grandissement	36 000
Voltage (kV)	200
Dose d'électron (e ⁻ /Å ²)	38
Plage de défocus (µm)	-0,8 to -2,5
Taille de pixel (Å)	1,14
Nbr de micrographes	2 515
Nbr initial de particules	537 284
Nbr de vues de particules après classification 2D	169 965
Nbr final de particules	35 020
Symétrie imposée	C5
Résolution de la carte (Å) Seuil FSC	3,4 0,143

Table 1.3.2. Statistiques de la collecte de données effectuée en cryo-EM.

3.2.3. Résultats et discussion : structure de m5-HT_{3A} en amphipol

3.2.3.1. Impact de la concentration d'A8-35 sur la distribution de particules

La série de grilles préparée comprenait 10 grilles, avec des duplicas couvrant 2 conditions pour la concentration en protéine (2 – 5 g/L), pour la concentration d'A8-35 ajouté après purification (0,3 – 1 g/L), ainsi qu'un contrôle sans protéine (préparé à 1 g/L en A8-35). L'observation de l'allure des grilles avant la mise en place de la collecte a immédiatement révélé de fortes inhomogénéités dans la distribution de glace (carreaux entiers inexploitable car recouverts d'une glace épaisse) ainsi qu'un manque de reproductibilité, y compris pour les grilles préparées à 1 g/L en A8-35. Ces différences entre les deux types d'études soulignent probablement l'importance du choix des paramètres de préparation des grilles. Si certaines divergences visibles en **Table 1.3.1** peuvent en partie expliquer l'occurrence de carreaux complets pris dans la glace (force faible pendant l'épongeage, qui peut limiter le contact entre la grille et le papier absorbant ; température basse, qui augmente la viscosité de l'échantillon et peut en gêner l'absorption ; mesh plus grand, donc diminution de la taille des carreaux, qui peut gêner l'accès du papier au réservoir de liquide qu'ils contiennent), d'autres différences seraient au contraire favorables à une limitation des excès de liquide ou à l'inhomogénéité de sa répartition (grande durée d'épongeage ; léger temps d'attente avant congélation, qui augmente la fenêtre temporelle disponible pour que les patches de liquide s'étalent ; accroissement de la durée et de l'intensité du glow-discharge, augmentant les charges de surface et favorisant un mouillage du carbone). Ces modifications de paramètres sont donc assez dommageables : empêchant d'abord la comparaison directe entre les deux types d'études, elles préviennent également une estimation directe de l'impact de la présence de protéines sur les caractéristiques de glace. Décision prise en toute conscience et sans trop de regrets, toutefois : se placer dans des conditions comparables à la dernière étude de m5-HT_{3A} en APol, permettant notamment de sonder un éventuel rôle protecteur de l'A8-35 contre l'orientation préférentiel, contrebalance décemment les quelques désagréments mentionnés.

Une observation plus poussée des grilles, afin d'identifier si l'une d'entre elles pouvait faire l'objet d'une collecte de bonne qualité, a ensuite été menée. L'allure de quelques uns des trous observés est présentée en **Figure 1.3.6**.

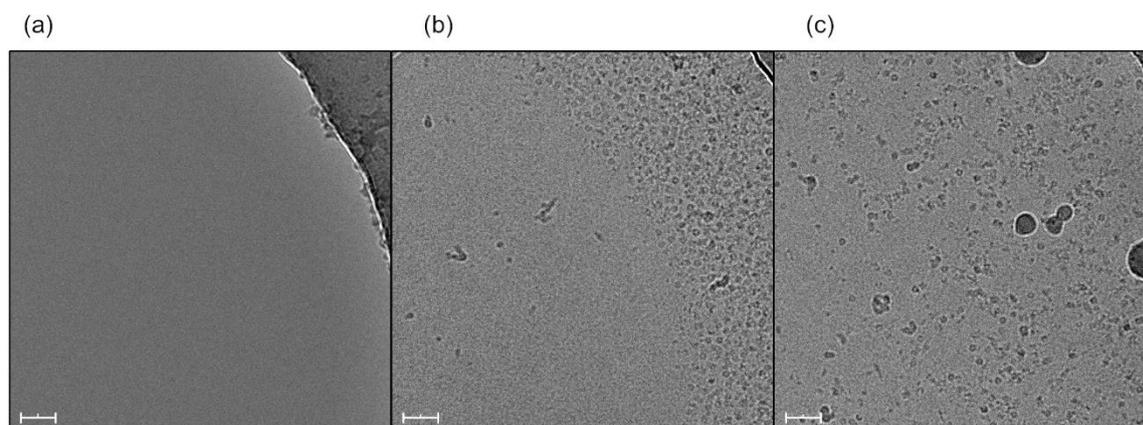


Figure 1.3.6. Exemple d'images acquises sur des grilles préparées à différentes concentrations d'A8-35. (a) Echantillon préparé sans protéine (contrôle), à 1 g/L en A8-35. (b-c) Echantillons de m5-HT_{3A}/A8-35 à 2 g/L en protéine, congelés après ajout d'A8-35 pour atteindre une concentration de polymère en excès de 1 g/L (b) et 0,3 g/L (c). Echelles : 40 nm.

L'échantillon contrôle, contenant 1 g/L d'A8-35 en absence de protéine (**Figure 1.3.6 (a)**), se caractérise par une absence d'agrégats visibles. Ceci permet de s'assurer que les agrégats d'amphipol ne contribuent pas au bruit de fond de l'image, même si la concentration

en A8-35 est 500 fois supérieure à sa CAC. L'hypothèse d'une coexistence visible entre agrégats d'A8-35 et complexes m5-HT_{3A}/A8-35 sur les autres grilles, avec parasitage de l'identification des particules d'intérêt, a ainsi été écarté. Pour les grilles préparées avec le récepteur en présence de 1 g/L d'A8-35 (**Figure 1.3.6 (b)**), une forte exclusion a été observée, avec concentration des particules sur les bords des films. Un phénomène d'exclusion semblable, mais de moindre importance, a été observé sur les grilles en présence de 0,3 g/L d'A8-35 (**Figure 1.3.6 (c)**), avec présence de particules au centre du film, quoiqu'à une concentration plus faible que sur les bords. Ayant ainsi établi la concentration en A8-35 d'intérêt, le choix final de la grille pour la collecte s'est fait sur le critère du nombre de carreaux paraissant exploitables, la concentration en récepteur m5-HT_{3A} ne semblant pas avoir d'impact significatif sur la distribution ou l'éventuelle agrégation des particules observées.

3.2.3.2. Reconstruction 3D de m5-HT_{3A} en amphipol

La collecte d'un set de données en vue d'une reconstruction 3D a été effectuée sur une grille contenant 2 g/L de récepteur, avec un ajout d'APol avant congélation permettant d'atteindre une concentration de 0,3 g/L en A8-35. Les résultats du traitement opéré sur cette collecte sont présentés en **Figure 1.3.7**.

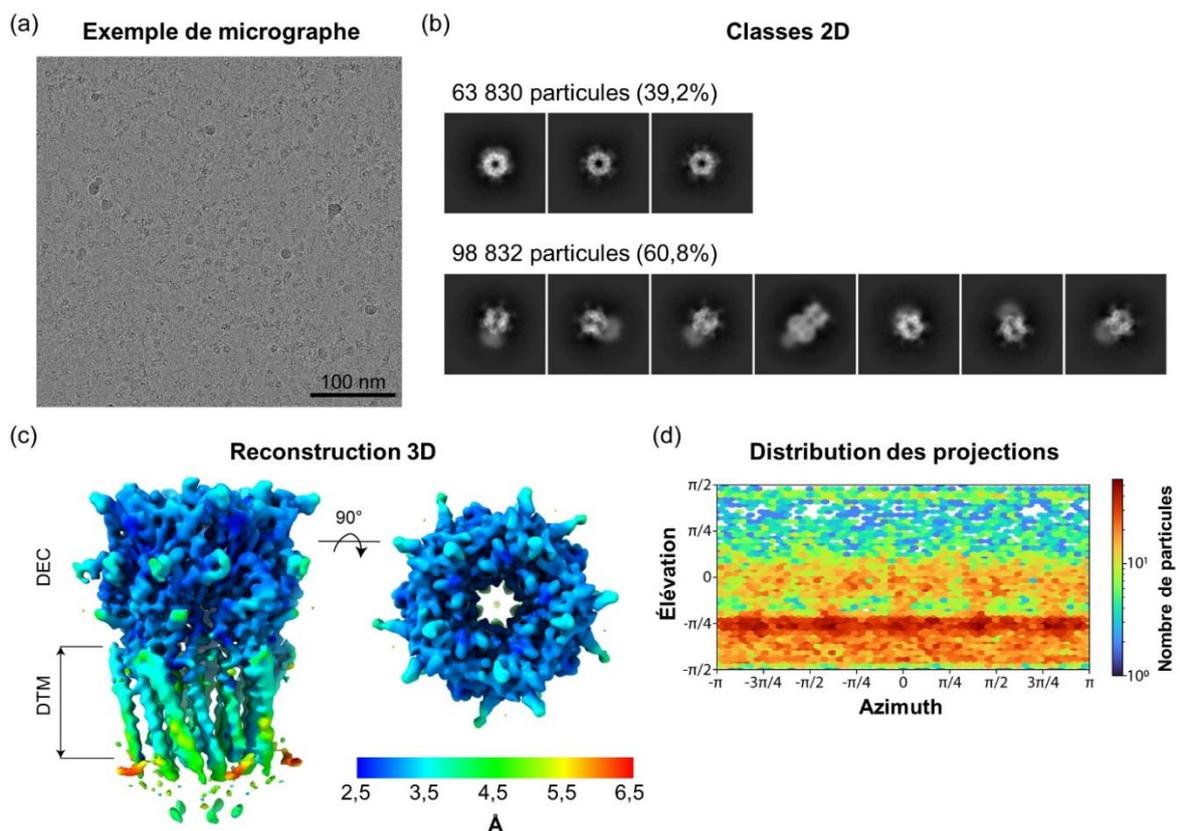


Figure 1.3.7. Set de données cryo-EM sur le récepteur m5-HT_{3A} en A8-35, acquis sur un échantillon contenant 2 g/L de récepteur et 0,3 g/L d'A8-35 libre. (a) Exemple de micrographe constituant le set de données. (b) Différentes classes 2D identifiées et moyennées sur l'ensemble des micrographes. Les classes ont été réparties en 2 catégories : vues du dessus (panneaux supérieurs) et vues inclinées (panneaux inférieurs), avec indication de la proportion représentée par chaque catégorie. (c) Reconstruction 3D du récepteur, colorisée en fonction de la résolution locale estimée. Les domaines extracellulaire (DEC) et transmembranaire (DTM) sont également indiqués. (d) Distribution des angles sous lesquels sont vues les particules du set de données, sur la base de la reconstruction présentée en (c).

De manière assez prometteuse, une coexistence entre particules présentant des inclinaisons variables pouvait déjà être relevée à l'œil nu sur les micrographes constituant la collecte (**Figure 1.3.7 (a)**). Le tri des particules après repérage, suivi de la quantification entre vues du dessus et vues inclinées (**Figure 1.3.7 (b)**), confirme que l'ajout d'amphipol pré-congélation a permis de s'affranchir de la prédominance de vues du dessus qui avait été limitante par le passé⁹⁵. Si la distribution d'orientations obtenue n'est pas encore complètement aléatoire (**Figure 1.3.7 (d)**), la diversité des angles s'est avérée suffisante pour procéder à une reconstruction 3D à 3,4 Å de résolution moyenne (**Figure 1.3.7 (c)**), une amélioration significative par rapport aux 7 Å de la précédente reconstruction en amphipol⁹⁵. Au sein de la reconstruction 3D, une inhomogénéité de résolution peut être observée, avec une précision plus faible dans le domaine transmembranaire. Cette inhomogénéité, souvent retrouvée dans les cartes de densité, est indicative d'une légère fluctuation/mobilité des hélices et ainsi d'une légère variabilité de leur position d'une particule à l'autre. La flexibilité reste néanmoins suffisamment restreinte pour identifier une légère inclinaison des hélices transmembranaires, en contraste avec les structures obtenues en détergent C₁₂E₉⁹⁴, qui présentent des hélices verticales. A l'heure actuelle, il est encore trop tôt pour se prononcer sur l'origine de cette divergence (différence de contrainte au niveau du domaine transmembranaire en fonction du tensioactif ?) ou savoir si chaque configuration est bien représentative d'une conformation native du récepteur m5-HT_{3A}. Néanmoins, le fait d'avoir obtenu un échantillon de qualité suffisante pour faire cette comparaison simplement avec ajout d'un excès d'A8-35 renforce l'hypothèse d'une protection contre l'orientation préférentielle via couverture de l'interface air/eau par le polymère, et peut s'avérer être un paramètre prometteur à exploiter pour une potentielle rationalisation de la préparation d'échantillons en cryo-EM.

Conclusion

L'étude menée sur une gamme de solutions d'A8-35 a permis d'émettre une série d'hypothèses sur les corrélations entre propriétés physico-chimiques et les caractéristiques des films de glace obtenus sur grille de cryo-EM. Outre les considérations de stabilité, cruciales si l'on veut disposer d'une importante proportion de films intacts, l'importance des cinétiques de couverture d'interface air/eau et d'étalement sur surface de carbone a été soulevée. L'application des hypothèses à une étude complémentaire, menée sur un détergent standard, le DDM, a permis une estimation rapide d'une gamme de concentration correcte pour l'étude en cryo-EM, tout en soulignant le rôle d'homogénéisation d'épaisseur de glace joué par la cinétique d'étalement. En parallèle, les cinétiques de couverture d'interface, estimées par mesure de tension de surface, ont été mises à profit pour déterminer des conditions susceptibles de conférer une protection partielle contre les problématiques d'orientation préférentielle : ce concept a été mis en pratique avec une amélioration de l'étude structurale du récepteur à la sérotonine m5-HT_{3A}. Ces résultats n'ont pas vocation à promouvoir une condition miracle et universelle garantissant des grilles de qualité : la présence de protéines (ou autres systèmes) sans cesse différentes garantie des propriétés de solution fluctuantes, allant de pair avec une nécessité d'adaptation. Toutefois, ils peuvent constituer une base intéressante (ou un nouveau levier) pour la communauté de microscopistes afin de rationaliser la préparation d'échantillons, en attendant la démocratisation des nouvelles méthodes de congélations, promouvant un meilleur contrôle via limitation de la latence pré-congélation, voire suppression complète de l'étape d'épongeage^{41,45,47,58}.

Perspectives : autres paramètres impactant les caractéristiques de glace

Dans ce chapitre, la cinétique d'étalement sur carbone a été proposée comme l'un des critères clés pour comprendre et prédire les caractéristiques de glace obtenues sur grille de cryo-EM. Sa forte variation avec la concentration en tensioactif a été illustrée avec l'A8-35 et le DDM (**Figures 1.2.9 et 1.3.1 (c)**, respectivement). Il est toutefois à noter que plusieurs autres paramètres peuvent sensiblement impacter cette cinétique d'étalement, tout en étant peu ou pas représentés par le montage expérimental associé.

Sur ce plan, un des principaux points limitants pour le montage de suivi d'étalement réside dans la gestion de la surface de carbone : les tensioactifs sont connus pour s'adsorber sur des surfaces de carbone, bien qu'un glow-discharge préalable puisse en limiter l'ampleur⁹⁷. Pendant la préparation des grilles, l'occurrence d'une telle adsorption avant épongeage conduirait à une surface carbone/tensioactif plus favorable à un ré-étalement de l'échantillon. Ainsi, les mesures effectuées avec des gouttes sur surfaces de carbone 'propres' ont probablement conduit à une sous-estimation des cinétiques d'étalement. En toute rigueur, devraient également s'ajouter des considérations sur la différence de « patterning » (surface uniforme vs couche percée de trous), ainsi que sur l'impact de la concentration sur les autres étapes de la préparation de grille (en particulier sur la cinétique d'absorption de la solution de tensioactif lors de l'épongeage, qui influencera le profile d'épaisseur final en modifiant la quantité totale de liquide restant sur la grille). Ces quelques mentions font d'ailleurs écho à la discussion portant sur les différences de paramètres de préparation lors de l'étude du récepteur m5-HT_{3A}, en **Section 3.2.3.1**.

L'autre facteur principal sur lequel mettre l'emphase serait l'étape de glow-discharge, opérée pour accroître l'hydrophilie des grilles via génération de charges de surface. Les paramètres les plus communément mentionnés par rapport à cette étape sont sa durée, son intensité, ainsi que la nature et pression du gaz utilisé. Sur la base de certains des résultats obtenus et présentés dans ce chapitre, un autre paramètre, plus rarement partagé, semble mériter une attention particulière : il s'agit du temps écoulé entre la fin du glow-discharge et le dépôt de l'échantillon, que l'on appellera ici temps d'attente post-GD. Lors de l'étude des caractéristiques de glace sur grille de cryo-EM, il a été mentionné que tous les échantillons ont été déposés, épongés et congelés entre 30 et 60 minutes après le glow-discharge. Pour presque toutes les concentrations étudiées, l'écart maximal de temps d'attente post-GD entre grilles est inférieur ou égal à 15 min. La seule exception réside dans le set de grilles préparées à 1 g/L en A8-35, avec un écart de 30 min (grilles respectivement préparées après un temps d'attente post-GD de 30, 35 et 60 min). Une légère variation dans les distributions, attribuée à cette variation dans le temps d'attente, est visible en **Figure 1.1.7 (g)**, et soulignée dans la **Figure 1.4**.

Dans le cas de la troisième grille, le temps d'attente post-GD plus important a probablement conduit à un déchargement partiel de la grille, réduisant l'hydrophilie qui en découle, et ralentissant les cinétiques d'étalement. En conséquence, et uniquement dans le cas de cette grille, l'étalement de liquide post-épongeage n'a probablement pas pu complètement s'opérer avant congélation. La distribution résultante est ainsi intermédiaire entre les cas 1 g/L 'normaux' (étalement complet, unique population de films fins) et les distributions obtenues pour les grilles préparées à 0,3 g/L en A8-35 (**Figure 1.1.7 (f)**), dont la gamme plus large de films épais (films compris entre 50 et 150 nm) indique un étalement partiel moins abouti.

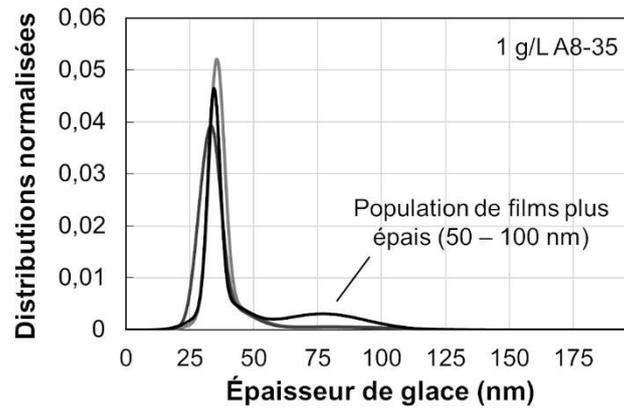


Figure 1.4.1. Reproduction des distributions d'épaisseurs de glace obtenues pour les grilles préparées à 1 g/L en A8-35 (**Figure 1.1.7 (g)**). Les 2 premières grilles, préparées après en temps d'attente post-GD de 30 et 35 min, respectivement, présentent une distribution composée d'une unique population de films fins (≈ 35 nm). La troisième grille, préparée 60 min après le glow-discharge, comporte une population additionnelle de films plus épais, d'une épaisseur comprise entre 50 et 100 nm.

Ces quelques points conduisent essentiellement au constat suivant : quand on s'y penche d'un peu trop près, la quantité de phénomènes physiques impliqués lors de la préparation d'une grille, ainsi que de paramètres à contrôler et considérer pour comprendre ce qui s'y passe, peut avoir un petit côté intimidant. Si l'étude présentée dans ce chapitre propose quelques éléments concrets qui devraient aider dans la rationalisation de la préparation de grilles, il sera toutefois probablement nécessaire de mener plusieurs campagnes d'envergure similaire sur des paramètres complémentaires avant de prétendre s'approcher d'une compréhension approfondie du procédé.

Chapitre 2 – Les CyclAPols : nouvelle génération d'Amphipols

INTRODUCTION : CYCLAPOL ET PROTEINES MEMBRANAIRES	64
LES DETERGENTS	66
STYRENE MALEIC ACID COPOLYMERS, OU SMAS	67
LES POLYMERES AMPHIPILES, OU AMPHIPOLS POUR	67
SYSTEMES ETUDIES	68
<i>Bactériorhodopsine et membrane pourpre</i>	68
<i>BmrA, transporteur bactérien exprimé dans E. coli</i>	69
1. SYNTHÈSE DES CYCLAPOLS ET DERIVES FONCTIONNALISES	70
1.1. SYNTHÈSE DE BASE	70
1.1.1. <i>Préparation de l'acide polyacrylique (PAA)</i>	70
1.1.2. <i>Greffage des chaînes cycloalkyles</i>	71
1.1.3. <i>Purification des polymères greffés</i>	72
1.1.4. <i>Caractérisation du taux de greffage</i>	72
1.1.4.1. <i>Dosage acido-basique des carboxylates</i>	72
1.1.4.2. <i>Spectres RMN du proton ¹H et du carbone ¹³C</i>	73
1.2. COMPLEMENT DE BANQUE DE POLYMERES : CYCLAPOLS A CHAINES C ₉ ET C ₁₀	74
1.2.1. <i>Synthèse du C₇-C₂-50 et du C₈-C₂-50</i>	74
1.2.2. <i>Taux de greffage et propriétés du C₇-C₂-50 et du C₈-C₂-50</i>	75
1.3. SYNTHÈSE DE CYCLAPOLS FONCTIONNALISES : AJOUT DE GROUPEMENT TETRAZINE	77
1.3.1. <i>1^{ère} tentative : protocole existant de greffage mixte</i>	77
1.3.2. <i>2^{nde} tentative : ajustement des conditions de purification</i>	79
1.3.3. <i>Estimation du taux de greffage des groupements Tz</i>	81
2. PREUVE DE CONCEPT : CAS DE LA MEMBRANE POURPRE	82
2.1. MATERIEL ET METHODES	82
2.1.1. <i>Production et solubilisation de la membrane pourpre</i>	82
2.1.1.1. <i>Préparation des membranes</i>	82
2.1.1.2. <i>Fusion des membranes avec des liposomes de DMPC</i>	83
2.1.1.3. <i>Solubilisation de la membrane pourpre enrichie en DMPC</i>	83
2.1.1.4. <i>Thermostabilité post-solubilisation</i>	84
2.1.1.5. <i>Cinétique de solubilisation : suivi par DLS</i>	84
2.1.2. <i>Caractérisation de l'association des polymères en agrégats</i>	84
2.1.2.1. <i>Mesures des intensités de fluorescence de la sonde pyrène</i>	84
2.1.2.2. <i>Estimation de la CAC par mesure de tension de surface</i>	85
2.2. MEMBRANE POURPRE VS BATTERIE DE TENSIOACTIFS	85
2.3. COUPS DE SONDE SUR LES CARACTERISTIQUES DES AGREGATS DE CYCLAPOLS	90
2.3.1. <i>Impact de la concentration de polymères sur l'intensité de fluorescence du pyrène</i>	90
2.3.2. <i>Estimation de la CAC : variation de la tension de surface à l'équilibre</i>	92
RESUME : CYCLAPOLS – PREMIERES IMPRESSIONS	94

3. ETUDE DETAILLEE : CAS DE LA PROTEINE MODELE BMRA.....	95
3.1. PRODUCTION ET SOLUBILISATION DE BMRA	95
3.1.1. <i>Matériel et méthodes</i>	95
3.1.1.1. Préparation de membranes	95
3.1.1.2. Solubilisation et purification	96
3.1.1.3. Détermination des quantités de BmrA post-purification	96
3.1.2. <i>Résultats et discussion : efficacités de solubilisation</i>	97
3.2. TEST : PRESERVATION DES LIPIDES LORS DE LA SOLUBILISATION.....	99
3.2.1. <i>Matériel et méthodes</i>	99
3.2.1.1. Extraction de lipides	99
3.2.1.2. Détection de lipides par chromatographie sur couche mince (CCM)	99
3.2.1.3. Identification des lipides par spectrométrie de masse	100
3.2.2. <i>Résultats et discussion : lipides or not lipides ?</i>	100
3.3. TEST : STABILISATION/PRESERVATION DE L'ACTIVITE POST-SOLUBILISATION DE BMRA.....	104
3.3.1. <i>Matériel et méthodes</i>	104
3.3.1.1. Thermostabilité : suivi de la fluorescence des résidus tryptophane de la protéine lors de l'exposition à une rampe de température	104
3.3.1.2. Protéolyse ménagée.....	105
3.3.1.3. Activité : test d'enzymes couplées.....	105
3.3.2. <i>Résultats et discussion</i>	106
3.3.2.1. Thermostabilité de BmrA	106
3.3.2.2. Variation de l'activité et de la stabilité de BmrA en fonction de l'environnement amphiphile ...	109
OUVERTURE : POLYMERES AMPHIPHILES ET NANODISQUES.....	112
RESUME	113
SYNTHESE	114
BIBLIOGRAPHIE	115

Introduction : CyclAPol et protéines membranaires

Le terme de « protéine membranaire » se réfère à l'intégralité des protéines étant insérées dans ou en interaction avec les membranes biologiques. Leurs rôles variés mais essentiels (canaux régulant les transports au travers de la membrane, récepteurs/transmetteurs de stimuli, catalyseurs, ...) et la gravité des conséquences de certains de leurs dysfonctionnements⁹⁸ en font des cibles thérapeutiques cruciales. Malgré ces enjeux, les protéines membranaires restent encore peu représentées au sein de l'ensemble des études fonctionnelles et structurales. Cela s'explique par l'importante difficulté liée à leur manipulation en solutions aqueuses : leur domaine transmembranaire, tapissé en surface d'acides aminés ayant essentiellement des chaînes latérales hydrophobes leur permettant d'être insérées dans une bicouche lipidique, impose l'utilisation de tensioactifs pour prévenir leur agrégation en solution aqueuse ; un mauvais choix de tensioactifs entrainera une perturbation de l'activité ou de la structure de la protéine, pouvant fausser les données et interprétations^{99,100}.

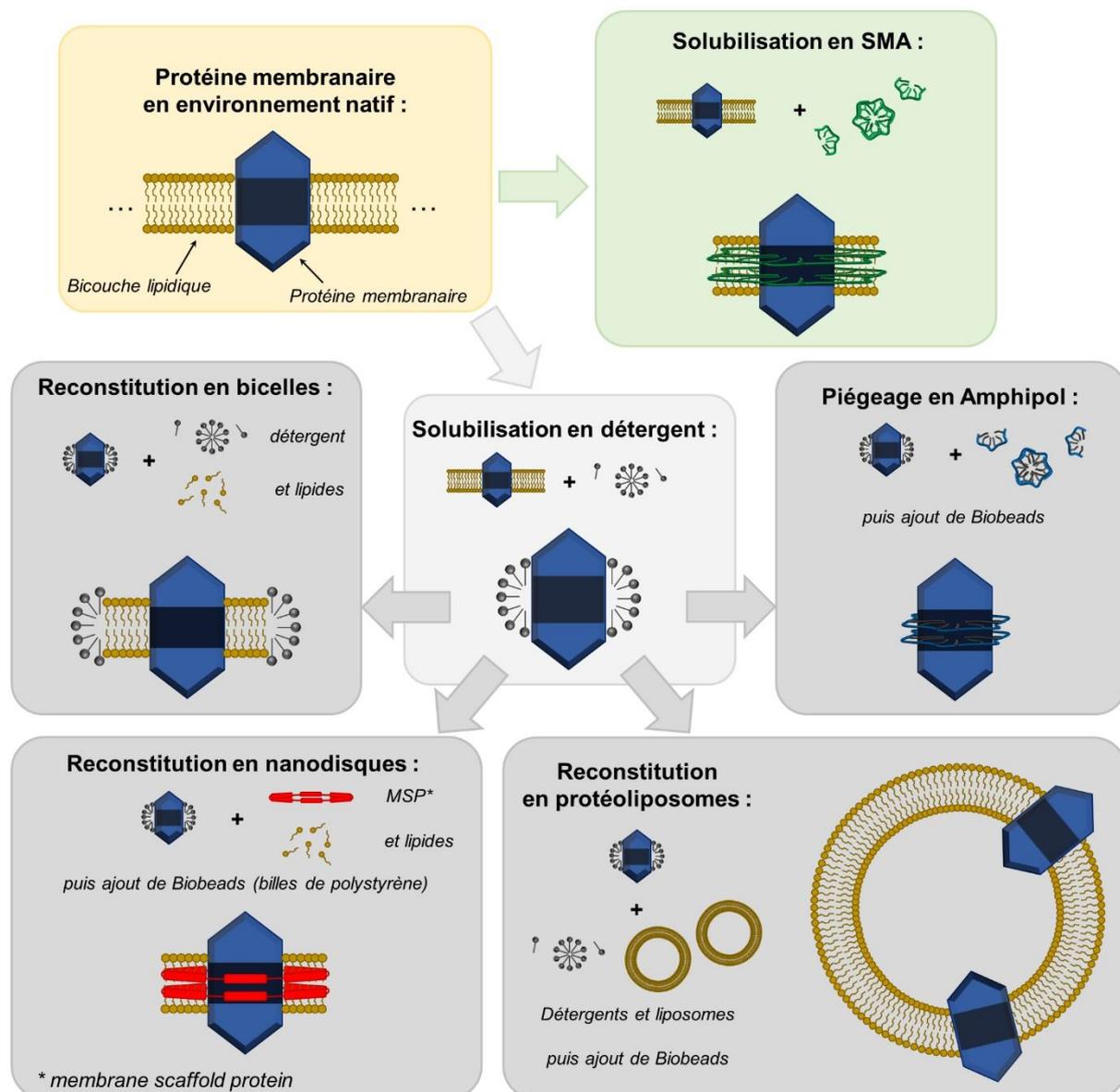


Figure d'introduction 2.1. Principaux exemples d'outils et d'environnements développés pour la manipulation des protéines membranaires.

Compte-tenu de la nécessité d'extraire une protéine de la membrane avant de pouvoir mener la majorité des études fonctionnelles et structurales, de multiples outils et approches ont été développés pour y parvenir en minimisant les dégâts. Historiquement, les premiers tensioactifs utilisés à cet effet ont été les détergents extraits de sources naturelles, progressivement remplacés par des détergents synthétiques. Les détergents se sont parfois avérés trop efficaces : en plus de fragmenter les membranes et de laver les protéines solubilisées de toute trace de lipide, certains détergents peuvent déstabiliser voire dénaturer le domaine transmembranaire, provoquant la dissociation d'un complexe protéique. Quelques-unes des principales alternatives développées, qu'il s'agisse de limiter la durée d'exposition aux détergents ou de s'affranchir complètement de leur utilisation, sont présentées en **Figure d'introduction 2.1**. Peuvent être cités comme exemples :

- les nanodisques lipidiques, aussi appelés nanodisques, ou NDs. Le principe, initialement proposé au tournant du 21^e siècle^{101,102}, consiste à former un assemblage composé d'un petit morceau de bicouche lipidique dont la cohésion est assurée par une protéine d'assemblage (communément appelée MSP, pour « membrane scaffold protein »). Les protéines membranaires y sont ensuite insérées, autorisant leur conservation et leur étude dans un environnement reproduisant celui d'une membrane biologique. Malgré quelques inconvénients (une solubilisation préalable en détergent reste nécessaire, et l'adaptation du diamètre et de la composition des disques aux différentes protéines peut s'avérer fastidieux), l'intérêt majeure de l'étude en environnement lipidique en fait une approche connaissant un essor considérable, à l'origine d'un grand nombre de publications et de revues¹⁰³⁻¹⁰⁷. Il s'agit d'ailleurs du type d'environnement connaissant l'essor le plus important pour l'étude structurale des PMs en cryo-EM : en 2020, les nanodisques étaient le 3^e environnement le plus utilisé, avec presque 80% des structures obtenues sur la période 2019-2020¹⁶.
- les bicelles, terme introduit en 1995 (obtenu à partir de « bicouche » et « micelle ») pour décrire un système de concept semblable à celui des nanodisques¹⁰⁸. Le principe consiste également à fournir un environnement lipidique aux protéines membranaires solubilisées, ici composé de lipides à chaînes longues organisés en bicouche et de lipides à chaînes courtes ou de détergents stabilisant les extrémités de la bicouche lipidique. En plus d'avoir une taille modulable en ajustant les ratios détergents/lipides, ce type de système présente l'avantage d'être facilement orientable, conduisant à des utilisations principalement en cristallographie¹⁰⁹ et en RMN du solide^{110,111}.
- les peptides amphiphiles, aussi appelés détergents lipopeptidiques¹¹² ou peptitergents¹¹³. Ce sont des alternatives aux détergents proposées pour la première fois en 1991¹¹⁴, utilisés pour la stabilisation de protéines membranaires en solution. En dépit des perspectives prometteuses, avec potentielle adaptation des séquences de peptide pour la stabilisation ciblée de protéines¹¹⁵, les peptides amphiphiles restent à ce jour peu employés et caractérisés.
- les tensioactifs fluorés, de structure très proche des détergent traditionnels, à la différence près d'atomes fluorés dans leur queue hydrophobe. Cela permet d'accroître leur volume et leur rigidité, limitant notamment l'effet délipidant ainsi que les risques d'intrusion/dénaturation dans le domaine transmembranaire des protéines membranaires. Ils ont ainsi été proposés comme tensioactifs non-détergents permettant de conserver les protéines membranaires après une solubilisation préalable en détergent¹¹⁶. Les limitations des premiers prototypes, tournant principalement autour de leur affinité insuffisante pour les protéines membranaires, ont donné lieu au développement d'une large gamme de tensioactifs fluorés, avec une variation des groupements constitutifs de la tête hydrophile (dérivés de galactose¹¹⁷, de lactose¹¹⁸ ou de maltose^{119,120}, variation de la taille de tête avec ajout de groupements glucoses¹²¹, ou encore groupements amine-oxide¹²²). De nouveaux tensioactifs fluorés continuent à ce jour à être développés, notamment avec la perspective de proposer des outils dotés de propriétés de solubilisation, en plus de leur capacité stabilisatrice^{123,124}.

La liste qui précède ne fait que présenter certaines des possibilités existantes pour la manipulation des protéines membranaires. Voici maintenant une rapide présentation des quelques options utilisées dans le travail qui suivra, détergents et polymères amphiphiles.

Les détergents

Les détergents sont historiquement le premier type de tensioactif employé pour la solubilisation et la stabilisation des protéines membranaires^{125,126}. Ils sont classiquement représentés comme composés d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe, ou lipophile (illustration en **Figure d'introduction 2.2**). Leur caractère amphiphile conduit à leur auto-association au-delà d'une concentration seuil, la CMC (concentration micellaire critique), le plus souvent sous forme de micelles, structures sphériques constituées d'un cœur hydrophobe protégé par l'exposition des têtes hydrophiles en extérieur.

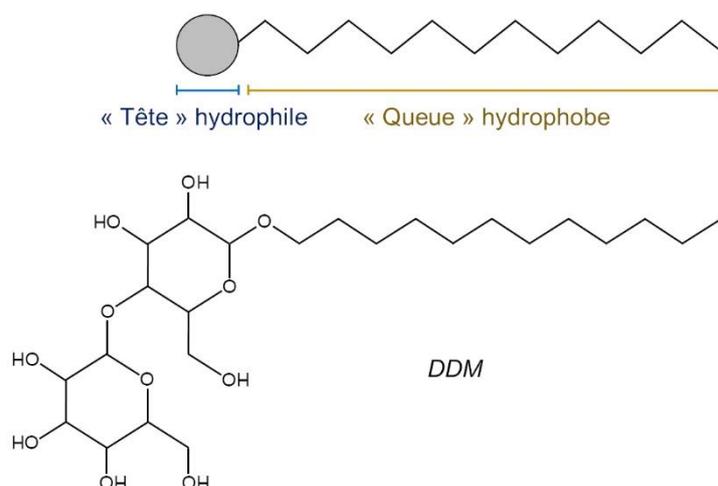


Figure d'introduction 2.2. Représentation classique des détergents. La structure du n-dodécyl-β-D-maltoside (DDM), détergent non-charge très classique, est présentée à titre d'exemple.

Les détergents peuvent être répartis en 2 familles principales :

- les détergents chargés. Les premiers testés ont été ceux porteurs de charges nettes (anioniques ou cationiques), avec le SDS comme exemple emblématique. Ils ont exhibé d'excellentes capacités de solubilisation, venant toutefois au prix d'une forte tendance à la dénaturation des protéines membranaires. Des détergents zwitterioniques comme le CHAPS, porteurs de charges mais électriquement neutres, ont été développés par la suite afin d'essayer de limiter l'aspect dénaturant de leurs homologues ioniques^{127,128}.
- les détergents neutres, avec le DDM comme exemple particulièrement connu. Considérée comme la catégorie de détergents la moins agressive ou dénaturante, il s'agit de la famille la plus utilisée pour l'étude structurale des protéines membranaires (près de deux tiers des structures de PMs obtenues en cryo-EM ont impliqué l'utilisation de détergents neutres, en particulier la digitonine et le GDN)¹⁶. Cette famille continu à être développée, avec par exemple l'émergence du LMNG (composé de 2 molécules de DDM reliées par un carbone quaternaire à la jonction entre les parties hydrophiles et hydrophobes), ayant déjà fait ses preuves comparativement au DDM¹²⁹.

Styrene maleic acid copolymers, ou SMAs

Les SMAs sont des polymères amphiphiles à chaînes cycliques (illustration en **Figure d'introduction 2.3**) utilisés pour la première fois dans le cadre de l'étude de protéines membranaires en 2009¹³⁰.

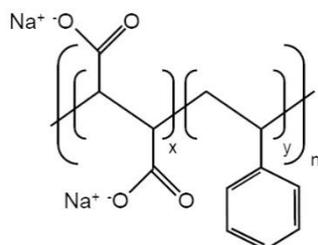


Figure d'introduction 2.3. Structure chimique des SMAs. Leur dénomination répond classiquement au format SMA(y:x), avec par exemple les polymères SMA(2:1) et SMA(3:1).

Les SMAs trouvent depuis longtemps leur principale utilisation dans l'industrie du plastique et leur propriété physico-chimique ont fait l'objet de nombreuses études^{131,132}. Ce n'est que depuis une décennie qu'ils se sont imposés comme polymères de référence pour la solubilisation directe des protéines membranaires, permettant l'élimination de toute forme d'exposition aux détergents. Toutefois, leur atout ayant fait couler le plus d'encre est leur capacité à former des particules discoïdales contenant lipides et PM, couramment appelées SMALPs (SMA lipid particles, le terme lipodisque est aussi parfois employé, par analogie avec les nanodisques dont ils rappellent la structure). De nombreuses études ont essayé d'expliquer les mécanismes associés¹³³⁻¹⁴⁰. A l'heure actuelle, la principale certitude reste que la composition lipidique des SMALPs respecte les proportions de la membrane d'origine des protéines purifiées, suggérant que le processus de solubilisation n'entraîne pas d'enrichissement ou d'appauvrissement de certains lipides en particulier^{141,142}.

Les polymères amphiphiles, ou amphipols pour « amphiphilic polymers »

Déjà un peu évoqués dans le travail présent, les amphipols sont des polymères amphiphiles obtenus par modification d'un squelette d'acide poly-acrylique en faisant réagir des amines primaires sur les groupements carboxyliques. Le premier amphipol, l'A8-35, a été développé pour proposer un outil permettant la stabilisation et la conservation des protéines membranaires sur de longues durées sans en provoquer l'inactivation ou la dénaturation⁶³. La facilité de fonctionnalisation a permis la synthèse d'un grand nombre d'amphipols dérivés de l'A8-35 d'origine, les derniers en date ayant été baptisés CyclAPols, en raison de la structuration cyclique de leurs chaînes latérales. La structure des différents amphipols utilisés dans cette étude peut être retrouvée en **Figure d'introduction 2.4**.

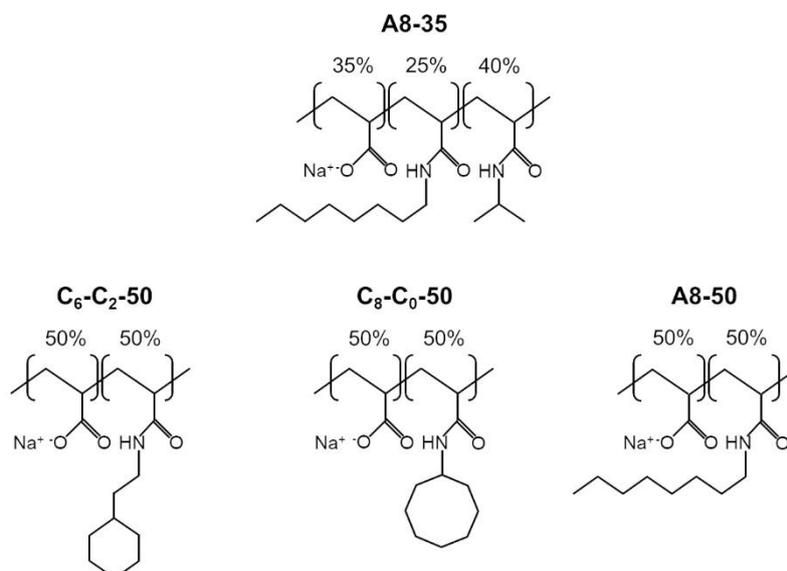


Figure d'introduction 2.4. Structure chimique de l'amphipol historique, l'A8-35, ainsi que de 3 amphipols dérivés : le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50, appartenant à la catégorie des CyclAPols en raison de leurs chaînes latérales cycliques, et l'A8-50, identique aux 2 CyclAPols si ce n'est pour la structure de chaîne alkyl.

La suite des travaux présentés ici se focalise sur les CyclAPols, qui ont déjà eu l'occasion d'exhiber des propriétés de solubilisation de membranes sensiblement supérieures à l'A8-35 d'origine⁴. Afin de tester les nouveaux arrivants comparativement aux SMAs et détergents de référence, deux protéines modèles ont été choisies et étudiées, la bactériorhodopsine, présente dans la membrane pourpre, et le transporteur BmrA, exprimé dans la membrane plasmique d'*E. coli*.

Systemes étudiés

Bactériorhodopsine et membrane pourpre

La bactériorhodopsine (HsBR, structure en **Figure d'introduction 2.5**) est un homotrimer de 26,8 kDa présent dans la membrane d'*Halobacterium salinarum*. Il s'agit d'une pompe à proton alimentée en énergie par excitation lumineuse¹⁴³. Elle occupe une place assez particulière dans l'histoire de l'étude des protéines membranaires : il s'agit en effet de la première protéine membranaire pour laquelle une structure a pu être obtenue, en 1975¹⁷. L'analyse a été menée par cristallographie électronique, en mettant à profit la très forte proportion de HsBR (en tant qu'unique protéine présente) dans la membrane, 66 % en masse, pour obtenir des figures de diffractions qui auront finalement permis de déduire l'organisation 3D de la protéine. L'autre particularité d'intérêt de la HsBR réside dans sa capacité à lier un chromophore, le rétinol, conférant à la protéine des propriétés d'absorption dans le visible. Son maximum d'absorption (à 570 nm quand la protéine est dans sa membrane native, lui donnant la coloration pourpre à l'origine de sa dénomination) est par ailleurs dépendant de l'environnement dans lequel elle se trouve (par exemple, un décalage vers 555 nm après solubilisation par un tensioactif est souvent observé)¹⁴⁴. La somme de ces propriétés, présence d'un unique type de protéine en forte proportion (permettant de s'affranchir d'éventuelles étapes de purification) et absorption variant en fonction de l'environnement et donc de la conformation de ladite protéine, en font un système particulièrement attractif et étudié^{145,146}.

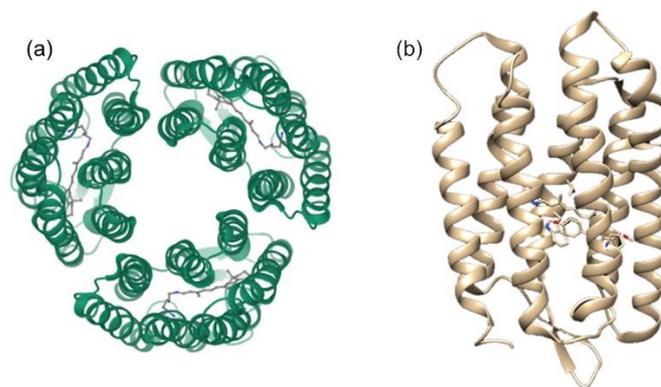


Figure d'introduction 2.5. Structure de HsBR (entrée PDB 1FBB), obtenue et discutée par Subramaniam et Henderson¹⁴⁷. (a) Vue aérienne de l'organisation en trimère de HsBR. (b) Vue latérale d'un monomère, composé d'un faisceau de 7 hélices transmembranaires, à l'intérieur duquel se trouve le rétinol.

BmrA, transporteur bactérien exprimé dans *E. coli*

BmrA (*Bacillus subtilis* multidrug resistance ABC transporter, structure en **Figure d'introduction 2.6**) est un homodimère de 133 kDa présent au sein de la membrane externe, pouvant être surexprimé dans *E. coli*. La protéine appartient à la catégorie des pompes d'efflux, des transporteurs impliqués activement dans l'excrétion d'entités chimiques ou biologiques en dehors des cellules. La contribution des pompes d'efflux à l'instauration d'une résistance aux antibiotiques, avec la mise en place d'une voie permettant leur éjection, confère une importance stratégique majeure à la compréhension des mécanismes de transport. BmrA a ainsi fait l'objet d'une importante quantité d'études¹⁴⁸⁻¹⁵⁶, avec obtention de sa structure dans plusieurs conformations, dans l'optique de décortiquer les différentes phases du transport. Les études menées sur BmrA inclues par ailleurs des investigations portant sur sa solubilisation en détergent^{154,156} comme en SMA¹⁵⁷, ainsi que sur la variation de son environnement lipidique¹⁵¹. La facilité de production, la multiplicité des études et les enjeux qui leur sont associés ont ainsi fait de BmrA un système particulièrement intéressant à explorer dans le cadre du travail présenté ici.

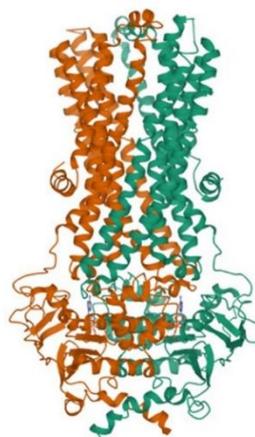


Figure d'introduction 2.6. Structure du dimère de BmrA (mutant E504A, entrée PDB 6R72), obtenue et discutée par Chaptal et al.¹⁵⁸. Chaque monomère est représenté avec une couleur distincte.

1. Synthèse des CyclAPols et dérivés fonctionnalisés

La synthèse de polymères amphiphiles dérivés de l'amphipol historique (A8-35) dans une optique d'optimisation des propriétés de solubilisation (extraction) des protéines des membranes biologiques a été initiée par Anaïs Marconnet au cours de son travail de thèse³. Les chaînes latérales linéaires de l'A8-35 ont été remplacées par des chaînes hydrocarbonées cycliques dont la structure varie en fonction de plusieurs paramètres. En particulier, le screening opéré incluait une modification de la longueur des groupes cycliques hydrophobes (6 à 8 carbones), de leur structure (isomères incluant des cycles porteurs de groupes méthyl ou éthyl en différentes positions), de la nature des cycles (saturés ou insaturés), du taux de greffage des cycles sur le squelette polyacrylique (25 à 50 %), ainsi que du taux de charges du polymère via la neutralisation d'une fraction des carboxylates restants (0 à 15% de greffage de chaînes isopropyl). Les polymères ont été regroupés en deux familles dénommées ArylAPols et CyclAPols en fonction de la nature des cycles insaturés et saturés, respectivement¹⁵⁹. Le test de cette banque de polymères en a fait ressortir 2 en particulier, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50 (squelette polyacrylique greffés à 50 % avec des chaînes latérales composées respectivement d'un cycle saturé de 6 carbones avec un espaceur de 2 carbones, et d'un cycle saturé de 8 carbones)^{4,159}. Ma contribution à la partie synthèse aura été de 1) poursuivre la production de CyclAPols dans le but d'étendre l'investigation de l'impact d'un allongement supplémentaire des chaînes alkyls (9 et 10 carbones) sur l'efficacité de solubilisation des membranes par comparaison aux efficacités déjà obtenues avec les CyclAPols mentionnés ci-dessus, et 2) marquer les CyclAPols avec ajout d'une fonction tetrazine dans une optique d'utilisation en chimie Click¹⁶⁰⁻¹⁶².

1.1. Synthèse de base

La synthèse des CyclAPols a été effectuée sur la base des travaux de thèse d'Anaïs Marconnet³, eux-mêmes effectués sur la base de la synthèse de l'A8-35⁶³. La prise en main du protocole de synthèse s'est faite avec l'aide très appréciable et appréciée de Christel Le Bon, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris. La routine de synthèse a été sensiblement allégée par la participation notable et efficace de Bénédicte Bonvin, Université Paris-Est Créteil, Val de Marne.

1.1.1. Préparation de l'acide polyacrylique (PAA)

Le PAA (Mw 5 000 g/mol) utilisé comme précurseur dans la synthèse des CyclAPols est commercialement disponible sous forme de solution aqueuse à 50 % w/w chez Acros Organics. Une étape de retraitement est nécessaire avant utilisation afin de s'affranchir de la composante aqueuse, ainsi que de maximiser l'accessibilité des fonctions acide carboxylique via le dépliement des polymères¹⁶³. La solution commerciale est d'abord diluée dans une solution de soude, puis le PAA est précipité dans un bain d'éthanol (EtOH) absolu, filtré, repris dans de l'eau milliQ, passé sur colonne échangeuse d'ions, et enfin lyophilisé.

40 g de solution aqueuse de PAA sont ajoutés dans 160 mL d'eau milliQ préalablement réfrigérée (bain de glace). 13,12 g (1 équ.) de pastilles d'hydroxyde de sodium sont ajoutés progressivement sous vive agitation, en maintenant la réfrigération. Après dissolution complète des pastilles, la solution est ajoutée goutte à goutte (ampoule à brome) dans 2 L d'EtOH absolu, sous vive agitation et à température ambiante, conduisant à la précipitation du polymère. Le PAA précipité est filtré sur fritté (porosité 4), puis repris dans 200 mL d'eau milliQ (solution stock à environ 100 g/L), et filtré sur membrane PES 0,22 µm, montée sur un porte-filtre Merck Millipore (Merck Millipore All-Glass Filter Holder) branché sur une pompe de

paillasse. La solution filtrée obtenue est passée par injections successives de 30 mL au maximum sur une colonne échangeuse d'ions DOWEX, permettant un dépliement des polymères et une reprotonation des groupements carboxyliques : la colonne est équilibrée à l'eau milliQ avant injection (pH en sortie de 6), l'élution se fait à l'eau milliQ, avec récupération du PAA quand le pH en sortie devient acide (2-3), puis la colonne est régénérée (200 mL d'HCl 3 M) et rééquilibrée à l'eau milliQ. Les différentes fractions collectées sont enfin rassemblées et lyophilisées. Le PAA est obtenu sous forme de poudre blanche et hygroscopique, avec un rendement allant de 70 à 80 % en fonction des lots.

Avant chaque utilisation de PAA, une vérification de son taux d'humidité est effectuée : une masse précise d'environ 50 mg est reprise dans 60 mL d'eau milliQ, puis dosée avec une solution de soude à 0,1 M. La comparaison entre quantité théoriquement pesée et quantité réellement présente de polymère permet de déterminer son éventuel taux d'hydratation, afin de le prendre en compte dans les pesées futures, ou de redisperser (eau milliQ) et relyophiliser le stock si l'hydratation devient trop importante (taux d'humidité > 5 %).

1.1.2. Greffage des chaînes cycloalkyles

Historiquement, la synthèse des CyclAPols réalisée par Anaïs Marconnet s'effectuait via le greffage de chaînes latérales sur une masse initiale de PAA comprise entre 0,5 g et 1 g³. Compte tenu des quantités importantes de polymères nécessaire à l'étape de solubilisation des membranes, le protocole décrit ici découle d'une augmentation progressive d'échelle, ayant permis une légère réduction du coût horaire par gramme produit.

2,264 g de PAA (31,44 mmol de fonctions carboxyliques, 1 équ.) sont placés dans un bicol de 250 mL, puis dissous dans 40 mL de N-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP) sous agitation vigoureuse et en chauffant à 60°C pendant 4 h. Afin de limiter la présence d'eau dans le milieu réactionnel, le bicol est fermé avec un réfrigérant à eau monté d'une garde à chlorure, ainsi que d'une ampoule de coulée bouchée avec un bouchon de jupe. 2,00 g (2,15 mL, 15,72 mmol, 0,5 équ.) de cyclooctylamine (pour la synthèse du C₈-C₀-50) ou de 2-cyclohexylethylamine (pour la synthèse du C₆-C₂-50) sont introduits dans l'ampoule de coulée, dilués avec 4 mL de NMP, puis ajoutés goutte à goutte dans le réacteur. 15 minutes après la fin de l'ajout, 3,566 g de N,N'dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (17,29 mmol, 0,55 équ.), préalablement dissous dans 6 mL de NMP, sont introduits dans l'ampoule de coulée puis ajoutés goutte à goutte. Le réacteur est maintenu sous vive agitation à 60°C pendant 2 h, puis est poursuivie sans chauffage et sous agitation faible sur la nuit. Le mécanisme de formation de liaison amide entre les fonctions carboxyliques du PAA et une amine primaire en présence de DCC¹⁶⁴ est illustré en **Figure 2.1.1** : il implique notamment la formation de N,N'-dicyclohexylurée (DCU), à éliminer avant de pouvoir utiliser les polymères nouvellement greffés.

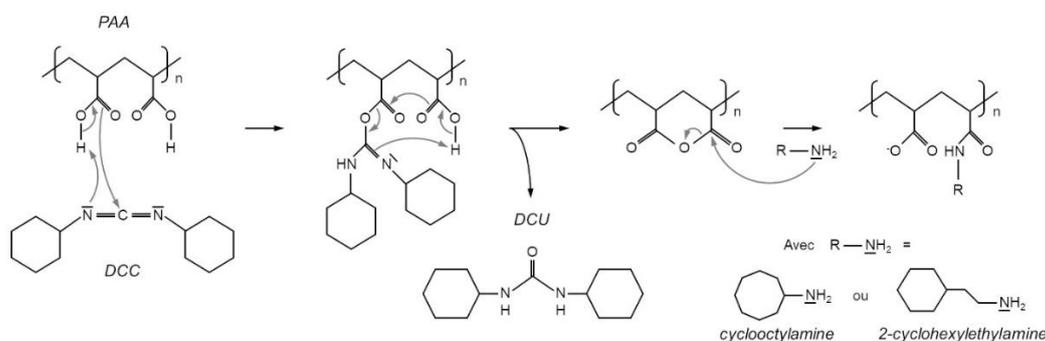


Figure 2.1.1. Mécanisme de formation de la liaison amide via activation des fonctions carboxyliques par le DCC¹⁶⁴ dans la synthèse des CyclAPols.

1.1.3. Purification des polymères greffés

Le mélange réactionnel est filtré sur fritté de porosité 4, éliminant la DCU ayant précipité. 3,397 g de méthanolate de sodium (62,88 mmol, 2 équ. par rapport aux fonctions carboxyliques initialement introduite), sont ajoutés au filtrat sous agitation moyenne. Après 15 minutes, la solution est diluée dans 700 mL d'eau milliQ, avant d'ajuster le pH à 10 avec une solution de NaOH à 11 M. Le tout est maintenu sous agitation pendant 1 h, avant d'être réparti dans des pots de 500 mL et centrifugé à 5 000 rpm (4 400 g) pendant 30 min, sédimentant la DCU nouvellement précipitée. Le surnageant est récupéré et ajouté goutte à goutte (ampoule à brome) dans 47,2 mL de HCl 2 M (94,3 mmol, 3 équ.) sous vive agitation, provoquant la précipitation du polymère. Le précipité est filtré sur fritté de porosité 4, puis récupéré et dispersé dans 4,3 mL de NaOH 11 M (47,2 mmol, 1,5 équ.), préalablement dilués dans 200 mL d'eau milliQ. La solution obtenue, rendue trouble par la présence de DCU précipitée, est de nouveau centrifugée (5 000 rpm, 30 min), puis filtrée sur membrane PES 0,45 μm , montée sur un porte-filtre Merck Millipore. Ce cycle de précipitation en milieu acide, filtration, redispersion en milieu basique, centrifugation, puis filtration de nouveau, est répété 4 fois, jusqu'à absence de traces de DCU. Au dernier cycle, le volume de solution basique dans lequel le polymère est redispersé est réduit à 30 mL, et la filtration finale est effectuée sur membrane PES 0,22 μm .

Une fois finis les cycles de précipitation/redispersion, la solution basique finale est dialysée (Spectrapore, MWCO 8 000 g/mol) pendant une journée contre 3 bains de 2 L d'eau milliQ, avec ajout de 1,43 mL de NaOH 11 M dans le dernier bain (déprotonation des carboxylates, garantissant la solubilité du polymère en solution aqueuse). Le dialysat est enfin récupéré et lyophilisé : les CyclAPols sont obtenus sous forme de poudre blanche et hygroscopique, avec un rendement de $67,7 \pm 9,3$ % sur la dizaine de lots effectués, répartie entre C₈-C₀-50 et C₆-C₂-50.

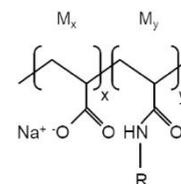
1.1.4. Caractérisation du taux de greffage

1.1.4.1. Dosage acido-basique des carboxylates

L'approche la plus rapide pour déterminer le taux de greffage des polymères consiste à déterminer la quantité de carboxylates (*i.e.* groupements non-greffés) dans une masse connue de polymère via dosage pH-métrique. Un tel dosage ne s'effectue pas en solution aqueuse mais dans un mélange EtOH/eau (80/20, v/v) : en solution aqueuse, les CyclAPols sont solubles à pH neutre ou basique, mais précipitent lors de la protonation des carboxylates. Le ratio EtOH/eau proposé permet d'éviter la précipitation au cours du dosage.

Une masse précise d'environ 100 mg de polymère est dispersée dans 10 mL d'eau milliQ sous vive agitation, complétés avec 40 mL d'EtOH absolu après dispersion complète (il est possible de disperser le polymère directement dans 50 mL d'EtOH/eau 80v/20v. Toutefois, la dispersion est beaucoup plus rapide en commençant en milieu aqueux, en raison des charges portées par les polymères). Le dosage est effectué avec une solution d'HCl $5 \cdot 10^{-2}$ M dans un mélange EtOH/eau 80v/20v (pH-mètre 766-calimatic, Knick). Le volume équivalent permet le calcul de la quantité de carboxylates en solution, donnant accès au pourcentage de groupements non-greffés :

$$x = \frac{\frac{n_B}{m} \times M_y}{1 - \frac{n_B}{m} \times (M_x - M_y)} \times 100 \quad [4]$$



où x est le pourcentage de monomères non-greffés, n_B la quantité de carboxylates dosés, m la masse de polymère pesée, et M_x et M_y sont les masses molaires respectives des monomères non-greffés et greffés ($M_x = 94$ g/mol et $M_y = 181$ g/mol dans le cas des CyclAPols porteurs de cycles saturés à 8 carbones).

1.1.4.2. Spectres RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C

La caractérisation des polymères a par ailleurs été complétée via acquisition de spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN), sur la base des travaux d'Anaïs Marconnet³. Les échantillons RMN ont été préparés par dispersion d'environ 200 mg de polymère dans 0,7 mL de méthanol deutéré (CD_3OD). Toutes les acquisitions ont été faites sur la plateforme RMN de Chimie ParisTech, Université PSL, avec la contribution efficace et professionnelle de Marie-Noëlle Rager.

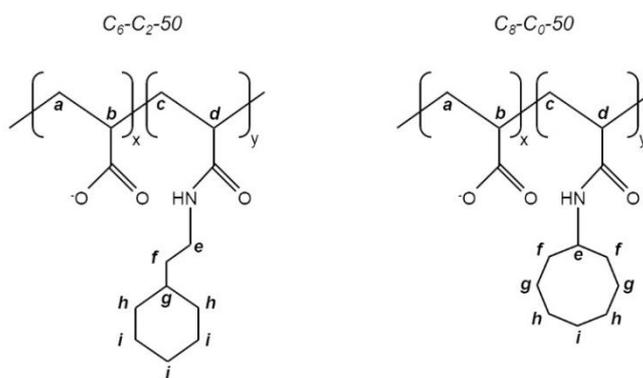


Figure 2.1.2. Schéma illustratif des CyclAPols pour l'attribution des signaux RMN. Les lettres (a-j) indiquent les carbones dans le cadre des spectres ^{13}C , et les protons qu'ils portent dans le cadre des spectres ^1H .

Dans les spectres ^1H , le taux de greffage a été déterminé par intégration des signaux des protons portés par les carbones fonctionnalisés du squelette polymère (signaux b et d superposés, 2 H, [2,0-2,5 ppm]), comparés aux intégrales de signaux bien résolus et propres aux chaînes latérales. Pour le $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-50}$, deux signaux se démarquent par leur facilité d'exploitation, celui des protons en e (2 H, [2,8-3,4 ppm]) et du proton en j (1 H, [0,7-1,0 ppm]). Pour le $\text{C}_8\text{-C}_0\text{-50}$, le principal signal exploitable correspond au proton en e (1 H, [3,7-4,0 ppm]). Le ratio entre l'intégrale d'un signal de la chaîne latérale (représentant la quantité de chaînes présentes, à pondérer par le nombre de protons impliqués) et l'intégrale du signal b + d (représentant la quantité totale de monomères) donne directement accès au taux de greffage moyen de l'échantillon polymère.

Dans les spectres ^{13}C , plusieurs signaux permettent de remonter à l'information sur le taux greffage. Les pics les plus facilement exploitables, communs à tous les CyclAPols, sont ceux des fonctions carboxamides (175 ppm) et carboxylates (185 ppm) : le ratio entre l'intégrale du pic carboxamide et l'intégrale des 2 pics donne immédiatement une première

estimation du taux de greffage. En raison de la faible intensité des spectres ^{13}C , cette estimation peut être comparée aux résultats obtenus en faisant le ratio entre l'intégrale carboxamides + carboxylates (quantité totale de monomères) et des signaux propres aux chaînes latérales. Pour le $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-50}$, les signaux les plus facilement exploitables sont ceux des carbones h (2 C, [32-34 ppm]) ainsi que i + j (3 C, [25-27 ppm]). Pour le $\text{C}_8\text{-C}_0\text{-50}$, les signaux les plus facilement exploitables sont ceux des carbones f (2 C, [32-35 ppm]) ainsi que g + h + i (5 C, [24-29 ppm]).

En fin de caractérisation, le taux de greffage attribué à un lot de polymère est calculé en moyennant le taux obtenu via dosage acido-basique avec la moyenne de tous les taux calculés via intégration de signaux RMN.

1.2. Complément de banque de polymères : CyclAPols à chaînes C_9 et C_{10}

La banque de polymères synthétisée par Anaïs Marconnet dans son projet de thèse inclue des PAA greffés de chaînes alkyl comprenant jusqu'à 8 carbones³. Les tests biochimiques de ces polymères sur leur efficacité à extraire les protéines des membranes a notamment mis en évidence une augmentation des propriétés de solubilisation avec le nombre de carbones composant les chaînes latérales¹⁵⁹. Un bref coup de sonde quant à la longueur optimale des chaînes latérales a été donné en synthétisant les polymères $\text{C}_7\text{-C}_2\text{-50}$ et $\text{C}_8\text{-C}_2\text{-50}$, schématisés en **Figure 2.1.3**. La synthèse et la caractérisation de ces nouveaux polymères a grandement bénéficié de l'assistance de Bénédicte Bonvin, Université Paris-Est Créteil, Val de Marne.

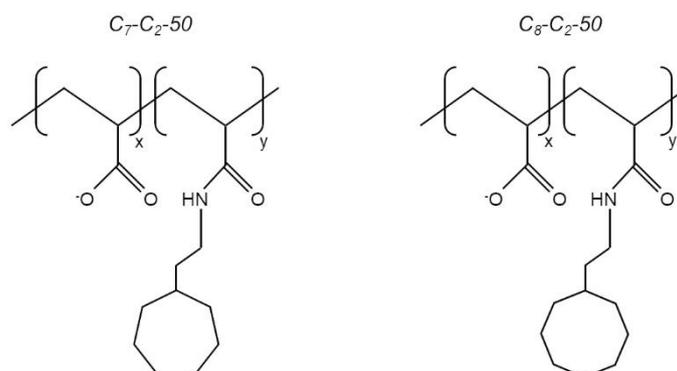


Figure 2.1.3. Schéma illustratif des nouveaux CyclAPols, le $\text{C}_7\text{-C}_2\text{-50}$ et le $\text{C}_8\text{-C}_2\text{-50}$. Les appellations sont basées sur les caractéristiques des chaînes alkyles : dans le cas présent, il s'agit de polymères greffés à 50 % de chaînes composées d'un cycle saturé de 7 (respectivement 8) carbones avec un espaceur de 2 carbones, et reliées au squelette polyacrylique par une liaison amide.

1.2.1. Synthèse du $\text{C}_7\text{-C}_2\text{-50}$ et du $\text{C}_8\text{-C}_2\text{-50}$

Les deux synthèses ont été effectuées en suivant protocole de base, décrit en **Section 1.1** :

- pour le $\text{C}_7\text{-C}_2\text{-50}$, 1,019 g de PAA (14,16 mmol) ont été modifiés avec 1,00 g de 2-cycloheptylethanamine (7,08 mmol) en présence de 1,606 g de DCC (7,79 mmol). Une masse finale de 1,43 g a été obtenue, correspondant à un rendement de 69,9 % ;
- pour le $\text{C}_8\text{-C}_2\text{-50}$, 0,927 g de PAA (12,88 mmol) ont été modifiés avec 1,00 g de 2-cyclooctylethanamine (6,44 mmol) en présence de 1,461 g de DCC (7,08 mmol). Une masse finale de 1,21 g a été obtenue, correspondant à un rendement de 62,0 %.

1.2.2. Taux de greffage et propriétés du C₇-C₂-50 et du C₈-C₂-50

Le taux de greffage obtenu par dosage acido-basique du C₇-C₂-50 et du C₈-C₂-50 est respectivement de 51,5 % et 52,8 %. Ces valeurs sont à considérer avec précaution, dans la mesure où une précipitation des polymères a été observée à l'approche du saut de pH. Toutefois, sachant que les quantités de réactifs ne permettent pas de dépasser 50 % de greffage, les valeurs obtenues sont potentiellement indicatives d'une réaction de greffage quasi-totale.

Le taux de greffage a pu être vérifié par RMN dans le cas du C₇-C₂-50 : les intégrations sur spectre ¹H et ¹³C donnent également des taux proches de 50 %, pour une valeur moyenne finale de 51,0 ± 1,0 %. Pour le C₈-C₂-50, une composition de solvant appropriée pour la dispersion complète du polymère n'a à ce jour pas été trouvée, empêchant l'acquisition de spectres.

Le problème de solubilité de ces deux polymères provient a priori d'un déséquilibre dans la balance hydrophile-hydrophobe : l'augmentation de la taille des chaînes latérales confère une hydrophobie trop importante pour être compensée par les carboxylates du squelette polyacrylique. Avec suffisamment de temps, cette hypothèse serait vérifiable en synthétisant des gammes de polymères à taux de greffage variable afin de tracer l'évolution de la solubilité en fonction du pourcentage de cycles greffés.

L'efficacité de solubilisation du C₇-C₂-50 et du C₈-C₂-50 a quand même pu être testée sur 2 systèmes modèles, la membrane pourpre de *Halobium salinarum* et la membrane d'*Escherichia coli* en suivant la solubilisation de la bacteriorhodopsine (BR) et BmrA, respectivement. Ces deux systèmes sont décrits de manière plus détaillée en **Sections 2 et 3**. Les principaux résultats sont récapitulés en **Figure 2.1.4**.

Dans les conditions utilisées pour la solubilisation de la membrane pourpre, les CyclAPols à chaîne de plus de 8 carbones se sont révélés dotés de propriétés de solubilisation correctes (extraction de près de la moitié de la BR), tout en restant moins efficaces que les CyclAPols de référence, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50 (**Figure 2.1.4 (b)**). Les limites des CyclAPols à chaînes longues disparaissent également dans les tests de solubilisation avec BmrA. À forte concentration, c'est à dire au ratio protéine / polymère de 1:1, ils s'avèrent efficaces (majorité de protéine trouvée dans le surnageant). En revanche, la quantité de protéine extraite chute dès diminution de la concentration en polymère (**Figure 2.1.4 (d)**), tandis que le taux d'extraction en présence des CyclAPols de référence reste élevé à toutes les concentrations testées (**Figure 2.1.4 (c)**).

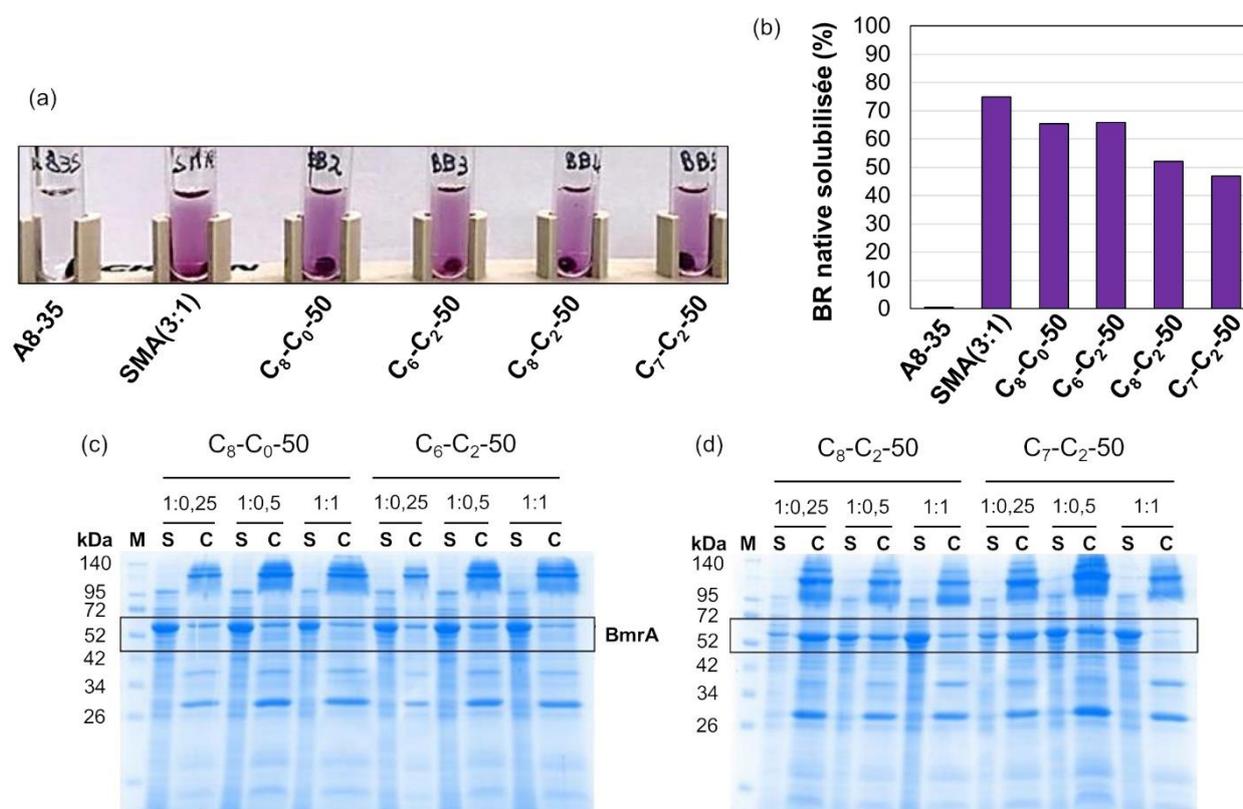


Figure 2.1.4. Propriétés de solubilisation du C₇-C₂-50 et du C₈-C₂-50, comparativement aux CyclAPols de référence, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50. (a) Photographie des tubes de centrifugation après solubilisation, à 25°C sur la nuit, de la membrane pourpre enrichie en DMPC. La coloration violette après centrifugation (200 000 g, 20 min) indique la présence de la BR dans le surnageant. Solubilisation effectuée pour un ratio BR / DMPC de 1:5 (m/m), et un ratio BR / polymère de 1:6,25 (m/m). (b) Quantification de la BR solubilisée, sur la base de l'absorbance à 554 nm caractéristique de la BR native (pour plus de détails se référer à la **Section 2.2.1**). (c) Efficacité de solubilisation de BmrA par les CyclAPols de référence, le C₆-C₂-50 et le C₈-C₀-50 et (d) les CyclAPols à chaînes de plus de 8 carbones. Pour chaque polymère, 3 ratios protéine / polymère : 1:0,25, 1:0,5 et 1:1 (m/m) ont été testés. Après solubilisation (2h, 4°C) et centrifugation (100 000 g, 30 min), les surnageants (S) et culots (C) ont été déposés sur gel (SDS-PAGE 12% acrylamide). Après migration, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie (pour plus de détails se référer à la **Section 2.3.1**). Un grand merci à Bénédicte Bonvin, qui a géré la majeure partie de ces tests de solubilisation.

Ces quelques résultats permettent essentiellement de valider la présence d'un optimum des propriétés de solubilisation en fonction du volume des chaînes latérales des CyclAPols : pour un pourcentage de greffage fixé à 50 %, les chaînes latérales de moins de 8 carbones confèrent aux polymères des propriétés de solubilisation moindres ; en parallèle, l'augmentation de la taille des chaînes au-delà de 8 carbones ne conduit pas, au moins dans les deux cas testés, à une augmentation de l'efficacité de solubilisation, mais plutôt à une perte d'efficacité à faibles concentrations en polymères. Par rapport à l'A8-35, les CyclAPols présentent des propriétés de solubilisation des protéines de leur membrane beaucoup plus systématique, en revanche, à l'instar de l'A8-35 et des autres polymères chargés, les CyclAPols restent limités aux études en milieu neutre ou basique, et sensibles à la présence de cations divalents. Une amélioration future serait le remplacement des carboxylates par des groupements polaires non-chargés, permettant de s'affranchir de la sensibilité au pH (comme déjà effectué dans le cas des NAPols, Amphipols neutres comportant des groupements sucrose)^{76,77}. Dans cette optique, un travail exploratoire est en cours, basé sur l'utilisation de chaînes polyéthylène glycol (PEG) pour apporter l'hydrophilie aux CyclAPols.

1.3. Synthèse de CyclAPols fonctionnalisés : ajout de groupement tetrazine

Outre la synthèse de CyclAPols à chaînes de plus de 8 carbones, un projet de synthèse de CyclAPols fonctionnalisés a commencé à voir le jour. Ce travail s'inscrit dans une collaboration avec Eric Gouaux, Vollum Institute, Oregon Health & Science University, Portland. L'idée de base est d'utiliser le couple de chimie click tetrazine – trans-cycloOctyne^{165,166} (Tz – TCO) utilisable dans des conditions physiologiques pour permettre une interaction ciblée des CyclAPols avec la protéine d'intérêt. La mise en application consiste d'une part à greffer la protéine cible avec une fonction TCO, géré par l'équipe d'Eric Gouaux, et d'autre part à un greffage de fonction Tz sur les CyclAPols. Les premiers pas dans la mise au point de la fonctionnalisation Tz des CyclAPols sont présentés ci-après.

1.3.1. 1^{ère} tentative : protocole existant de greffage mixte

La synthèse de CyclAPol portant une fonction Tz a été effectuée sur la base du protocole de préparation de l'A8-35, décrit initialement par Tribet *et al.*⁶³ et repris par Anaïs Marconnet dans son travail de thèse : la réactivité des groupements carboxyliques décroissant graduellement au fur et à mesure de leur modification, une activation supplémentaire devient nécessaire lorsque plus de 50 % des groupements sont modifiés. Le greffage se fait alors en 2 temps : réaction de la première amine en présence de DCC (**Figure 2.1.1**), puis réaction de la seconde amine en présence du couple DCC/1-hydroxybenzotriazole (HOBt)¹⁶⁷ (**Figure 2.1.5**).

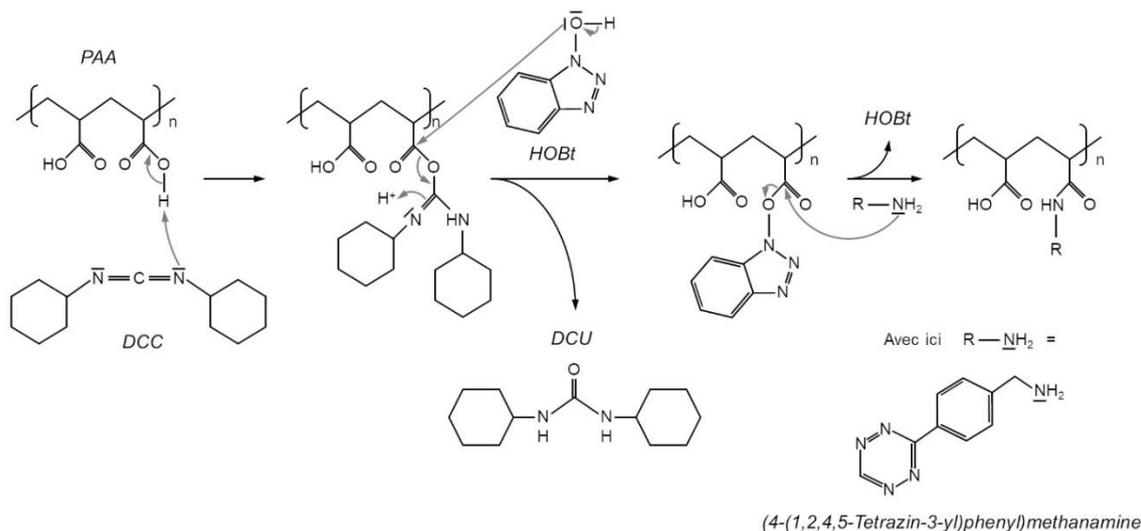


Figure 2.1.5. Mécanisme de formation de la liaison amide via activation des fonctions carboxyliques par le couple DCC/HOBt¹⁶⁷ dans la synthèse de l'A8-35.

La première modification du PAA a été effectuée comme décrit en **Section 1.1.2**, quoiqu'en travaillant sur des quantités moindres (période de mise au point). 0,674 g de PAA (9,36 mmol de fonctions carboxyliques, 1 équ.) sont placés dans un bicol de 100 mL, puis dissous dans 20 mL de N-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP) sous agitation vigoureuse (60°C, 4 h). 0,595 g (0,642 mL, 4,68 mmol, 0,5 équ.) de 2-cyclohexylethylamine sont introduits dans l'ampoule de coulée, dilués avec 2 mL de NMP, puis ajoutés goutte à goutte dans le réacteur.

15 minutes après la fin de l'ajout, 1,062 g de N,N'dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (5,15 mmol, 0,55 équ.), préalablement dissous dans 3 mL de NMP, sont introduits dans l'ampoule de coulée puis ajoutés goutte à goutte. Le réacteur est maintenu sous vive agitation à 60°C pendant 2 h, puis est poursuivie sans chauffage et sous agitation faible sur la nuit. Le mélange réactionnel est filtré sur fritté de porosité 4, éliminant la DCU ayant précipité, avant d'être ré-introduit dans un bicol de 100 mL. A ce stade, le mélange réactionnel contient théoriquement du C₆-C₂-50 à purifier.

La seconde modification (greffage de la fonction Tz) a été effectuée en visant en moyenne un groupement Tz par polymère. Le degré moyen de polymérisation en nombre (DP_n) du PAA utilisé ayant été estimé à 35⁶⁶ (35 unité/polymère en moyenne), cette étape a été menée avec 1/35 équ. d'amine.

Le mélange réactionnel, ré-introduit dans un bicol de 100 mL, est chauffé à 50°C sous agitation, avant introduction de 1,265 g de HOBt (9,36 mmol, 1 équ.). 50 mg de (4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methanamine hydrochloride (0,267 mmol, 0,029 équ., disponible commercialement sous forme de poudre rouge/rose), préalablement dissous dans 2 mL de NMP, sont ensuite additionnés au goutte à goutte. 10 minutes après, 60,60 mg de DCC (0,294 mmol, 0,031 équ., 10 % d'excès par rapport à la quantité de réactif Tz), préalablement dissous dans 2 mL de NMP, sont additionnés au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est maintenu à 50°C sous vive agitation pendant 1 h, puis ramené à température ambiante et agitation moyenne pendant 3 h, avant d'être filtré sur fritté de porosité 4, éliminant la DCU ayant précipité. Contrairement aux synthèses précédentes, le polymère obtenu présente une forte coloration rose (**Figure 2.1.6**), résultant de la présence des groupements phényl-tétrazine. 1,011 g de méthanolate de sodium (18,72 mmol, 2 équ.), sont ajoutés au filtrat sous agitation moyenne. Après 15 minutes, la solution est diluée dans 400 mL d'eau milliQ, avant d'ajuster le pH à 10 avec une solution de NaOH à 11 M. Le tout est maintenu sous agitation pendant 1 h, avant d'être transféré dans un pot de 500 mL et centrifugé à 5 000 rpm pendant 30 min, sédimentant la DCU nouvellement précipitée.



Figure 2.1.6. Allure du mélange réactionnel avant ajout du méthanolate de sodium lors de la synthèse du C₆-C₂-50 fonctionnalisé à la tétrazine (C₆-C₂-50-Tz).

La suite du protocole, c'est-à-dire la purification des polymères greffés, a été amorcée comme décrit en **Section 1.1.3**. Toutefois, une perte significative de coloration a été observée sur les premiers cycles de précipitation en milieu acide / redispersion en milieu basique, jusqu'à revenir à un polymère complètement blanc, potentiellement signe d'une dégradation du nouveau groupement lors d'une exposition aux pH extrêmes. Jusque-là, les cycles de purification étaient faits avec un fort accès d'acide puis de base, afin de garantir une précipitation puis une redispersion complète des polymères. Un bref test d'incubation d'un petit volume de (4-(1,2,4,5-Tétrazin-3-yl)phenyl)methanamine hydrochloride en milieu aqueux à pH 2 et 9 ne révélant pas modification dans le spectre UV-Vis du composé au cours des 72 premières heures, une seconde tentative de synthèse a été effectuée, en adaptant le protocole de purification de manière à rester proche de cette gamme de pH.

1.3.2. 2nde tentative : ajustement des conditions de purification

La seconde tentative a été amorcée en suivant le même protocole de greffage, avec des quantités de réactifs réduites : 0,337 g de PAA (4,67 mmol, 1 équ.) ont été modifiés avec 297 mg de 2-cyclohexylethylamine (2,34 mmol, 0,5 équ.) en présence de 530,4 mg de DCC (2,57 mmol, 0,55 équ.), avant d'être modifié dans un second temps avec 25 mg de (4-(1,2,4,5-Tétrazin-3-yl)phenyl)methanamine hydrochloride (0,134 mmol, 0,029 équ.) en présence de 631,6 mg de HOBt (4,67 mmol, 1 équ.) et de 30,31 mg de DCC (0,147 mmol, 0,031 équ.).

Après filtration sur fritté, l'acidité du mélange est neutralisée avec ajout de méthanolate de sodium sans excès : 505 mg soit 9,35 mmol (2 équ.), qui neutralisent l'acidité des groupements carboxyliques (1 équ.) et du HOBt (1 équ.). Après 15 minutes, la solution est diluée dans 500 mL d'eau milliQ, avant d'ajuster le pH à 8 avec une solution de NaOH à 11 M. Après 30 minutes, le tout est réparti dans des pots de 500 mL et centrifugé à 7 500 rpm pendant 30 min. Le surnageant est récupéré et ajouté goutte à goutte dans 117 mL de HCl 0,1 M (volume plus important que pour les cycles suivants, effectué avec 23,4 mL de HCl 0,1 M, en raison de la présence de HOBt non-encore éliminé), préalablement dilués avec 1 L d'eau milliQ (200 mL pour les cycles suivants). Le pH obtenu, d'une valeur de 4, ne permettant pas la précipitation complète du polymère (filtrat rose après passage sur fritté), un ajustement à pH 3 (toujours insuffisant), puis à pH 2 est effectué sous vive agitation avec une solution de HCl 12 M. Le polymère ainsi filtré conserve une coloration rose prononcée (**Figure 2.1.7**).



Figure 2.1.7. Allure du polymère C₆-C₂-50-Tz après la première précipitation en milieu acide, puis filtration sur fritté (porosité 4).

Le polymère précipité est ensuite récupéré et dispersé dans 500 mL de NaOH à 4,68 mmol/L (2,34 mmol, 1 équ. vis-à-vis des carboxylates libres). La solution obtenue, de pH 6-7, est ajustée à pH 8 avec du NaOH 11 M sous vive agitation, avant d'être centrifugée (7 500 rpm 30 min) et filtrée sur membrane PES 0,45 μm , montée sur un porte-filtre Merck Millipore. Ce cycle de précipitation en milieu acide (200 mL à 11,7 mmol/L, 2,34 mmol, équilibrage à pH après ajout), filtration, redispersion en milieu basique (200 mL à 11,7 mmol/L, 2,34 mmol, équilibrage à pH 8 après dispersion), centrifugation, puis filtration de nouveau, a été effectué 2 fois supplémentaires, jusqu'à absence de traces de DCU. Au dernier cycle, le volume de solution basique dans lequel le polymère est redispersé est réduit à 20 mL en prévision de la dialyse, et la filtration finale est effectuée sur membrane PES 0,22 μm . Une atténuation de la coloration s'étant produite à cette étape (2,34 mmol de NaOH dans 20 mL donne un pH proche de 13), une redispersion en milieu tamponné (Trisma base par exemple) serait probablement un plus pour les futures synthèses, quitte à allonger la durée de la dialyse qui suit.

Une fois finis les cycles de précipitation/redispersion, la solution basique finale est dialysée (Spectrapore, MWCO 8 000 g/mol) pendant une journée contre 3 bains de 2 L d'eau milliQ, avec ajout de 212 μL de NaOH 11 M dans le dernier bain (déprotonation des carboxylates, garantissant la solubilité du polymère en solution aqueuse). Le dialysat est enfin récupéré et lyophilisé : le C₆-C₂-50-Tz est obtenu sous forme de poudre légèrement rosée et hygroscopique, avec un rendement d'environ 65 %, et un taux total de greffage estimé à 53,5 \pm 3,6 % (46,5 \pm 3,6 % de carboxylates libres). La faible quantité de Tz n'ayant pas permis de discerner de différences à la fois significatives et exploitables dans les spectres RMN ¹H et ¹³C (**Figure 2.1.8**), une quantification des groupements par analyse colorimétrique a été testée.

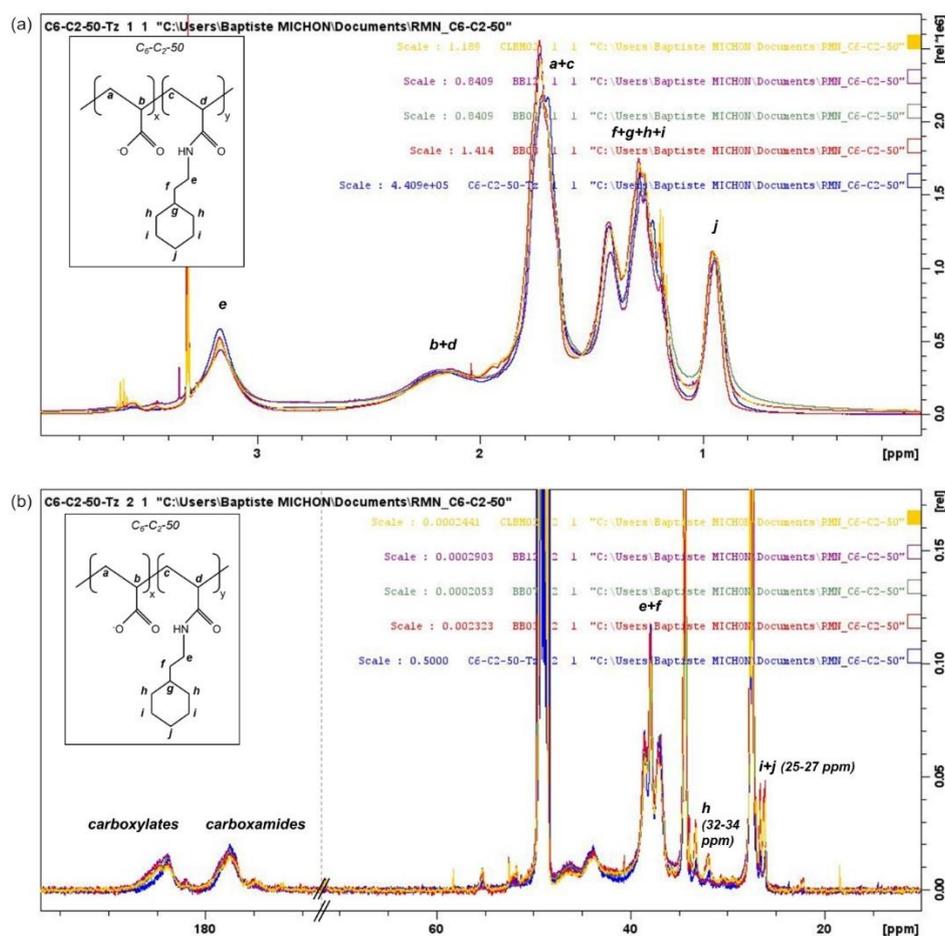


Figure 2.1.8. Spectres RMN (a) ¹H et (b) ¹³C du C₆-C₂-50-Tz (bleu), superposés avec les spectres équivalents de 4 lots de C₆-C₂-50 traditionnel.

1.3.3. Estimation du taux de greffage des groupements Tz

Le taux de greffage des groupements Tz a été estimé en mettant à profit la coloration caractéristique de la (4-(1,2,4,5-Tétrazin-3-yl)phényl)méthanamine hydrochloride. L'acquisition d'un spectre UV-vis sur une solution de Tz reprise dans de l'eau milliQ a permis de vérifier la présence d'un pic d'absorption dans le visible, avec $\lambda_{\max} = 520$ nm. L'acquisition de spectres sur une gamme de solutions de Tz en eau milliQ (**Figure 2.1.9**) a ensuite servi de base au calcul du coefficient d'extinction molaire de la Tz, estimé ici à $285,8 \pm 2,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (avec $M_{\text{Tz}} = 183,2 \text{ g/mol}$).

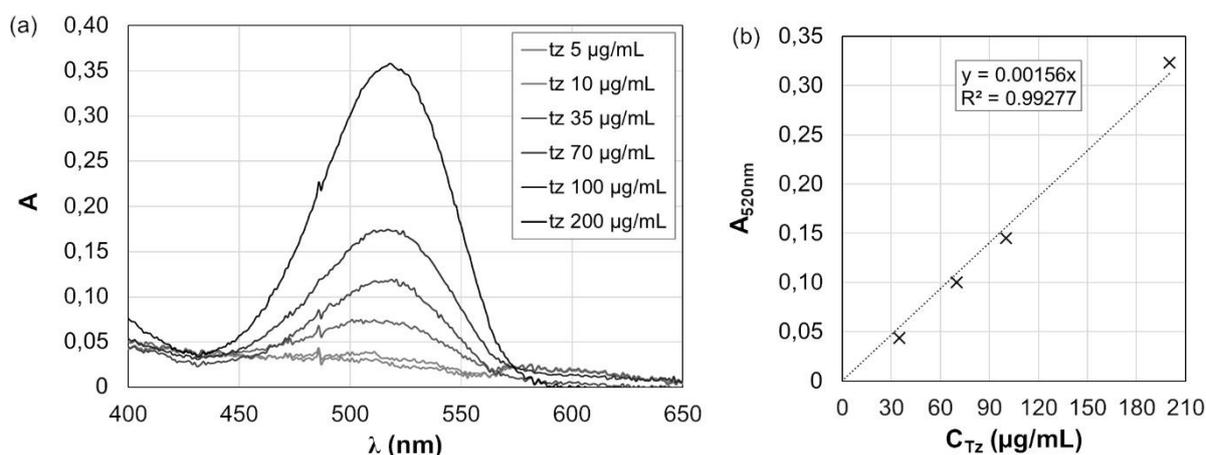


Figure 2.1.9. Estimation du taux de greffage des groupements Tz. (a) Variation des intensités des spectres d'absorption de solutions de Tz avec la concentration. (b) Courbe étalon reliant l'intensité du pic d'absorption à 520 nm avec la concentration en Tz. Les valeurs ont été mesurées à 520 nm, en prenant une ligne de base entre 430 et 570 nm.

Une gamme de solutions de C₆-C₂-50-Tz a ensuite été préparée par dispersion de masses précises de polymères dans de l'eau milliQ. L'acquisition de spectres, suivie de la mesure du maximum d'absorption à 520 nm dans les cas qui s'y prêtaient (signal bruité pour $C_{\text{polymère}} < 10 \text{ mg/mL}$, et saturé pour $C_{\text{polymère}} > 50 \text{ mg/mL}$), a permis d'estimer la quantité de Tz présente, et de la comparer à la quantité de polymère ($M_{\text{polymère}} \approx 4\,940 \text{ g/mol}$) introduite. Le ratio molaire Tz/polymère ainsi obtenu, égal à $0,128 \pm 0,015$, peut se traduire de manière plus imagée comme la présence d'un groupement Tz toutes les $7,8 \pm 0,9$ chaînes de polymères, soit vraisemblablement une fonction Tz par agrégats. Bien que l'on soit assez loin de l'objectif initial d'une fonction par chaîne, le ratio d'une fonction par agrégat devrait être suffisant pour cibler des protéines marquées d'un groupement TCO, ce qui a motivé l'envoi de ce prototype à l'équipe d'Eric Gouaux pour de premières investigations de solubilisation localisée de la membrane. En cas de résultats encourageants, la piste principale d'optimisation pour la synthèse de C₆-C₂-50-Tz serait d'effectuer les cycles de purification en milieux tamponnés, afin de limiter au maximum la dégradation des groupements Tz lors de l'exposition aux pH extrêmes. En parallèle, une augmentation du nombre d'équivalents de réactif Tz initialement introduits reste envisageable, avec toutefois quelques précautions à prendre : à mon sens, un déficit est moins dommageable qu'un excès de groupements Tz, qui impliquerait l'existence de chaînes multi-fonctionnalisées, potentiellement capables de former des ponts entre protéines, voire d'en provoquer l'agrégation. Avec ça en tête, et en fonction des résultats obtenus avec le premier lot, il pourra s'avérer salutaire de viser à l'avenir des ratios garantissant la présence d'une Tz par agrégat de polymères plutôt que par chaîne polymère.

2. Preuve de concept : cas de la membrane pourpre

Parmi la banque des 27 polymères dérivés de l'A8-35 synthétisés par Anaïs Marconnet au cours de son doctorat³, 2 CyclAPols ont été choisis en tant que polymères les plus prometteurs après comparaison de leurs propriétés de solubilisation sur divers systèmes modèles, incluant notamment la membrane d'*E. coli* exprimant une version de YidC fusionnée à la GFP et la bacteriorhodopsine de la souche *Haloquadratum walsbyi* (HqBR). S'en est suivie une étude plus spécifiquement orientée sur la comparaison des propriétés des CyclAPols avec celles de l'A8-35 historique, ainsi que de l'autre famille de polymères de référence, les SMA (copolymère de styrène et d'acide maléique, styrene maleic acid copolymer)⁴.

En particulier, cette étude a inclus des tests effectués sur la bacteriorhodopsine exprimée dans la membrane pourpre de *Halobacterium salinarum* (HsBR, homotrimère de 26,8 kDa). Outre le fait que cette protéine ait déjà fait l'objet de multiples études^{17,143,146,168}, son intérêt en tant que système modèle repose sur 2 propriétés assez remarquables. D'une part, la BR est capable de lier un chromophore, le rétinol, lui conférant une absorbance proche de 570 nm sujette à des shifts en fonction de son environnement¹⁶⁹, allant de pair avec une couleur pourpre caractéristique, à l'origine du nom donné à la membrane la contenant : cette propriété peut être mise à profit pour facilement quantifier le matériel en solution. D'autre part, il s'agit de l'unique PM présente dans la membrane pourpre (composée à 66 % en poids de BR, le reste de la masse étant répartie entre lipides apolaires (10 %) et lipides polaires dérivés du sn-2,3-di-ophytanyl-glycerol (90 %) ¹⁷⁰), permettant de s'affranchir d'éventuelles étapes de purification post-solubilisation.

A mon arrivée, le projet de solubilisation de HsBR de la membrane pourpre était déjà amorcé. En particulier, la difficulté à solubiliser la membrane native, imputée à la très forte densité de protéine, avait déjà été rencontrée, et palliée par un enrichissement de la membrane avec de la 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) dans le cadre de travaux similaires menés avec les SMAs^{130,171}. Dans les expériences réalisées au laboratoire, cet enrichissement entraînait toutefois de fortes variabilités dans l'efficacité de solubilisation observée pour la gamme de polymères testés (en particulier dans le cas des SMAs). Les objectifs étaient donc de trouver le ou les paramètres à contrôler pour améliorer la reproductibilité, puis de comparer l'efficacité des CyclAPols aux polymères de référence, A8-35 et SMAs, avant d'émettre et de tester des hypothèses sur les caractéristiques à l'origine des modifications de solubilisation. Ce projet a bénéficié de l'aide très appréciée de Christel Le Bon et d'Elodie Point, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, pour la production de membrane pourpre, ainsi que de celle de Christophe Tribet, département de Chimie de l'ENS Paris, pour les expériences de DLS.

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Production et solubilisation de la membrane pourpre

2.1.1.1. Préparation des membranes

Les membranes utilisées sont les mêmes que celles utilisées dans la référence Marconnet *et al.* (2020)⁴, avec une préparation faite sur la base de travaux antérieurs¹⁷². Dans les grandes lignes, la culture est réalisée à 40°C dans un milieu essentiellement composé de chlorure de sodium (25 %), contenant en plus du chlorure de potassium (0,2 %), du citrate de sodium (0,3 %), du sulfate de magnésium (2 %), et de la peptone bactériologique (1,2 %). Après 3 jours d'incubation, la culture est induite par illumination du milieu pendant 4 jours supplémentaires, puis récoltée (centrifugation 10 000 g à 4°C pendant 10 min) et resuspendue

dans du milieu de culture sans peptone, avec ajout d'ADNase. Les cellules sont cassées par choc osmotique en réalisant une dialyse (Spectrapore, MWCO 12-14 000 g/mol) contre du tampon phosphate (20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl pH 7,0), à 4°C et à l'abri de la lumière. Les membranes pourpres sont séparées du reste des débris cellulaires, plus petits, par centrifugation (35 000 rpm/140 000 g à 4°C pendant 50 min, puis resuspendues en eau milliQ, cycle effectué 4 fois), avant d'être centrifugée (35 000 rpm à 4°C pendant environ 15 h) sur gradient linéaire de saccharose (30 % à 50 %). La bande de la membrane pourpre (couleur violette) est enfin récupérée, séparée du saccharose par centrifugation (35 000 rpm à 4°C pendant 50 min, puis resuspension en eau milliQ, cycle effectué 6 fois), et resuspendue dans un petit volume de tampon phosphate. La concentration des stocks obtenus, de l'ordre de 5 mg/mL, est mesurée par spectrométrie UV-Vis (λ_{max} 570 nm, coefficient d'extinction molaire 63 000 M⁻¹.cm⁻¹ pour la HsBR), puis les échantillons sont aliquotés, congelés et gardés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.1.2. Fusion des membranes avec des liposomes de DMPC

Les solutions stock de liposomes de DMPC sont préparées par dispersion de 50 mg de DMPC dans 1 mL de tampon phosphate (20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl pH 7,0), puis après extrusion (Mini Extruder, Avanti Polar Lipids) via 20 passages à travers une membrane polycarbonate calibrée avec des pores de 100 nm de diamètre (Whatman Nucleopore 'track etched' membranes). Le stock obtenu est ensuite aliquoté, congelé et gardé à -80°C jusqu'à utilisation.

Un volume approprié de liposomes de DMPC (50 mg/mL) est mélangé à la solution de la membrane pourpre (env. 5 mg/mL, remesurée par spectrométrie UV-Vis avant chaque fusion) pour atteindre le ratio massique HsBR/DMPC souhaité (ratios testés : 1/3, 1/4, 1/5, 1/6). L'échantillon est ensuite dilué avec du tampon phosphate (20 mM phosphate de sodium, 100 mM NaCl pH 7,0) pour atteindre une concentration finale en HsBR de 0,5 mg/mL, avant d'être incubé dans un bain de sonication (VWR ultrasonic cleaner) pendant 30 min à l'abri de la lumière, sur la base de protocoles existants^{130,171}. L'échantillon de protéoliposomes (liposomes de DMPC fusionnés avec la membrane pourpre) est enfin aliquoté, congelé et gardé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.1.3. Solubilisation de la membrane pourpre enrichie en DMPC

La solubilisation des protéoliposomes membrane pourpre/DMPC se fait par mélange volume à volume d'un échantillon de membrane tel que préparé en **Section 2.1.1.2** avec un volume égal de solution polymère, auparavant diluée avec du tampon phosphate pour permettre l'obtention du ratio massique HsBR/polymère souhaité (concentration finale en HsBR de 0,25 mg/mL, ratios testés : 1/3, 1/4,5, 1/6,25, 1/7,5, 1/9). L'échantillon obtenu est ensuite incubé sous agitation sur la nuit (ThermoMixer Eppendorf, agitation à 800 rpm, 20 h à 25°C). Un contrôle positif de solubilisation peut être effectué via incubation de protéoliposomes en présence d'OTG pendant 1 h à 4°C et à l'obscurité. En fin de solubilisation, l'absorbance à 554 nm ($A_{554 \text{ nm}}$) est mesurée (référence indiquant la quantité totale de BR en solution), avant de centrifuger l'échantillon (200 000 g à 4°C pendant 20 min) : la taille et la couleur du culot (exemple en **Figure 2.1.4 (a)**) permet d'estimer rapidement une différence d'efficacité dans la solubilisation en fonction des conditions, tandis que la mesure de l' $A_{554 \text{ nm}}$ du surnageant post-solubilisation en permet la quantification. Les résultats d'efficacité de solubilisation présentés résultent du ratio $A_{554 \text{ nm}}$ post-solubilisation / $A_{554 \text{ nm}}$ pré-solubilisation.

2.1.1.4. Thermostabilité post-solubilisation

La variation de la stabilité de HsBR en fonction de l'environnement tensioactif est estimé via suivi de la dégradation lors d'une exposition à haute température : le surnageant récupéré post-solubilisation est incubé à 50°C sous agitation (ThermoMixer Eppendorf, 800 rpm, 6 h à 50°C et à l'abri de la lumière), avec mesure de l' $A_{554 \text{ nm}}$ toutes les heures. Les pourcentages de HsBR non-dégradée présentés par la suite résultent du ratio $A_{554 \text{ nm}}$ au temps $t / A_{554 \text{ nm}}$ à t_0 (égal à $A_{554 \text{ nm}}$ post-solubilisation).

2.1.1.5. Cinétique de solubilisation : suivi par DLS

La cinétique de solubilisation des protéoliposomes peut être suivie par DLS (angle fixe de 90°, excitation laser à 637 nm, mesures effectuées à 25°C) : la solubilisation est amorcée de la même manière que précédemment, par un mélange volume à volume d'un échantillon de protéoliposomes avec un volume égal de solution de polymère, avant de mesurer l'évolution au cours du temps du signal obtenu en DLS. L'intensité du signal est corrélée à la taille des objets présents en solution (plus l'objet est grand, plus l'intensité est élevée), permettant de comparer la vitesse avec laquelle chaque tensioactif est capable de réduire la taille et/ou la concentration des gros objets, en l'occurrence ici, les protéoliposomes en solution.

2.1.2. Caractérisation de l'association des polymères en agrégats

2.1.2.1. Mesures des intensités de fluorescence de la sonde pyrène

Les mesures de fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluorimètre PTI (Photon Technology International, London, Ontario, Canada) contrôlé avec le logiciel Felix, en utilisant le pyrène comme sonde fluorescente (**Figure 2.2.1**). Le choix du pyrène a été motivé par la variation de ses propriétés de fluorescence en fonction de son micro-environnement : en particulier, le ratio des intensités du 1^{er} et 3^e pic de fluorescence du pyrène dépend fortement de la polarité de son micro-environnement, avec un ratio I_1/I_3 proche de 1,9 pour les environnements polaires, pouvant descendre jusqu'à 0,5 pour les environnements les plus apolaires^{173,174}. Cette caractéristique peut être mise à profit pour suivre l'auto-association des tensioactifs en solution en fonction de leur concentration et estimer la CMC/CAC d'un détergent/polymère^{175,176} : sous la concentration critique, l'absence de micelles ou d'agrégats garantie une exposition du pyrène à un environnement aqueux ; au-dessus de la concentration critique, le pyrène partitionne entre milieu aqueux et le cœur hydrophobe des micelles ou agrégats formés, entraînant une diminution du ratio I_1/I_3 . Ce ratio atteint par ailleurs un plateau bas lorsque la quantité de micelles/agrégats devient suffisante pour incorporer la totalité du pyrène, la valeur de ce plateau donnant ainsi une indication sur l'hydrophobie de leur cœur.

Des solutions de pyrène sont préparées au préalable par dispersion de pyrène solide (Sigma) dans de l'éthanol absolu afin d'atteindre une concentration en pyrène de $6 \cdot 10^{-5}$ M. Ces solutions stocks sont conservées à température ambiante à l'abri de la lumière, puis utilisées dans les 5 jours qui suivent leur préparation. 6 μ L de solution stock de pyrène sont ajoutés dans 600 μ L de solution polymère à la concentration souhaitée (concentration finale en pyrène de $6 \cdot 10^{-7}$ M), puis la solution marquée est laissée à équilibrer pendant 18 h à l'abri de la lumière. Sur la base des travaux de Wilhelm et al.¹⁷⁵, 3 spectres ont été acquis pour chaque solution testée : 1 spectre d'excitation sur la plage [300 – 360 nm], avec $\lambda_{\text{émission}} = 390$ nm, et 2 spectres d'émission sur la plage [360 – 460 nm], avec $\lambda_{\text{excitation}} = 334$ nm et 339 nm.

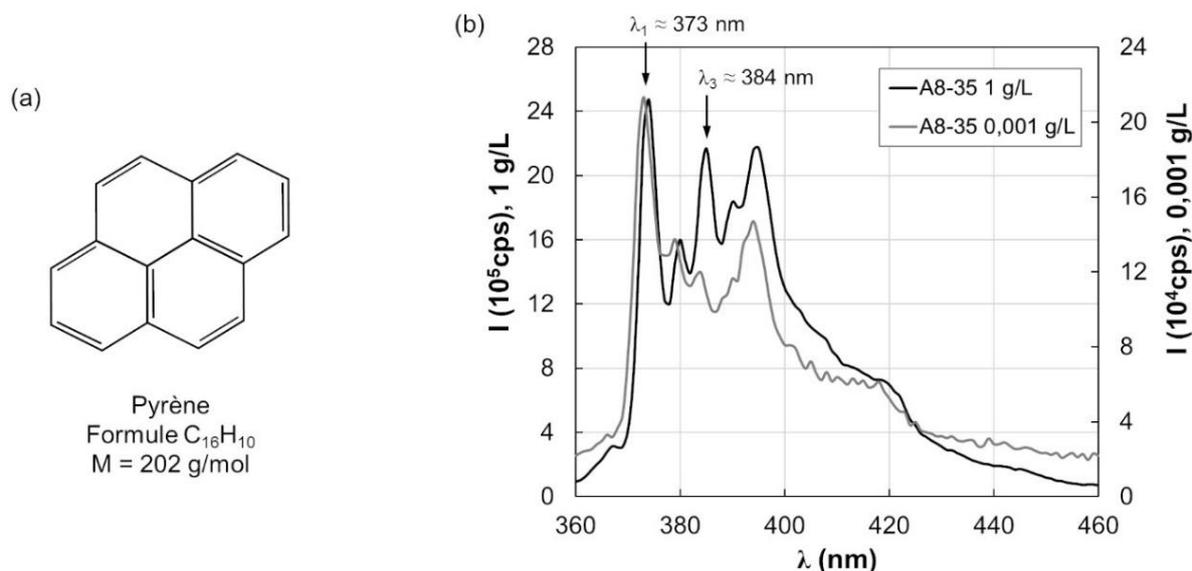


Figure 2.2.1. Illustration du principe des mesures de fluorescence effectuées avec la sonde pyrène. (a) Structure et formule du pyrène. (b) Superposition de spectres de fluorescence (excitation 334 nm) acquis pour des solutions d'A8-35 à 0,001 et 1 g/L, en présence de $6 \cdot 10^{-7}$ M de pyrène. Le ratio des intensités du 1^{er} et 3^e pic, proches de 373 et 384 nm respectivement, varie en fonction du micro-environnement auquel la sonde est exposée.

2.1.2.2. Estimation de la CAC par mesure de tension de surface

Les mesures de tension de surface ont été effectuées à l'aide d'un appareil Tracker, décrit plus en détail dans le **Chapitre 1**, en **Section 2.2.1**. La tension de surface γ reflète l'énergie nécessaire à la création et au maintien d'une interface (ici interface air/eau). L'adsorption de tensioactif à l'interface entraîne une diminution de γ , permettant notamment une estimation de la CMC/CAC d'un détergent/polymère : la tension de surface à l'équilibre, $\gamma_{\text{éq}}$, diminue avec l'augmentation de la concentration en tensioactif, en atteignant un plateau lors du dépassement de la CMC/CAC (concentration fixe et maximale de tensioactif isolé). En cas de durée élevée avant atteinte de $\gamma_{\text{éq}}$, sa valeur peut être extrapolée à l'aide de l'équation [3], décrivant le comportement de γ aux temps longs^{65,89} :

$$\gamma(t)_{t \rightarrow \infty} = \gamma_{\text{éq}} + \frac{RT \cdot \Gamma^2}{C} \sqrt{\frac{\pi}{2 \cdot D \cdot t}} \quad [3]$$

où RT est le coefficient de Boltzmann, C est la concentration de tensioactif, D est le coefficient de diffusion, et Γ est la surface occupée par le tensioactif lorsque l'interface est saturée.

2.2. Membrane pourpre vs batterie de tensioactifs

La majorité des résultats présentés ici sont publiés et discutés dans la référence suivante : A. Marconnet, B. Michon, C. Le Bon, F. Giusti, C. Tribet and M. Zoonens, "Solubilization and stabilization of membrane proteins by cycloalkane-modified amphiphilic polymers", *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, 3459-3467 (doi: 10.1021/acs.biomac.0c00929)⁴.

A mon arrivée, l'étude des propriétés de solubilisation des différents polymères sur la membrane pourpre avait montré une variabilité importante dans les résultats obtenus, notamment pour la solubilisation par le SMA(3:1)³. Par ailleurs, la solubilisation de la membrane d'*E. coli* exprimant la BR de la souche *Haloquadratum walsbyi* (HqBR) avait montré que l'ajout de DMPC fusionné à la membrane d'*E. coli* améliorait les rendements de solubilisation.^{4,177} Ma première idée et contribution a été de regarder l'impact de l'enrichissement en DMPC sur l'efficacité de solubilisation de la membrane pourpre (jusqu'à, les solubilisations étaient effectuées à un ratio massique HsBR/DMPC de 1/5). Ces résultats sont présentés en **Figure 2.2.2**.

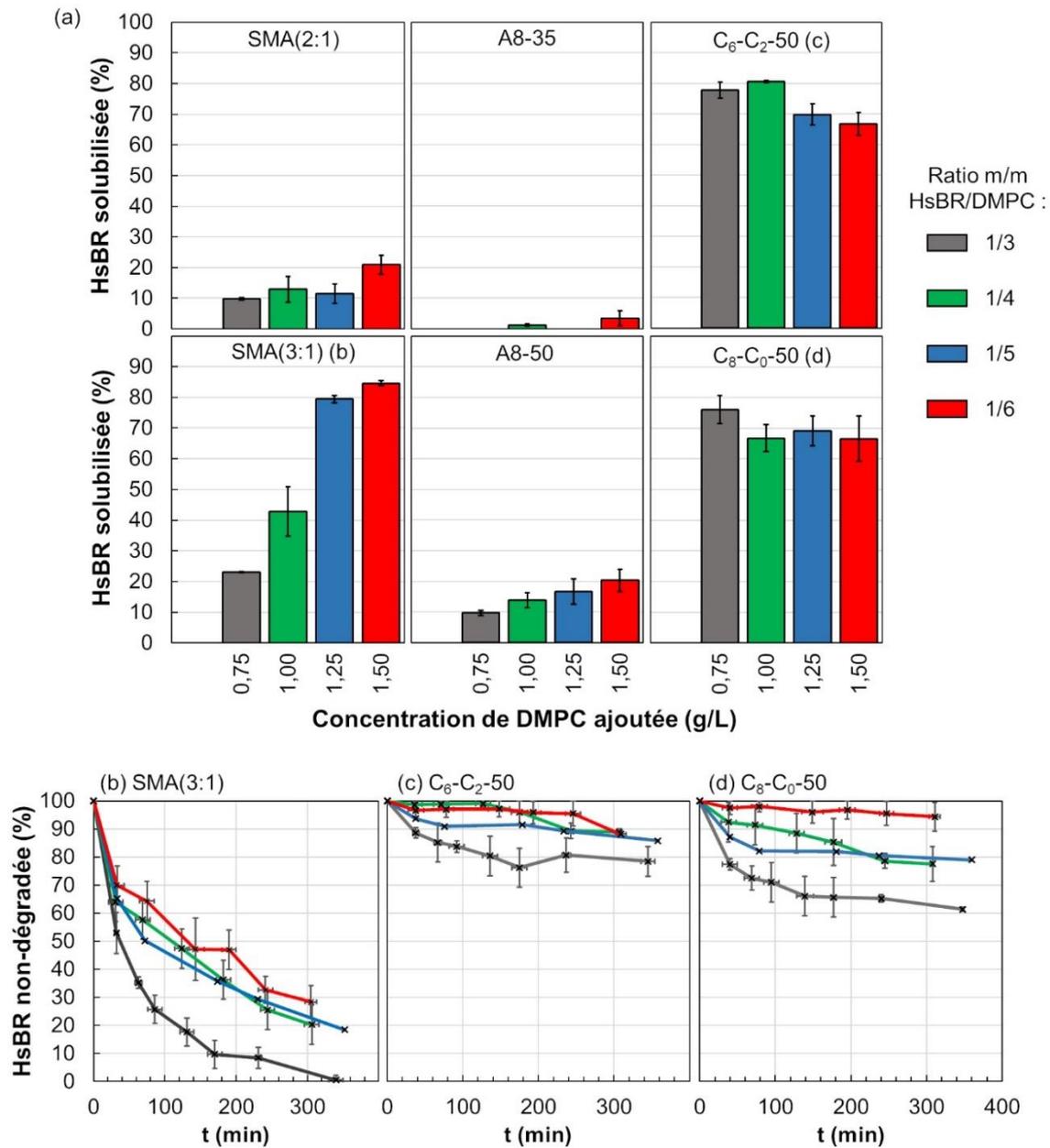


Figure 2.2.2. Variation de l'efficacité de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC et de stabilisation de la HsBR en fonction de l'enrichissement en DMPC pour différents polymères. Toutes les solubilisations ont été effectuées à un ratio HsBR/polymère de 1/6,25 (m/m). (a) Variation de l'efficacité de solubilisation de 6 polymères pour 4 ratios HsBR/DMPC. (b-d) Cinétique d'inactivation de la HsBR solubilisée aux différents ratios HsBR/DMPC lors d'une incubation à 50°C. Les cinétiques représentées correspondent aux polymères présentant la meilleure efficacité de solubilisation : SMA(3:1) (b), C₆-C₂-50 (c) et C₈-C₀-50 (d).

L'A8-35 s'est révélé peu propice à la solubilisation des protéoliposomes à tous les ratios HsBR/DMPC testés, en opposition aux deux CyclAPols, efficaces à chacun des ratios compris entre 1:3 et 1:6. Afin de vraiment mettre l'emphase sur l'impact de la structure des chaînes latérales, cette étude a également inclus l'A8-50, polymère avec le même squelette PAA et taux de greffage que les CyclAPols, mais greffé de chaînes octyl linéaires, à l'instar de l'A8-35 : les faibles taux de solubilisation associés soulignent l'importance de la structuration cyclique au sein des chaînes latérales pour favoriser la solubilisation. Enfin, parmi les deux SMAs commerciaux testés, celui le plus efficace (SMA(3:1)) a exhibé une forte sensibilité à la quantité de lipides ajoutés, donnant une piste d'explication aux variabilités observées en début de projet : une imprécision sur la concentration de HsBR et/ou sur le ratio HsBR/DMPC aura peu d'impact sur les polymères testés, à l'exception du SMA(3:1), pour qui l'efficacité de solubilisation peut varier du simple au double avec un simple passage d'un ratio 1/4 à un ratio 1/5.

La stabilité de la HsBR solubilisée a ensuite été testée, dans le cas des 3 polymères présentant les meilleures capacités de solubilisation (**Figure 2.2.2 (b-d)**). La HsBR solubilisée en SMA(3:1) s'est révélée assez instable au plus faible ratio HsBR/DMPC testé, avec une dégradation de $90 \pm 5\%$ de la HsBR initialement solubilisée après 3 h d'incubation à 50°C. L'enrichissement en DMPC permet de mitiger cette instabilité, bien qu'une incubation de 2 h reste toujours suffisante pour dégrader la moitié du matériel. En comparaison, la HsBR a exhibé une importante résilience en environnement CyclAPol (sensiblement plus de la moitié du matériel non-dégradé après plus de 5 h d'incubation à 50°C), avec également une légère amélioration de la stabilité en cas d'enrichissement en DMPC. A la lumière des résultats obtenus sur BmrA (présentés en **Section 3**), il est possible que cette variation de stabilité en fonction du contenu en DMPC relève d'une déficience de lipides co-extraits avec la BR : l'enrichissement en DMPC permettrait de solubiliser la HsBR en co-extrayant un plus grand nombre de lipides, plus à même de former une bicouche complète autour du domaine transmembranaire, le protégeant d'une exposition directe aux polymères. Cette hypothèse nécessite toutefois des tests d'extraction puis de quantification de lipides (similaires à ceux décrits en **Section 3**) avant de pouvoir être avancée.

La comparaison entre les CyclAPols et le SMA(3:1) a été poursuivie en regardant l'impact de la quantité de polymère utilisée sur l'efficacité de solubilisation (**Figure 2.2.3**). Ces expériences ont été effectuées à un ratio massique HsBR/DMPC de 1/5, apparaissant comme un bon compromis pour les 3 polymères sur la base des résultats présentés en **Figure 2.2.2 (a)**.

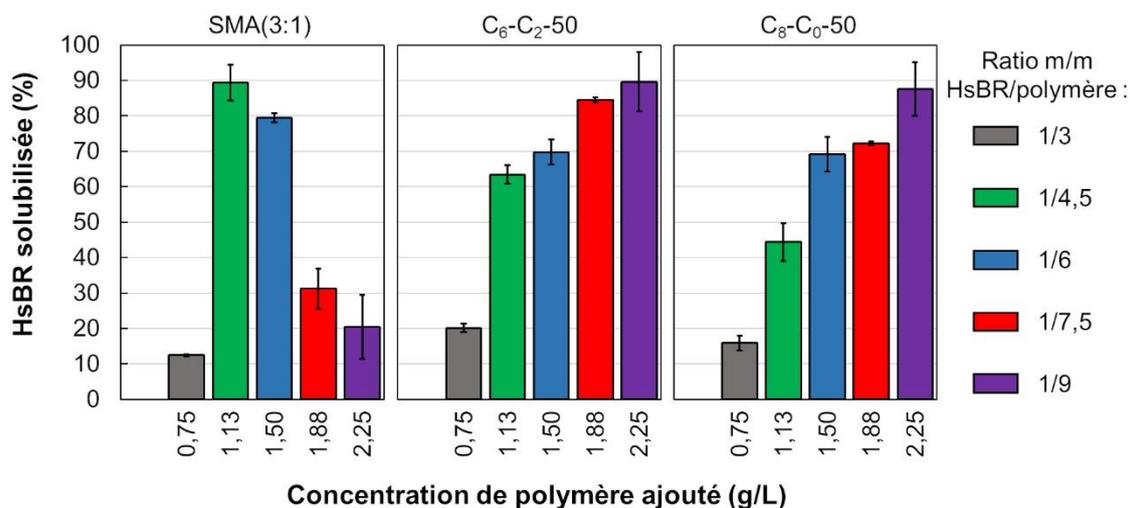


Figure 2.2.3. Variation de l'efficacité de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC (ratio massique HsBR/DMPC de 1/5) à 5 ratios HsBR/polymère, pour les 3 polymères présentant la meilleure efficacité de solubilisation : SMA(3:1), C₆-C₂-50 et C₈-C₀-50.

Dans tous les cas, un déficit de polymère conduit à une chute de la quantité de HsBR solubilisée. Deux facteurs sont à prendre en compte : la faible quantité de tensioactif peut en faire le réactif limitant, empêchant l'extraction de HsBR faute de matériel solubilisant ; une réduction de la concentration en polymère peut par ailleurs ralentir la cinétique de solubilisation, avec un risque de sédimentation (lors de la centrifugation post-solubilisation) si la taille des objets demeure trop importante en fin d'incubation. Dans le cas des CyclAPols, l'augmentation de la quantité de polymère dans les échantillons conduit à un important gain d'efficacité (facteur 6 en passant d'un ratio HsBR/CyclAPols de 1/3 à 1/6, par exemple). Dans le cas du SMA(3:1), le comportement s'avère un peu plus inattendu : si l'augmentation des quantités conduit immédiatement à un très fort gain d'efficacité (facteur 8 en passant d'un ratio 1/3 à 1/4,5), le dépassement d'un seuil de concentration, typiquement 1,5 g/L (ratio 1/6) s'avère délétère pour les rendements d'extraction de la HsBR. Si nous n'avons pas à ce jour d'arguments clairs pour l'expliquer, la principale piste de réflexion implique un éventuel problème de précipitation/sédimentation : la grande quantité de SMA peut conduire à la formation d'agrégats de taille suffisante pour être culottés au cours de la centrifugation post-solubilisation, comme suggéré par la présence d'un culot violet, limitant ainsi la quantité de HsBR dans le surnageant. Cette hypothèse pourrait être testée en analysant des échantillons solubilisés à différentes concentrations en SMA(3:1) par microscopie électronique, par exemple.

Enfin, les cinétiques de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC par les différents polymères ont été investiguées par DLS, et sont présentées en **Figure 2.2.4**.

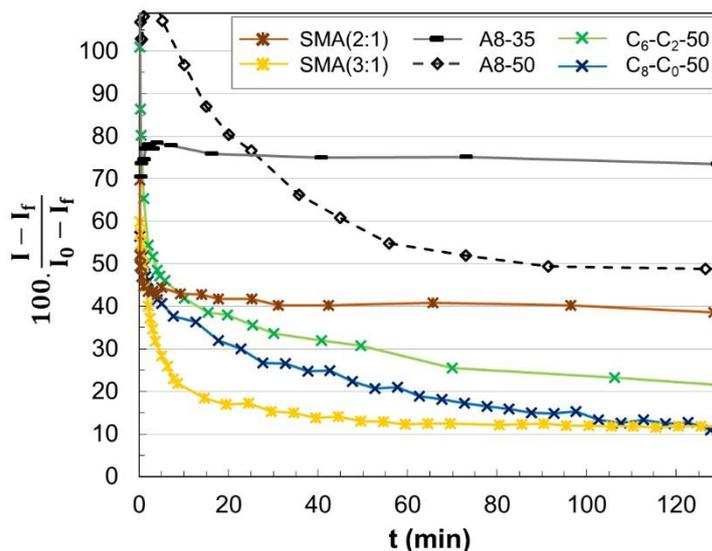


Figure 2.2.4. Cinétiques de solubilisation de protéoliposomes de membrane pourpre/DMPC (ratio massique HsBR/DMPC de 1/5) par les différents polymères testés (ratio massique HsBR/polymère de 1/12,5). Le suivi a été effectué à 25°C par DLS, en mesurant l'intensité diffractée (I) à un angle de 90°. I_0 correspond à l'intensité initiale, tandis qu' I_f correspond à l'intensité mesurée 24 h après ajout des polymères.

Les signaux mesurés ici reflètent principalement la concentration des objets de grande taille (protéoliposomes non-solubilisés), dont l'intensité diffractée représente plus de 90 % de l'intensité totale. Par ailleurs, la taille des objets diffractant étant restées stable (entre 130 et 200 nm de diamètre) tout au long des mesures, les variations d'intensités permettent à la fois d'estimer la vitesse (durée pour atteindre un plateau) et l'extensivité (hauteur du plateau) de la solubilisation par chaque polymère. L'atteinte du plateau se faisant au pire en 1 h environ (dans le cas de l'A8-50), les 20 h d'incubation pour les expériences de solubilisation présentées en **Figures 2.2.2 et 2.2.3** apparaissent comme a priori amplement suffisantes. Par ailleurs, la hauteur des plateaux finaux, bien que non-directement comparable aux efficacités de solubilisation présentées ci-avant, les complète de manière intéressante : la faible efficacité de l'A8-35 semble provenir d'une incapacité à interagir efficacement avec les protéoliposomes, avec environ 75 % des protéoliposomes encore intacts après 2 h d'incubation, et ce malgré un ratio HsBR/polymère élevé (1/12,5) ; l'A8-50 et le SMA(2:1) ne se démarquent pas comme particulièrement efficaces, à l'inverse du SMA(3:1) et du C₈-C₀-50 (ainsi que du C₆-C₂-50, dans une mesure légèrement moindre), capables de réduire l'intensité diffractée de 90 % en l'espace de 2 h.

Rétrospectivement, si le temps l'avait permis, cet aspect de l'étude aurait pu bénéficier de mesures complémentaires. En particulier, le suivi de cinétiques de solubilisation à différentes concentrations de polymère aurait éventuellement permis :

- de vérifier la bonne atteinte d'un plateau d'intensité en moins de 20 h dans le cas des plus faibles concentrations (ratio HsBR/polymère de 1/3) ;
- d'estimer la contribution de la concentration dans la vitesse de solubilisation ;
- d'investiguer l'impact de la concentration sur la hauteur du plateau final : les plateaux obtenus au ratio HsBR/polymère de 1/12,5 correspondent-ils déjà à un maximum de solubilisation ? Le cas échéant, quelle concentration est suffisante, pour chaque polymère, pour atteindre ce maximum ? Ou à défaut, si le maximum n'est pas encore atteint, à quelle concentration faut-il monter ? Nous noterons ici que la cinétique de solubilisation des protéoliposomes en présence de SMA (3:1) à un ratio de 1:12,5 est extrêmement rapide et conduit à des objets de petites

tailles (plateau bas), quand bien même les rendements d'extraction de la BR obtenus avec un ratio 1:9 (Figure 2.2.3) ne dépassaient pas 20%. L'explication de la formation d'agrégats de grande taille proposée pour justifier le faible rendement de HsBR extraite paraît peu probable. L'explication la plus simple serait que la quantification se faisant à 554 nm, seule la BR extraite sous sa forme native avait été quantifiée lors des mesures d'absorbances des surnageants. Sur la base des cinétiques d'inactivation de la BR en présence des SMA, l'explication pourrait être valide si, toutefois, le culot post-centrifugation n'était pas violet. A l'heure actuelle, ce paradoxe n'a pas toujours pas été élucidé et nécessiterait plus d'expériences pour comprendre les raisons de cette observation.

Malgré les questions demeurées en suspens, à ce stade, l'efficacité des CyclAPols comme outil de solubilisation et de stabilisation des protéines membranaires était plutôt encourageante. La principale idée pour expliquer leur bonne capacité de disruption des protéoliposomes reposait alors sur des problématiques de CAC : la structuration cyclique au sein des chaînes octyl latérales pouvait éventuellement entraîner une augmentation de la CAC des CyclAPols, qui, faute de pouvoir facilement s'associer en agrégats, présentaient une plus grande facilité à se déployer comparativement aux agrégats formés d'A8-35 ou d'A8-50 avec un cœur hydrophobe compact ; en parallèle, une CAC plus élevée va de pair avec une plus forte concentration de polymère libre non-agrégé en solution, favorisant l'interaction avec les protéoliposomes en raison de la plus grande exposition/disponibilité des chaînes alkyls. Avant de tester les CyclAPols sur un autre système modèle, un sondage rapide autour des caractéristiques de leurs agrégats a donc été initié.

2.3. Coups de sonde sur les caractéristiques des agrégats de CyclAPols

2.3.1. Impact de la concentration de polymères sur l'intensité de fluorescence du pyrène

Une première caractérisation de gammes de solutions de tensioactifs a été effectuée en présence $6 \cdot 10^{-7}$ M de pyrène. Les tensioactifs testés incluent le DDM (contrôle détergent), l'A8-35, l'A8-50 (contrôle chaînes octyl linéaires greffées à 50 %), les CyclAPols, et le SMA(3:1). Pour chacun, les variations de ratio I_1/I_3 après une excitation à 334 nm sont présentées en **Figure 2.2.5**.

L'étude des propriétés de fluorescence du pyrène en présence de DDM a servi de validation rapide de la méthode. Malgré un bruit non-négligeable, la mesure du ratio I_1/I_3 a permis de discriminer le comportement du DDM en fonction du tampon (**Figure 2.2.5 (a)**). Les valeurs de CMC du DDM ont été déterminées à $0,14 \pm 0,04$ mM en tampon Tris/NaCl et $0,20 \pm 0,04$ mM en eau MilliQ, pour des valeurs tabulées de 0,12 mM (en présence de 0,2 mM de NaCl) et de 0,17 mM (en eau MilliQ)⁹¹. Aussi engageants que soient ces premiers résultats, la transition vers les gammes de polymère en solution s'est avérée un brin mouvementé.

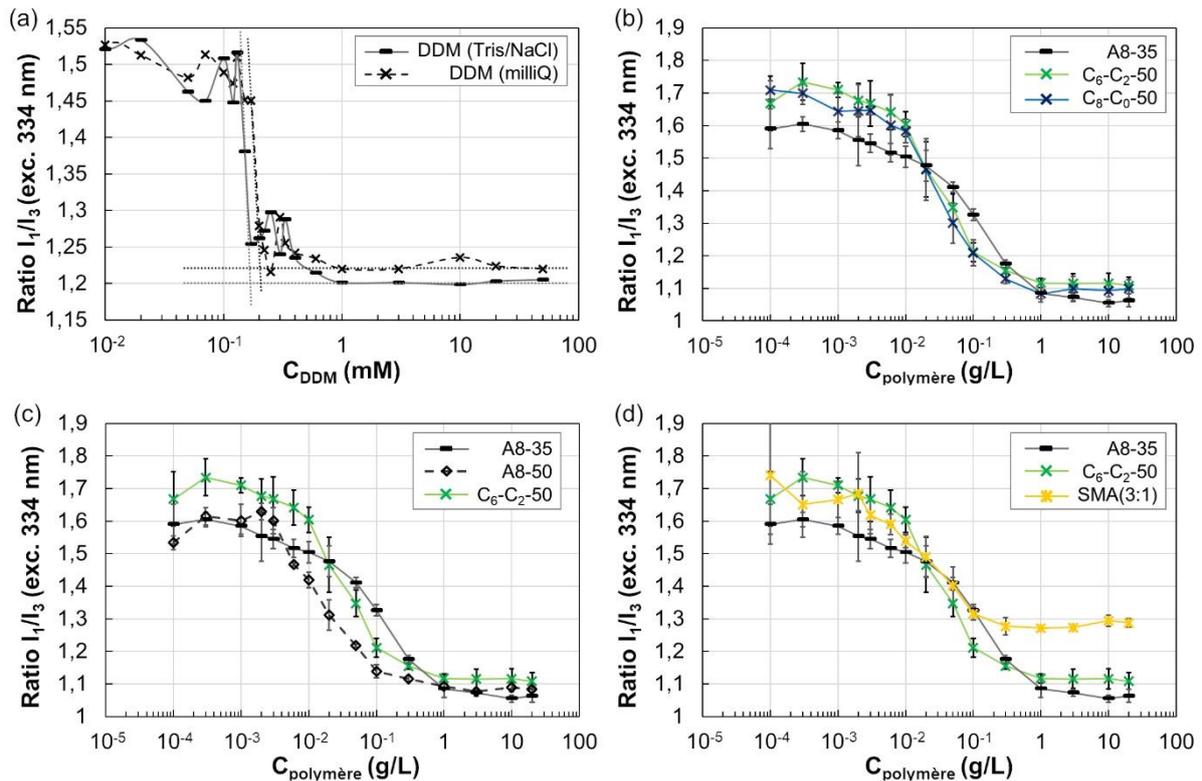


Figure 2.2.5. Etude de la variation de fluorescence du pyrène (λ_{exc} 334 nm, ratio I_1/I_3 , avec $\lambda_1 \approx 373$ nm et $\lambda_3 \approx 384$ nm) pour des gammes de solutions de DDM (a) et des différents polymères testés (b à d). (b) Comparaison entre l'A8-35 et les CyclAPols. (c) Comparaison entre l'A8-35, le C_6-C_2-50 et l'A8-50. (d) Comparaison entre l'A8-35, le C_6-C_2-50 et le SMA(3:1).

A l'inverse du DDM, tous les polymères testés ont exhibé une transition lente (sur plus d'une décade de concentration) entre le plateau initial (présence de molécules de tensioactifs individuelles en solution) et le plateau final (présence d'agrégats/micelles en solution). Par ailleurs, la notion même de plateau initial (à faible concentration) s'avère discutable : en particulier dans le cas de l'A8-35 et des CyclAPols (**panneau (b)**), une première décroissance du ratio I_1/I_3 est observable à partir de $3 \cdot 10^{-4}$ g/L, avec une rupture de pente vers 10^{-2} g/L pour les CyclAPols, et entre $2 \cdot 10^{-2}$ et $4 \cdot 10^{-2}$ g/L pour l'A8-35. Parmi les hypothèses envisagées :

- la première pente peut résulter d'une interaction entre le pyrène et les chaînes alkyles des molécules individuelles de polymères en solution, les chaînes alkyles s'auto-associant avant d'interagir avec celles d'une autre molécule de polymère. La décroissance du ratio I_1/I_3 est lente tant que la concentration en molécules de polymères seuls (uniquement capables d'exposer le pyrène à un environnement faiblement hydrophobe) augmente, puis survient une rupture de pente et une chute du ratio I_1/I_3 au moment où la formation d'agrégats avec un « vrai » cœur hydrophobe apparaît. Néanmoins, nous n'avons pas encore trouvé d'approche complémentaire pour le vérifier.

- la transition lente entre le 'plateau' initial et le plateau final peut résulter d'une faible capacité des agrégats à incorporer le pyrène, autrement dit un faible coefficient de partition du pyrène dans les agrégats. En effet, si le plateau final correspond à un régime où l'intégralité du pyrène se trouve au sein d'agrégats, la phase de transition correspond à un régime où une partie du pyrène demeure exposé à un environnement aqueux. Que cette transition s'étende sur une décade de concentration semble indiquer qu'une importante quantité d'agrégats est nécessaire à l'incorporation complète du pyrène. Cette hypothèse a été testée en effectuant une série de mesures sur les mêmes gammes de concentrations en polymères, en réduisant la concentration de pyrène ($6 \cdot 10^{-7}$ mM, 10^{-7} mM, $5 \cdot 10^{-8}$ mM, 10^{-8} mM) : la réduction de la

quantité de pyrène va de pair avec une réduction de la quantité d'agrégats nécessaire à son incorporation ; un changement de pente lors de la transition indiquerait alors a priori que la quantité d'agrégats était jusque-là limitante. Néanmoins, tous les tests effectués à concentration réduite de pyrène se sont avérés trop bruités pour être exploitables (expérience probablement à réitérer avec moins d'ampleur dans la réduction de concentration).

Ceci étant dit, les expériences menées ont permis de comparer qualitativement les polymères entre eux. En se basant sur la concentration à laquelle se finit la transition, les CAC peuvent être classées comme suit : $CAC_{A8-50} \approx CAC_{SMA(3:1)} < CAC_{CyclAPols} < CAC_{A8-35}$. En se basant sur la hauteur des plateaux finaux, les agrégats de tous les polymères résultant d'un greffage hydrophobe du squelette PAA semblent avoir des cœurs d'hydrophobie proche (ratio l_1/l_3 de l'ordre de 1,1), là où ceux du SMA(3:1) apparaissent comme légèrement plus hydrophiles (ratio l_1/l_3 de l'ordre de 1,3), en raison soit d'une hydratation partielle, soit, plus probablement, des insaturations au sein des chaînes latérales. Une seconde série d'analyses, basée sur la mesure de tension de surface, a ensuite été initiée pour compléter ces premiers résultats.

2.3.2. Estimation de la CAC : variation de la tension de surface à l'équilibre

La CMC/CAC de différents tensioactifs a été estimée par mesure de la tension de surface à l'équilibre γ_{eq} , de la même manière qu'en **Section 2.2.2 du Chapitre 1**. Les résultats obtenus pour une gamme de solutions de DDM, d'A8-35 et de C₆-C₂-50 sont présentés en **Figure 2.2.6**.

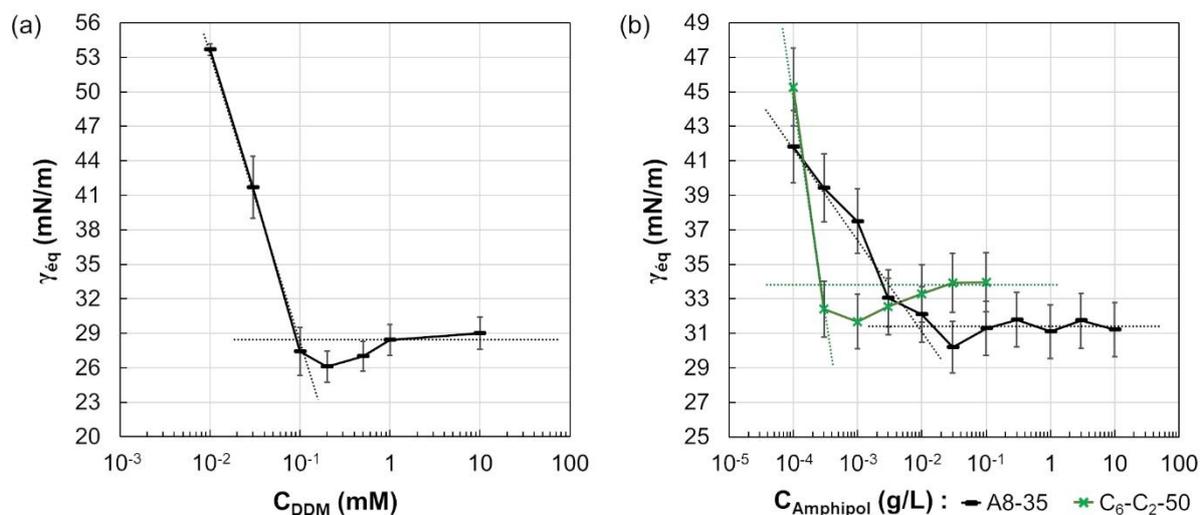


Figure 2.2.6. Estimation de la CMC/CAC par mesure de la tension de surface à l'équilibre sur une gamme de solutions de DDM (a), et sur des gammes de solutions d'A8-35 et de C₆-C₂-50 (b). Pour chaque tensioactif, toutes les solutions ont été préparées en tampon Tris/NaCl 20/150 mM, pH 8.

Comme précédemment, une évaluation rapide de la méthode a été effectuée sur une gamme de solutions de DDM en tampon Tris/NaCl (**Figure 2.2.6 (a)**). Si une mesure précise de la CMC mériterait quelques ajustements (notamment une gamme de concentrations plus rapprochées, et une étape de purification, probablement par recristallisation, les valeurs de γ_{eq} inférieures au plateau final étant indicatives de la présence d'impuretés), la valeur obtenue, $0,10 \pm 0,03$ mM, restait suffisamment proche du 0,12 mM théorique pour tenter la transition vers les gammes de polymère. Cette transition était par ailleurs également confortée par les résultats déjà obtenus sur l'A8-35, présentés dans le **Chapitre 1**, et en bonne adéquation avec

l'étude du même type menée par Giusti *et al*⁶⁵. A ce jour, seule la gamme de C₆-C₂-50 a pu être analysée (**Figure 2.2.6 (b)**), avec principalement 2 éléments de différence comparativement à l'A8-35 :

- malgré les incertitudes, la CAC du C₆-C₂-50, estimée comme appartenant à l'intervalle [10⁻⁴ – 5.10⁻⁴ g/L], apparaît comme nettement (4 à 20 fois) inférieure à celle de l'A8-35 (2.10⁻³ g/L)⁶⁵. Ce point permet de retrouver le classement formulé à partir des mesures d'intensité de fluorescence avec la sonde pyrène, mais souligne aussi un important décalage entre les mesures de tension de surface et celles de fluorescence (pour le C₆-C₂-50, la diminution du ratio I₁/I₃ s'opère entre 10⁻² et 10⁻¹ g/L en fluorescence, **Figure 2.2.5 (b)**, alors que la fin de la décroissance de $\gamma_{\text{éq}}$ est atteinte à une concentration inférieure à 10⁻³ g/L, **Figure 2.2.6 (b)**). Cela confirme la difficulté à effectuer des comparaisons quantitatives à partir des mesures de fluorescence, au moins dans le cas des polymères. Par ailleurs, en cas de répétition d'analyses, en fluorescence du pyrène comme en tension de surface, il sera bon d'étendre la gamme de concentration testée (borne inférieure de 10⁻⁵ g/L) afin d'avoir plus de visibilité sur le comportement des CyclAPols sous leur CAC et éventuellement monter à 1 g/L pour la borne supérieure afin d'avoir un plateau mieux dessiné, mais ces expériences seront consommatrices en matière première. Il serait également intéressant de resserrer les points dans les intervalles de concentrations où les CAC sont attendues : [10⁻⁴ – 5.10⁻⁴ g/L] pour les CyclAPols, dans l'hypothèse où le C₈-C₀-50 continu d'avoir des propriétés similaires au C₆-C₂-50 ; [4.10⁻³ – 8.10⁻³ g/L]⁶⁵ pour l'A8-35 ; [10⁻³ – 5.10⁻³ g/L] pour l'A8-50 et le SMA(3:1), bien que cette estimation, basée sur les mesures de fluorescence, soit potentiellement surestimée.

- la tension de surface minimale atteinte pour les concentrations supérieures à la CAC (plateau) est légèrement plus basse dans le cas de l'A8-35, 31,2 ± 1,6 mN/m contre 34,0 ± 1,7 mN/m pour le C₆-C₂-50. Compte-tenu des incertitudes, cet écart n'est pas suffisant pour être significatif, mais pourrait mériter d'être regardé en détail en cas de répétition de ces mesures ou d'analyses complémentaires : le C₆-C₂-50 ayant un taux de greffage de chaînes alkyl 2 fois supérieur à l'A8-35, une plus grande diminution de la tension superficielle ne serait pas aberrante ; la tendance observée indiquerait potentiellement une densité plus faible de C₆-C₂-50, comparativement à l'A8-35, après couverture complète de l'interface. Ceci pourrait résulter d'une combinaison entre gêne stérique liée aux chaînes cycliques, et répulsion électrostatique plus importante, 50 % de carboxylates non-greffés pour le C₆-C₂-50 contre 35 % pour l'A8-35.

A l'heure actuelle, la quantité d'informations est un peu trop limitée pour arriver à des interprétations aussi avancées qu'initialement espéré. Il est établi que la CAC du C₆-C₂-50 est sensiblement inférieure à celle de l'A8-35, également en considérant la concentration molaire de chaîne alkyl pour les 2 polymères, plus informative quant au nombre de groupements hydrophobes capables d'interagir avec une membrane lipidique (pour l'A8-35, 0,004 g/L correspond à 9,0.10⁻³ M de chaînes alkyl, tandis que pour le C₆-C₂-50, 3.10⁻⁴ g/L correspond à 1,1.10⁻³ M de chaînes alkyl). Cependant, l'aboutissement de la réflexion aurait nécessité à minima des informations complémentaires sur la CAC de l'A8-50, de structure beaucoup plus proche de celle des CyclAPols. La continuité de ce projet commencera ainsi très certainement par des mesures de tensions de surface sur l'A8-50, et pourrait être poursuivie par une répétition des mesures de fluorescence en présence de pyrène, avec une adaptation des gammes de concentrations de polymères.

Résumé : CyclAPols – premières impressions

Dans le cadre de l'étude des propriétés biochimiques des polymères avec la membrane pourpre, les CyclAPols surpassent l'A8-35, amphipol historique dont ils sont dérivés, et apparaissent comme capable de rivaliser avec les SMAs côté solubilisation, voire de les supplanter sur le plan de la stabilisation. La première hypothèse envisagée pour expliquer les propriétés de solubilisation des CyclAPols reposait sur une valeur de CAC élevée, allant normalement de pair avec une plus grande concentration de molécules individuelles de polymères en solution. Si les informations restent encore un peu fragmentaires pour se prononcer définitivement, il est néanmoins clair qu'un argument uniquement basé sur des problématiques de CAC serait au mieux incomplet : de tous les amphipols testés, l'A8-35 est celui ayant la CAC la plus élevée, en concentration massique comme en concentration molaire de chaînes alkyl, et également celui avec les moins bons taux de solubilisation. Compte-tenu de la comparaison entre CyclAPols et A8-50, la piste de la structuration des chaînes apparaît comme plus prometteuse, le passage de chaînes linéaires à chaîne cycliques suffisant à obtenir des taux d'extractions 4 à 5 fois plus élevés. Les chaînes cycliques font par ailleurs parties des marques de fabrique des SMAs, à ce jour polymères de référence en termes de solubilisation.

Bien que l'on n'ait pas d'information précise pour décrypter le mécanisme de solubilisation des membranes par les CyclAPols, l'hypothèse retenue à ce jour peut se résumer comme suit : le caractère cyclique des chaînes latérales leur confère une rigidité accrue, favorisant l'insertion et/ou la déformation des bicouches lipidiques, entraînant leur disruption. Pour le moment, nous n'avons pas trouvé de moyens plus directs de confronter ces hypothèses que la multiplication des systèmes modèles comme la membrane pourpre contenant la BR et la membrane plasmique d'*E. coli* après surexpression des protéines membranaires YidC-GFP et HwBR^{3,4}. Outre les tests effectués par Anaïs Marconnet sur ces systèmes modèles, plusieurs projets menés au sein de l'unité se sont retrouvés à essayer (puis adopter) les CyclAPols en alternative aux tensioactifs plus classiques, notamment le DDM, pour caractériser des protéines membranaires faisant l'objet de sujet de recherche, qu'il s'agisse de protéines bactériennes tel que la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ surexprimée dans *E. coli* (projet de thèse de William Batista dos Santos), de protéines produites dans des cellules eucaryotes comme la protéine Smoothen exprimée dans des cellules humaines HEK 293 (projet de Valérie Biou), ou encore les récepteurs canaux pentamériques tel que le récepteur nicotinique de l'acétylcholine du cerveau exprimé dans des cellules HEK 293 ou le récepteur nicotinique de l'acétylcholine naturellement présent dans les membranes d'organes électriques de la raie *T. marmorata* (projet de thèse de Korantin Le Mouël). Pour ma part, après l'utilisation de la membrane pourpre comme système modèle, ma contribution s'est étendue à la caractérisation des complexes formés entre la protéine BmrA exprimée dans *E.coli* et les CylcAPols.

3. Etude détaillée : cas de la protéine modèle BmrA

La deuxième protéine étudiée au cours de mes travaux est la protéine BmrA (*Bacillus subtilis* multidrug resistance ABC transporter), un homodimère de 133 kDa surexprimé dans *E. coli*. Les enjeux autour du développement des résistances aux antibiotiques, dans le cas présent plus particulièrement la compréhension du fonctionnement des pompes d'efflux impliquées dans l'excrétion des antibiotiques, ont fait de BmrA la cible d'une importante quantité d'études¹⁴⁸⁻¹⁵⁶. Récemment, sa structure a été obtenue à haute résolution par cristallographie des rayons X et par cryo-EM, révélant trois conformations différentes, orientées vers l'intérieur de la cellule et liées à l'ATP et aux ions Mg^{2+} ¹⁴⁸. La présence d'un substrat exporté par BmrA (la rhodamine 6G) dans l'une des structures a permis de révéler un réarrangement des hélices transmembranaires au cours du transport, mettant en lumière la flexibilité de la protéine. Les changements conformationnels liés à l'hydrolyse de l'ATP, procurant la source d'énergie au transport des substrats au travers la membrane, ont également été étudiés par spectroscopie RMN du solide. Les résultats de cette étude ont mis en évidence la non-équivalence des deux sites de liaison aux nucléotides¹⁷⁸. Parmi les autres études pouvant être citées, on trouve des investigations portant sur sa solubilisation en détergent^{154,156} comme en SMA¹⁵⁷, ainsi que sur la variation de son environnement lipidique¹⁵¹, rendant BmrA notablement attractive pour l'application envisagée. Une comparaison des CyclAPols avec des références détergent (DDM) et polymère (SMA(3:1)), sur le plan de la solubilisation de BmrA et la préservation d'un éventuel environnement lipidique après solubilisation, ainsi que des tests de son activité ATPasique, a ainsi été entreprise. Après production de BmrA (grand merci à Jean-Michel Betton, Institut Pasteur, Paris, pour le partage du plasmide), la première étape a été de tester différentes conditions de solubilisation pour les 4 tensioactifs mentionnés, notamment dans l'optique d'obtenir suffisamment de matériel pour mener les analyses ultérieures.

3.1. Production et solubilisation de BmrA

3.1.1. Matériel et méthodes

3.1.1.1. Préparation de membranes

Les membranes utilisées sont les mêmes que celles décrites dans la référence Marconnet *et al.* (2022) Analytical Chemistry. Dans les grandes lignes, le plasmide codant pour BmrA (gentiment fourni par Jean-Michel Betton, Institut Pasteur, Paris) est utilisé pour transformer la souche C43 d'*E.coli*. Les cellules sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C en présence d'ampicilline. La culture est induite par ajout de 0,5 M d'isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 4 h, puis récoltée (centrifugation 3 500 g pendant 20 min) et resuspendue en tampon Tris/NaCl (Trisma base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8) avec ajout d'ADNase. Le cassage des cellules est effectué avec un Broyeur cellulaire (Cell Disruptor, Constant Systems), avant d'éliminer les débris et cellules non-cassées (centrifugation à 10 000 g pendant 20 min), puis de récolter les membranes présentes dans le surnageant (centrifugation à 100 000 g pendant 1 h). Le culot obtenu est resuspendu en tampon Tris/NaCl (Trisma base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8). Enfin, la concentration totale de PMs de la solution est mesurée par dosage colorimétrique (Pierce), avant congélation et stockage à -20°C.

3.1.1.2. Solubilisation et purification

La solubilisation des membranes d'*E.coli* surexprimant BmrA se fait par dilution au tampon Tris/NaCl et ajout de solution stock de tensioactif de manière à atteindre une concentration finale de PMs de 2 mg/mL, et une concentration en tensioactif de 2 mg/mL dans le cas des CyclAPols (ratio massique PMs/CyclAPol de 1/1), ou de 10 mg/mL dans le cas du DDM et du SMA(3:1) (ratio massique 1/5). Les solutions sont incubées sous agitation sur roue pendant 2 h à 5°C, avant d'être centrifugées à 200 000 g à 5°C pendant 30 min.

Le surnageant est ensuite récupéré et déposé manuellement sur une colonne, préalablement chargée avec une résine Ni²⁺-NTA (HisPur, ThermoFisher Scientific), lavée à l'eau milliQ et équilibrée avec du tampon Tris/NaCl. Après passage sur la colonne, le matériel non retenu présent dans le flow-through (FT) est ré-injecté, avant de laver la colonne avec du tampon Tris/NaCl, puis du tampon Tris/NaCl contenant 10 mM d'imidazole afin d'éliminer les contaminants en interaction non-spécifique avec la résine. L'élution est effectuée avec du tampon Tris/NaCl contenant 300 mM d'imidazole, puis l'acquisition des spectres UV-vis de toutes les fractions d'élution permet d'identifier celles contenant la protéine d'intérêt. Ces fractions sont réunies et dialysées (Spectrapore, MWCO 10 000 g/mol) sur la nuit à 5°C contre du tampon Tris/NaCl pour éliminer l'imidazole. Dans le cas des échantillons solubilisés en DDM, 0,34 mM de DDM sont ajoutées dans les tampons de lavage et d'élution, et 0,17 mM de DDM sont ajoutés dans le bain de dialyse.

3.1.1.3. Détermination des quantités de BmrA post-purification

La concentration de BmrA présente dans les échantillons est calculée par mesure d'absorbance à 280 nm ($A_{280\text{nm}}$), avec une référence prise à 370 nm pour la ligne de base. Le coefficient d'extinction massique d'un monomère de BmrA, égal à 0,84 L.g⁻¹.cm⁻¹, a été déterminé en corrélant l' $A_{280\text{nm}}$ d'échantillons de BmrA purifiés en DDM et CyclAPol avec la concentration effective de monomère, mesurée via l'analyse des acides aminés (grand merci à l'Unité de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur, pour ces analyses) : dans les grandes lignes, l'échantillon est hydrolysé en présence de 6N HCl puis oxydé, avant d'être injecté sur une colonne HPLC. Le temps de rétention de chaque acide aminé permet son identification et l'aire sous le pic permet de le quantifier. Connaissant la séquence primaire de la protéine, la quantification des acides aminés présents permet de remonter à la quantité initiale de monomère.

Contrairement au DDM et aux CylAPols, les SMA absorbent dans l'UV du fait de la présence de cycles insaturés. Ainsi, dans le cas des échantillons de BmrA purifié en SMA(3:1), le pic d'absorption du polymère (maximum à 260 nm) se superpose partiellement au pic d'absorption des résidus tryptophane de la protéine (maximum à 280 nm). Une correction a donc été appliquée pour retrancher l'absorption à 280 nm imputable au SMA et permettre la quantification précise de BmrA. Pour cela, le coefficient d'extinction massique à 260 nm du SMA(3:1), égal à 1,12 L.g⁻¹.cm⁻¹, a été déterminé via mesure d' $A_{260\text{nm}}$ sur une gamme de solutions de SMA(3:1) en tampon Tris/NaCl. Puis, le pic à 260 nm des échantillons de BmrA contenant du SMA(3:1) a été utilisé pour déterminer la concentration de SMA(3:1) dans les échantillons de BmrA, afin d'en déduire la contribution du SMA dans le pic à 280 nm. En ordre de grandeur, il a été trouvé que les SMAs présents dans nos échantillons contribuaient à hauteur de 5 % de l' $A_{280\text{nm}}$ totale mesurée.

3.1.2. Résultats et discussion : efficacités de solubilisation

L'étude sur BmrA a commencé avec une mise au point des conditions pour une bonne solubilisation des membranes avec les différents tensioactifs choisis : les CyclAPols, le DDM (contrôle détergent) et le SMA(3:1) (contrôle polymère). A cet effet, un screening avec variation des ratios massiques protéine/tensioactif (1/1 à 1/5) utilisés pour la solubilisation, ainsi que du temps d'incubation (1 h à 2 h) à 4°C a été effectué. Quelques exemples des purifications qui s'en sont suivis sont présentés en **Figure 2.3.1**.

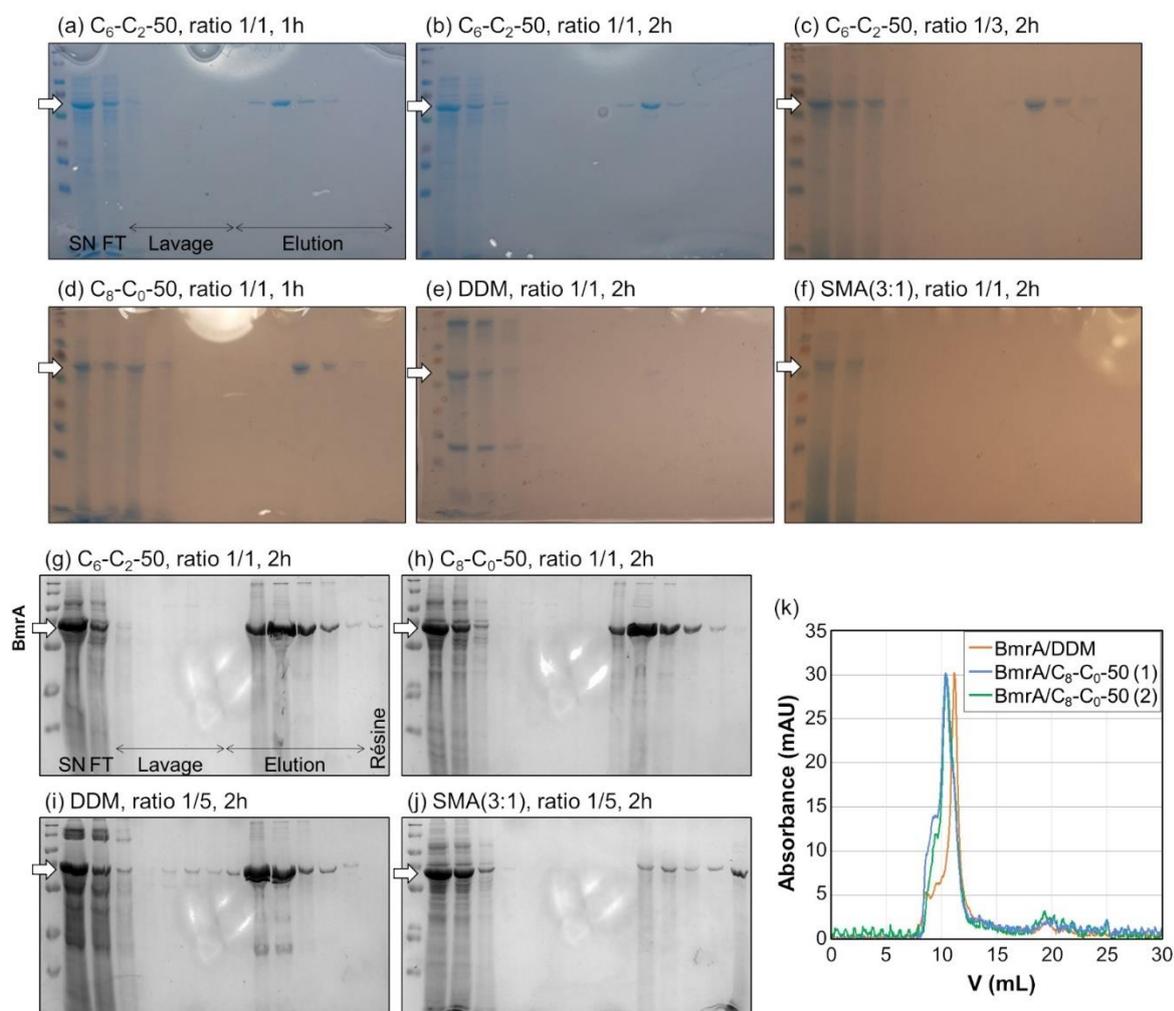


Figure 2.3.1. Mise au point des conditions de solubilisation et purification de BmrA, exprimée dans *E.coli*, en présence de différents tensioactifs. Le tensioactif utilisé, le ratio massique protéines membranaires totales / tensioactif ainsi que le temps d'incubation sont indiqués pour chaque panneau. En fin d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 200 000 g pendant 30 min, puis le surnageant est purifié sur colonne contenant une résine Ni²⁺-NTA coulée manuellement. Le surnageant (SN), le flow-through (FT), les fractions de lavage (tampon Tris/NaCl puis Tris/NaCl + 10 mM imidazole), les fractions d'élutions (tampon Tris/NaCl + 300 mM imidazole) ainsi que la résine sont déposés sur gel (SDS-PAGE 12% acrylamide, InstantBlue Coomassie Stain). (a-f) Exemples des premières solubilisations / purifications effectuées en CyclAPols, en DDM et en SMA(3:1). (g-j) Purifications après solubilisations avec les 4 tensioactifs testés, dans les conditions donnant les meilleurs rendements de solubilisation de BmrA. Dans le cas des purifications en CyclAPols et SMA, les tampons de lavage et d'éluion ne contiennent pas de polymère. En revanche, dans le cas de la purification en DDM, 0,34 mM DDM sont ajoutés à tous les tampons. (k) Exemples de profils d'exclusion de taille d'échantillons purifiés en DDM et en C₈-C₀-50 après passage sur une colonne Superdex 200 GF 10/300 (tampon Tris/NaCl 20/150 mM, pH 8, contenant 0,34 mM DDM pour l'échantillon BmrA/DDM). Les 2 échantillons BmrA/C₈-C₀-50 proviennent de 2 solubilisations indépendantes.

Dans le cas des CyclAPols, une bonne efficacité de solubilisation et de purification de BmrA a pu être observée avec les paramètres testés, y compris les plus minimalistes (ratio massique protéines/CyclAPols de 1/1, 1 h d'incubation, **panneaux (a) et (d)**), qui n'a pas sensiblement été améliorée par une augmentation du temps d'incubation (**panneau (b)**) ni du ratio protéines/CyclAPols (**panneau (c)**). En comparaison, les tentatives de solubilisation à ratio 1/1 dans le cas du DDM et du SMA(3:1) se sont avérées infructueuses au moment de la purification, avec des quantités de BmrA purifiées soit très faibles (DDM, **panneau (e)**), soit indétectables sur gel polyacrylamide-SDS coloré au bleu de Coomassie (SMA(3:1), **panneau (f)**). Le manque de matériel obtenu en fin de purification indique par ailleurs que les bandes diffuses visibles dans le surnageant des échantillons (e) et (f), observées de manière irreproductible pour les solubilisations effectuées dans ces conditions, sont probablement partiellement ou majoritairement dues à une espèce autre que BmrA.

Les résultats de solubilisations/purifications obtenues avec les meilleurs sets de paramètres sont illustrés en **Figure 2.3.1 (g-j)**, avec toutefois quelques réserves à conserver :

- il s'agit des meilleurs résultats obtenus, sans être nécessairement optimaux : au cours de la purification, une quantité non-négligeable de BmrA peut systématiquement être trouvée dans le flow-through (fixation insuffisante sur la résine), et est parfois perdue avant élution (c'est le cas de la condition en DDM, où l'on détecte la présence de BmrA dans les fractions de lavage, **panneau (i)**). Par ailleurs, les rendements de purification obtenus en travaillant avec le SMA(3:1) (récupération de $5,8 \pm 1,2$ % de la quantité totale de protéine initialement introduite) s'avèrent notoirement faibles comparativement aux 3 autres tensioactifs ($8,2 \pm 0,6$ % pour le DDM, $10,0 \pm 0,4$ % pour le C₆-C₂-50, et $9,2 \pm 0,5$ % pour le C₈-C₀-50), mais souffrent d'un manque de données quant aux conditions testées. Bien que le problème vienne au moins en partie d'une difficulté à décrocher les complexes BmrA/SMA(3:1) de la résine, **panneau (j)**, il n'est pas à exclure qu'une augmentation de la quantité de SMA(3:1) au-delà du ratio 1/5 ou qu'une augmentation du temps d'incubation aide à améliorer le rendement de solubilisation et donc de matériel à déposer sur la colonne. La mise en place de ces conditions serait toutefois à opérer avec précautions, dans la mesure où une incubation prolongée des membranes avec un tensioactif à forte concentration s'est souvent montrée délétère pour les protéines membranaires.

- l'exploration des conditions de solubilisation a été effectuée en se basant, d'une part, sur la littérature pour la condition en DDM (temps d'incubation, 2 h, à 1% en concentration)¹⁷⁹ et, d'autre part, sur les quantités de BmrA obtenue en fin de purification. Cette approche m'avait semblé logique et pragmatique sur le moment, mais rétrospectivement, d'autres analyses seraient de rigueur pour compléter l'étude. En cas de répétition de la mise au point sur les conditions de solubilisation, il serait bon de caractériser les échantillons purifiés sur le plan de la composition lipidique (aspect développé dans la **Section 3.2**) ainsi que sur le plan de la stabilité/préservation de l'activité de BmrA (aspect développé dans la **Section 3.3**). En particulier, le couplage de ces différentes analyses pourrait donner une meilleure visibilité sur le lien entre les conditions de solubilisation et la quantité de lipides conservés autour de BmrA (avec notamment pour objectif d'éviter une délipidation excessive), puis sur le lien entre environnement lipidique et préservation de la stabilité et de l'activité de la protéine.

En bref, La mise au point des conditions de solubilisation a permis de trouver des paramètres satisfaisants pour obtenir des quantités importantes de BmrA, autorisant le passage à des études portant sur la composition lipidique et l'activité des échantillons purifiés. Avec du recul, la prochaine étape en cas de poursuite de ce projet serait de reprendre cette mise au point en élargissant le screen des paramètres de solubilisation (temps d'incubation et ratio protéines/tensioactifs), et en incluant les aspects lipides et activité aux critères à optimiser, en plus du rendement.

3.2. Test : préservation des lipides lors de la solubilisation

A l'heure actuelle, les SMAs sont décrits et perçus comme la référence parmi les polymères utilisés pour la manipulation des protéines membranaires, avec à la fois de bonnes propriétés de solubilisation et une préservation d'un environnement lipidique autour des protéines extraites. Le caractère faiblement délipidant les rend particulièrement attracteurs en comparaison des détergents, souvent décrits comme plus agressifs et délétères. Ayant trouvé des conditions permettant de purifier BmrA avec les 4 tensioactifs étudiés, tout en obtenant de bonnes quantités de protéine, l'étape suivante a été de regarder l'impact du tensioactif utilisé au cours de la purification sur l'éventuelle préservation de lipides. A cet effet, les échantillons purifiés ont été soumis à une étape d'extraction de lipides (dérivée du protocole de Bligh and Dyer¹⁸⁰), avant d'analyser lesdits extraits par chromatographie sur couche mince, puis spectrométrie de masse. La majorité des résultats présentés ici sont publiés et discutés dans la référence suivante : A. Marconnet, B. Michon, B. Prost, A. Solgadi, C. Le Bon, F. Giusti, C. Tribet and M. Zoonens, "Influence of hydrophobic groups attached to amphipathic polymers on the solubilization of membrane proteins along with their lipids", *Analytical Chemistry*, **2022** (doi: 10.1021/acs.analchem.2c01746)¹⁵⁹.

3.2.1. Matériel et méthodes

3.2.1.1. Extraction de lipides

Les lipides encore présents après purification de BmrA (lipides co-purifiés) ont été extraits à l'aide d'un protocole adapté de la méthode initialement proposée par E. G. Bligh et W. J. Dyer¹⁸⁰. L'échantillon de BmrA purifié est transféré dans un flacon de verre préalablement nettoyé au chloroforme et séché à l'étuve (70°C). Du chloroforme et du méthanol sont ensuite ajoutés, en adaptant les volumes de manière à avoir un ratio volumique chloroforme/méthanol/eau de 1/2/0,8 (26,3 % chloroforme, 52,6 % méthanol, 21,1 % eau) : cette composition permet de se placer dans le domaine monophasique du diagramme ternaire chloroforme-méthanol-eau. L'échantillon est agité à température ambiante pendant 2 h, puis le matériel non-soluble est sédimenté par centrifugation (14 000 rpm à température ambiante, pendant 5 min). Le surnageant est ensuite récupéré, et son volume est doublé par ajout d'une solution de chloroforme/eau à ratio volumique de 1/1 : cette nouvelle composition (38,2 % chloroforme, 26,3 % méthanol, 35,5 % eau) permet d'atteindre le domaine biphasique du diagramme, avec une séparation phase aqueuse (eau + méthanol) / phase organique (chloroforme), cette dernière contenant les lipides extraits. La démixtion est accélérée par centrifugation (14 000 rpm à température ambiante, pendant 5 min), puis la phase organique (phase du bas) est récupérée, séchée sous flux d'argon, et stockée à -20°C sous atmosphère inerte.

3.2.1.2. Détection de lipides par chromatographie sur couche mince (CCM)

Toutes les CCMs ont été effectuées sur plaques Gel de silice 60 F₂₅₄ (Sigma) de 6,5 cm de hauteur, avec dépôt d'échantillon tous les 0,5 cm environ. Avant usage, les plaques ont été lavées 2 fois avec élution d'un chloroforme/méthanol (ratio volumique 1/1) sur toute la hauteur, séchage sous hotte pendant 10 minutes, puis séchage à l'étuve (70°C) pendant 1 h.

Les échantillons de lipides extraits et séchés sont repris dans un petit volume de chloroforme avant d'être déposés manuellement sur plaque. Le principal mélange d'éluion utilisé, choisi sur la base des travaux de Schmidt *et al.*¹⁸¹, est composé d'un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique au ratio volumique 25/65/5. La révélation des plaques est faite avec illumination UV (nm), vapeur d'iode, et carbonisation des lipides en dernier lieu : la plaque est vaporisée avec un mélange d'acide sulfurique 10 % dans l'eau, puis chauffée progressivement jusqu'à 140°C (plaque chauffante) jusqu'à noircissement des taches.

3.2.1.3. Identification des lipides par spectrométrie de masse

Les lipides extraits (3 extraits par tensioactif testé) ont également été analysés avec un système de détection couplé, composé d'un détecteur à charge d'aérosol Corona-CAD Ultra et spectromètre de masse hybride à trappe orbitale LTQ-Orbitrap Velos Pro, installés en sortie d'une chromatographie liquide RSLC Dionex-U3000 quaternaire (ThermoFisher Scientific). Les lipides sont repris dans du chloroforme contenant un standard interne, la phosphatidylcholine, choisie en raison de sa non-présence dans les membranes d'*E.coli* et servant à la normalisation des chromatogrammes. Les lipides sont ensuite injectés sur la colonne de chromatographie, avec une division du débit de sortie de colonne entre le Corona-CAD (250 µL/min) et le spectromètre de masse (150 µL/min).

Les temps de rétention associés aux différents lipides des membranes d'*E.coli* ont été identifiés et calibrés par comparaison avec une solution de standards de phospholipides commerciaux contenant des phosphatidylglycérol (PG), cardiolipine (CL), phosphatidylinositol (PI), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylcholine (PC), tous à 0,025 mg/mL. L'identification précise et la caractérisation de chaque type de lipides a été effectuée par spectrométrie de masse : l'ionisation est faite par électrospray en mode négatif, avec acquisition simultanée de spectres MS (full scan, molécule non-fragmentée) et de spectres après fragmentation(s) (CID, Collision Induced Dissociation, spectres MS² au premier niveau de fragmentation, et MS³ après une seconde fragmentation).

En parallèle, la détection Corona-CAD a été utilisée pour la quantification des différents lipides identifiés dans les échantillons, en se servant de courbes de calibration obtenues après injection de solutions commerciales de chaque lipide à des concentrations connues, couvrant une gamme allant de 0,01 à 0,5 mg/mL, et intégration des pics associés.

Le traitement des données a été effectué avec le logiciel XCalibur (Thermo Scientific). Grand merci à Audrey Solgadi et Bastien Prost, UMS-IPSIT SAMM, Université Paris-Saclay, qui ont géré l'intégralité des injections et du traitement de données.

3.2.2. Résultats et discussion : lipides or not lipides ?

L'objectif initial de cette étude était d'identifier les éventuels lipides présents au sein des complexes BmrA/tensioactif après les étapes de solubilisation et de purification, en les analysant par CCM. En particulier, dans le cas des lipides majoritaires d'*E.coli* (PE, PG et CL), plusieurs exemples d'identification réussies en CCM, autorisant même une analyse quantitative des différentes classes de lipides, peuvent être cités, avec à titre d'exemples les travaux de Schmidt *et al.*¹⁸¹, et de Dörr *et al.*¹⁸². Plusieurs essais de séparation ont été effectués, en testant les mélanges d'éluion mentionnés dans ces papiers (Schmidt *et al.* : chloroforme/méthanol/acide acétique au ratio volumique 25/65/5 ; Dörr *et al.* : chloroforme/méthanol/eau/ammoniacque 25% au ratio volumique 120/75/6/2), ainsi que les mélanges de composition proche (variation sur le ratio de ± 5 pour toutes les espèces sauf l'ammoniacque 25%, et de ± 10 pour le chloroforme et le méthanol). La meilleure séparation a été obtenue avec la composition de Schmidt *et al.*, et est présentée en **Figure 2.3.2**.

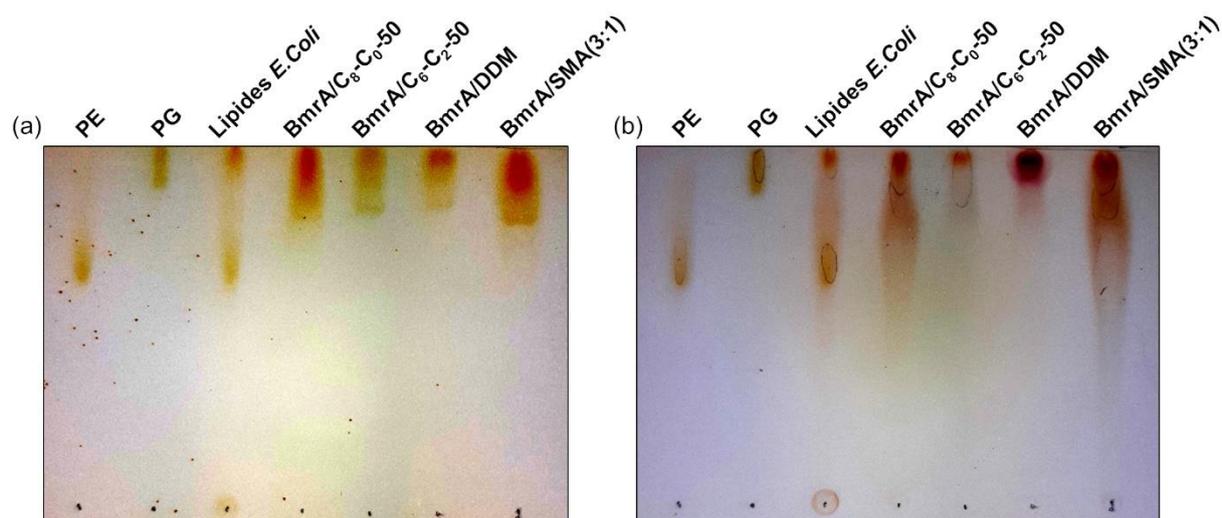


Figure 2.3.2. Séparation des phospholipides par CCM : dépôts de standards de PE et de PG, d'un extrait commercial de lipides d'*E.Coli* (Avanti Polar Lipids), ainsi que d'extraits lipidiques préparés à partir d'échantillons de BmrA solubilisés en C₆-C₂-50, C₈-C₀-50, DDM et SMA(3:1) ; élution avec un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique au ratio volumique 25/65/5 ; révélation aux vapeurs d'iode (a) et avec carbonisation des lipides (b).

Malgré les différentes compositions testées, une séparation propre des 3 classes de lipides n'a jamais pu être obtenue : au mieux, la PE a été isolée, tandis que la PG (probablement superposée aux CL, compte-tenu des résultats de Schmidt *et al.*) a été trouvée au niveau du front de migration. Dans le cas des lipides extraits à partir d'échantillons de BmrA solubilisée par les différents tensioactifs, un problème récurrent de résolution et de trainée a été rencontré, ici amplifié par la surconcentration des dépôts. Il est très probable que de meilleurs résultats que ceux présentés ici puissent être obtenus en réduisant les volumes des dépôts, ou encore en aillant recours à des dispositifs autorisant un dépôt, un développement et une révélation automatisés plutôt que manuels.

Dans le cadre présent, les tests sur CCM auront essentiellement permis de mettre en évidence la présence de lipides au sein des différents échantillons de BmrA purifiée. Sachant cela, de nouvelles extractions de lipides ont été effectuées, en vue d'analyses plus poussées.

Les extraits de lipides ont ensuite été analysés avec un système de détection couplé, composé d'un détecteur Corona-CAD et d'un spectromètre de masse, en sortie d'une chromatographie liquide. Les chromatogrammes obtenus sur chacune des sorties lors de l'analyse d'une série d'échantillons sont présentés en **Figure 2.3.3**.

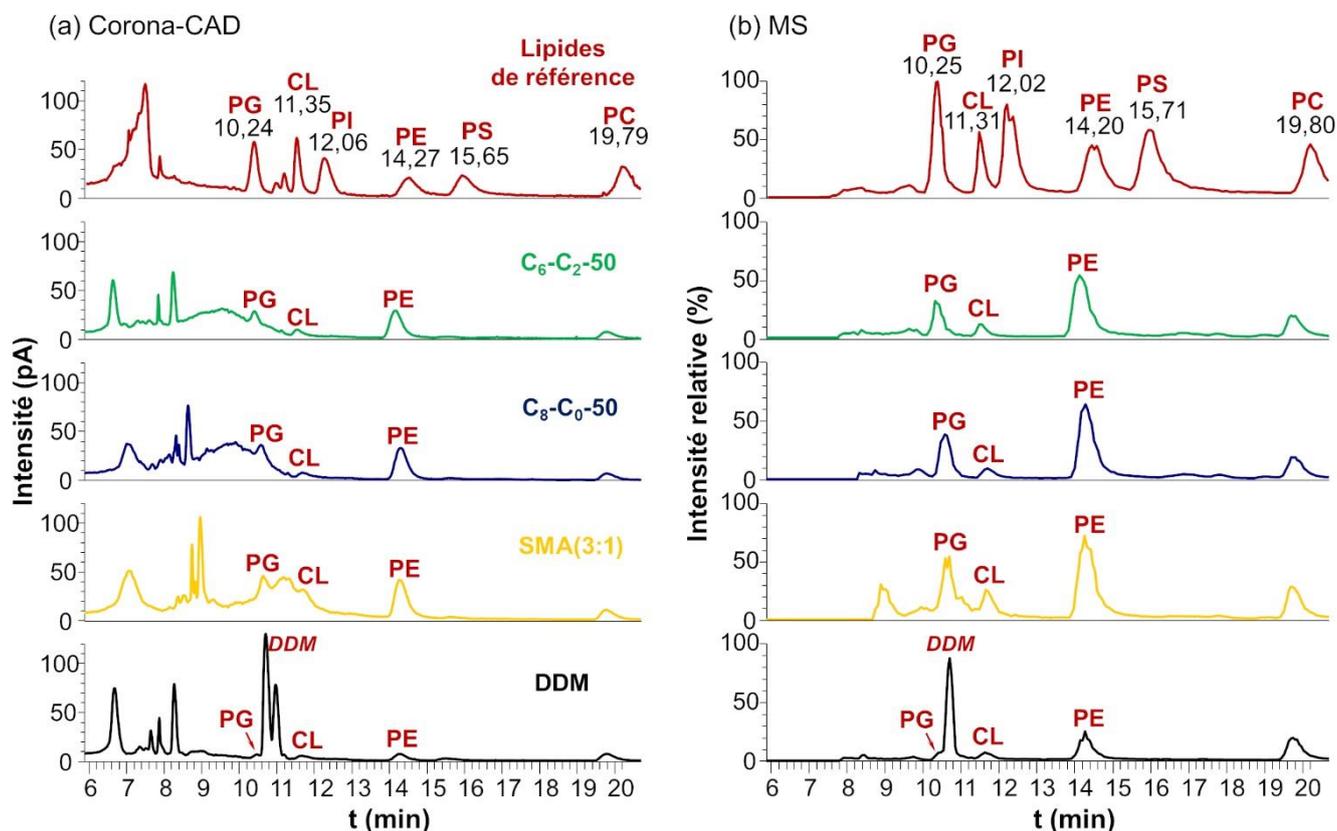


Figure 2.3.3. Analyses des lipides extraits d'échantillons de BmrA solubilisés en C₆-C₂-50, C₈-C₀-50, DDM et SMA(3:1), avec injection simultanée sur Corona-CAD (a) et sur spectromètre de masse (b). L'identification et la caractérisation des phospholipides ont été faites à partir de l'injection d'un standard lipidique et des valeurs de masse/charge (m/z), tandis que la quantification a été effectuée par intégration du chromatogramme corona-CAD et confrontation à des courbes de calibration.

	PG	CL	PE	Total de lipides par dimère de BmrA
C ₆ -C ₂ -50	1,9 ± 0,6	0,6 ± 0,0	11,2 ± 2,0	13,7 ± 2,1
C ₈ -C ₀ -50	1,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	11,6 ± 0,4	13,7 ± 0,5
SMA (3:1)	1,6 ± 0,4	0,3 ± 0,1	7,4 ± 3,0	9,3 ± 3,0
DDM	1,0 ± 1,1	0,6 ± 0,2	4,8 ± 4,0	6,4 ± 4,2

Table 2.3.1. Quantification des lipides extraits d'échantillons de BmrA solubilisés en C₆-C₂-50, C₈-C₀-50, DDM et SMA(3:1), effectuée par détection corona-CAD. Pour chacune des 3 espèces lipidiques détectées, le nombre de phospholipides par dimère de BmrA a été reporté (3 répétitions, effectuées sur 3 lots d'échantillons solubilisés différents).

L'identification générale des classes de lipides a été effectuée sur la base des temps de rétention associés à chacun des lipides et en comparaison à ceux d'un mélange de lipides de référence. L'identification plus précise et la caractérisation des extraits a aussi été effectuée par spectrométrie de masse à partir des valeurs m/z , qui, dans le cas des échantillons de BmrA solubilisés en DDM, ont notamment permis d'identifier le pic du DDM et de le distinguer du pic de la PG (chromatogrammes présentés dans le **panneau (b)**). La quantification des lipides a

quant à elle été effectuée via intégration des pics d'intérêts obtenus sur Corona-CAD (chromatogrammes présentés dans le **panneau (a)**, avec un récapitulatif du nombre de lipides obtenus par dimère de BmrA présenté en **Table 2.3.1**). Par ailleurs, un extrait lipidique provenant des membranes d'*E. coli* utilisées pour la purification de BmrA a été analysé dans les mêmes conditions. Cette analyse a mis en évidence la proportion de chacune des classes de phospholipides majoritaires tel que 68,7% de PE, 19,3% de PG et 12,0% de CL, en bon accord avec la littérature¹⁸³. Les proportions des classes de lipides provenant des échantillons de BmrA purifié suggèrent une absence d'enrichissement d'un lipide en particulier au voisinage de la protéine quel que soit le tensioactif utilisé pour la solubilisation et la purification. Toutefois, plusieurs précautions sont à prendre quant aux nombres de lipides quantifiés :

- la faible intensité des pics de la PG et des CL, couplée à une superposition avec des signaux parasites (causés par la présence de tensioactifs résiduels), complexifie sensiblement l'estimation des quantités de lipides associées. Ce problème est toutefois mitigé par la bonne résolution du pic de la PE, qui représente la majorité (entre 75 et 85 %) des lipides détectés dans les échantillons. De plus, les valeurs de PE quantifiées se situent au milieu de la gamme de la courbe étalon, réduisant les possibles sources d'incertitude sur la quantification.

- le protocole suivi pour l'extraction des lipides peut induire une sous-estimation du nombre de lipides par dimère de BmrA. En particulier, il est possible qu'une fraction des lipides soit perdue au moment de la récupération de la phase organique. Une tentative d'analyse complémentaire a été effectuée par dosage colorimétrique au molybdate d'ammonium des phosphates, provenant de l'hydrolyse des lipides en milieu acide, et par référence à une courbe étalon réalisée avec des ions phosphates de concentrations connues¹⁸⁴. Les lipides dosés par cette méthode provenaient des mêmes échantillons de BmrA purifiés et conservés à -80°C, à partir desquels les lipides avaient été extraits et dosés par Corona-CAD pour l'un des réplicas. Les lipides n'ayant pas été extraits au préalable, ces analyses ont révélé une quantification de l'ordre de 20 à 25 lipides par dimère de BmrA, suggérant une possible sous-estimation du nombre de lipides dosés par spectrométrie de masse après extraction. Toutefois, le signal des lipides se situant dans la gamme de concentrations minimales de phosphate de la courbe étalon, nous ne pouvons pas écarter un problème de sensibilité insuffisante pour conclure avec certitude sur la potentielle sous-estimation du nombre de lipides.

Ceci étant dit, les analyses qui précèdent sont en adéquations avec les observations générales sur les propriétés des SMAs, décrits comme plus à même de solubiliser les PMs en préservant un environnement lipidique natif (formation de SMALPs, SMA lipid particles)¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ que les détergents. En parallèle, ces analyses soulignent une capacité similaire, voire légèrement supérieure, chez les CyclAPols. Ce dernier point est toutefois à nuancer, dans la mesure où les concentrations de SMA(3:1) et de CyclAPols utilisées lors de la solubilisation sont sensiblement différentes, jouant potentiellement un rôle dans la différence de délipidation. Pour une comparaison plus objective de la capacité à préserver un environnement lipidique, des études à concentrations équivalentes seraient nécessaires (dans le même esprit que le couplage « optimisation du rendement/étude de l'environnement lipidique » en cas de répétition de la mise au point des conditions de solubilisation). De telles études sortiraient néanmoins des préoccupations habituelles lors d'un travail avec les protéines membranaires, tournant plus souvent autour d'une minimisation de l'exposition aux tensioactifs.

D'un point de vue structural, il est à noter qu'aucune des valeurs totales de lipides mesurées n'est suffisante pour former une couche de lipides organisée en bicouche pouvant couvrir le domaine transmembranaire de BmrA dans son intégralité. En utilisant le modèle publié de BmrA inséré dans une membrane lipidique¹⁸⁹, et à l'aide du logiciel Chimera, le nombre de lipides dont le phosphate de la tête hydrophile est distant au maximum de 5 Å de la surface de la protéine s'élève à 60-70 lipides (un grand merci à Daniel Picot pour les conseils d'utilisation de Chimera). La différence entre les valeurs de lipides quantifiés et celles des

lipides attendus pour couvrir le domaine transmembranaire de BmrA d'au moins une couche suggère une forte délipidation produite au cours des étapes de solubilisation et purification quel que soit le tensioactif utilisé. Ce résultat contraste fortement avec un certain nombre de publications sur les SMALPs reportant un contenu lipidique pouvant aller jusqu'à trois couches de lipides¹⁹⁰. Compte-tenu des différentes sources d'erreur possibles dans les quantifications lipidiques présentées ci-dessus, d'autres études sur des systèmes et protéines membranaires différentes seront nécessaires dans le future pour compléter ces données.

Intrinsèquement, l'analyse des lipides co-purifiés aura permis de mettre en évidence la capacité des CyclAPols à préserver, au moins partiellement et dans le cas de BmrA, un environnement lipidique natif autour de la protéine solubilisée. La suite logique a été d'investiguer si cette préservation des lipides avait un impact sur la préservation de la stabilité et de l'activité de BmrA après purification.

3.3. Test : stabilisation/préservation de l'activité post-solubilisation de BmrA

De manière générale, la tendance à étudier une protéine membranaire dans un environnement aussi proche que possible de l'environnement naturel (la membrane dans laquelle la protéine remplit sa fonction), est devenu un enjeu de tout premier plan. En effet, la préservation d'un environnement de lipides natifs autour de la protéine solubilisée est considérée comme un facteur aidant à la conservation de son activité, en écrantant le domaine transmembranaire contre une interaction directe et potentiellement dénaturante avec les tensioactifs, et en préservant une mobilité protéique suffisante pour permettre les changements de conformation nécessaire à son fonctionnement. L'objectif des analyses qui suivent a ainsi été d'investiguer si une telle tendance était observée avec les échantillons de BmrA solubilisés, malgré les faibles quantités de lipides détectés précédemment.

3.3.1. Matériel et méthodes

3.3.1.1. Thermostabilité : suivi de la fluorescence des résidus tryptophane de la protéine lors de l'exposition à une rampe de température

La thermostabilité de BmrA, purifiée dans les différents tensioactifs testés, a été investiguée par mesure de fluorescence : un échantillon de complexes BmrA/tensioactif, tel qu'obtenu en fin de solubilisation et purification, est excité à 285 nm, avec acquisition d'un spectre d'émission de fluorescence sur la plage de longueurs d'ondes comprises entre 300 et 400 nm. L'échantillon est soumis à une rampe en température de 5°C/3min pendant 85 min (passage de 20°C à 100°C), puis ramenée à 20°C. Pour limiter les problèmes dus à l'évaporation de l'échantillon aux températures élevées, la cuvette (de 10 mm de trajet optique) a été fermée hermétiquement avec un capuchon. La variation des propriétés de fluorescence des tryptophanes en fonction de leur environnement a été utilisée pour tenter de détecter la température de dénaturation de BmrA. Un dépliement de la protéine entraîne généralement une exposition des tryptophanes au solvant, normalement détectable en regardant le ratio des intensités à 350 et 330 nm¹⁹¹. Grand merci à l'équipe de chimie physique et biologique de la matière vivante, du département de Chimie de L'ENS Paris, pour l'autorisation d'accès à son spectrofluorimètre, ainsi que pour sa bienveillance ^^.

La thermostabilité de BmrA a également été testée par nano-DSF (nano-differential scanning fluorimetry) : le principe est équivalent avec l'application d'une rampe de température permettant de suivre la dénaturation des protéines grâce à la fluorescence des tryptophanes. Cet appareillage apporte toutefois l'avantage significatif d'une automatisation de la rampe en

température, ainsi qu'une réduction du volume d'échantillon, allant de pair avec une minimisation de son inertie thermique. Grand merci à Jean-Michel Jault, Margo Di Cesare et Cédric Orelle, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, pour les échanges constructifs autour de BmrA, ainsi que pour l'analyse en nano-DSF des échantillons. De même, un grand merci à Korantin Le Mouël (IBPC) et Sébastien Brulé (Institut Pasteur) pour la répétition de ces mesures de nano-DSF.

3.3.1.2. Protéolyse ménagée

La protéolyse ménagée de BmrA dans les différents tensioactifs testés a été effectuée sur la base du protocole mis en place par Breyton *et al.*¹²⁹ : les échantillons de BmrA, solubilisés et purifiés en DDM et en C₈-C₀-50 comme décrit en **Section 3.1.1.2**, sont dilués dans du tampon 50 mM HEPES pH 8, 50 mM NaCl, 10 % glycérol et incubés à 25°C pendant 15 min avant ajout de la trypsine (ratio massique BmrA/trypsine de 1250/1). Un prélèvement de 10 µL est effectué à t = 0, 5, 15, 30, 60 et 120 min, et immédiatement complété avec 2,5 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) 5 % pour arrêter la réaction. Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel d'électrophorèse (12% acrylamide) qui, après migration, a été coloré au bleu de Coomassie.

3.3.1.3. Activité : test d'enzymes couplées

L'activité ATPasique de BmrA a été mesurée en utilisant une méthode basée sur le couplage de la consommation d'ATP à une consommation de NADH à l'aide d'une chaîne de réactions enzymatiques¹⁹²⁻¹⁹⁴ : 2 µg de BmrA purifié en DDM (4 µg de BmrA purifiés en CyclAPols ou SMA(3:1)) sont incubés dans un mélange pyruvate kinase (PK, 60 µg/mL), lactate dehydrogenase (LDH, 32 µg/mL), phosphoenol pyruvate (PEP, 4 mM), ATP (10 mM), MgCl₂ (10 mM), nicotinamide adénine dinucléotide (NADH, 0,25 mM) et DDM (0,34 mM, non-présent dans les échantillons solubilisés avec les polymères) en tampon HEPES 50 mM pH 8. La consommation d'ATP est couplée à la consommation de NADH suivant le schéma réactionnel présenté en **Figure 2.3.4**. L'intérêt de ce couplage réside dans les différences d'absorption à 340 nm du NADH et du NAD⁺ : la décroissance de l' A_{340nm} permet ainsi de suivre en direct la consommation d'ATP, tant que les réactions de couplage ne sont pas cinétiquement limitantes. Un grand merci à Martin Picard pour la présentation de la méthode et les discussions associées.

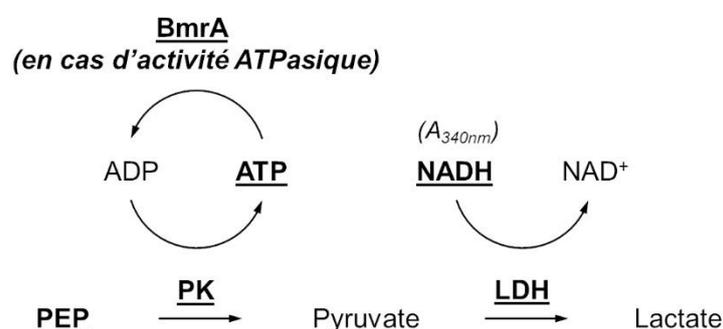


Figure 2.3.4. Illustration de la séquence de réactions couplant la consommation d'ATP à une consommation de NADH en présence de PEP, de PK et de LDH. Les réactifs mis en évidence sont ceux initialement présents dans le mélange réactionnel.

3.3.2. Résultats et discussion

3.3.2.1. Thermostabilité de BmrA

Les premiers tests effectués ont porté sur la stabilité de BmrA en fonction de son environnement, plus précisément sur l'estimation de sa température de dénaturation. A ce titre, des échantillons BmrA/tensioactifs ont été soumis à une rampe de température, avec acquisition en parallèle de spectres d'émission (excitation à 285 nm). La variation des ratios $I_{350\text{nm}} / I_{330\text{nm}}$ avec la température, tracée afin de détecter une éventuelle exposition des tryptophanes¹⁹¹, est présentée en **Figure 2.3.5**.

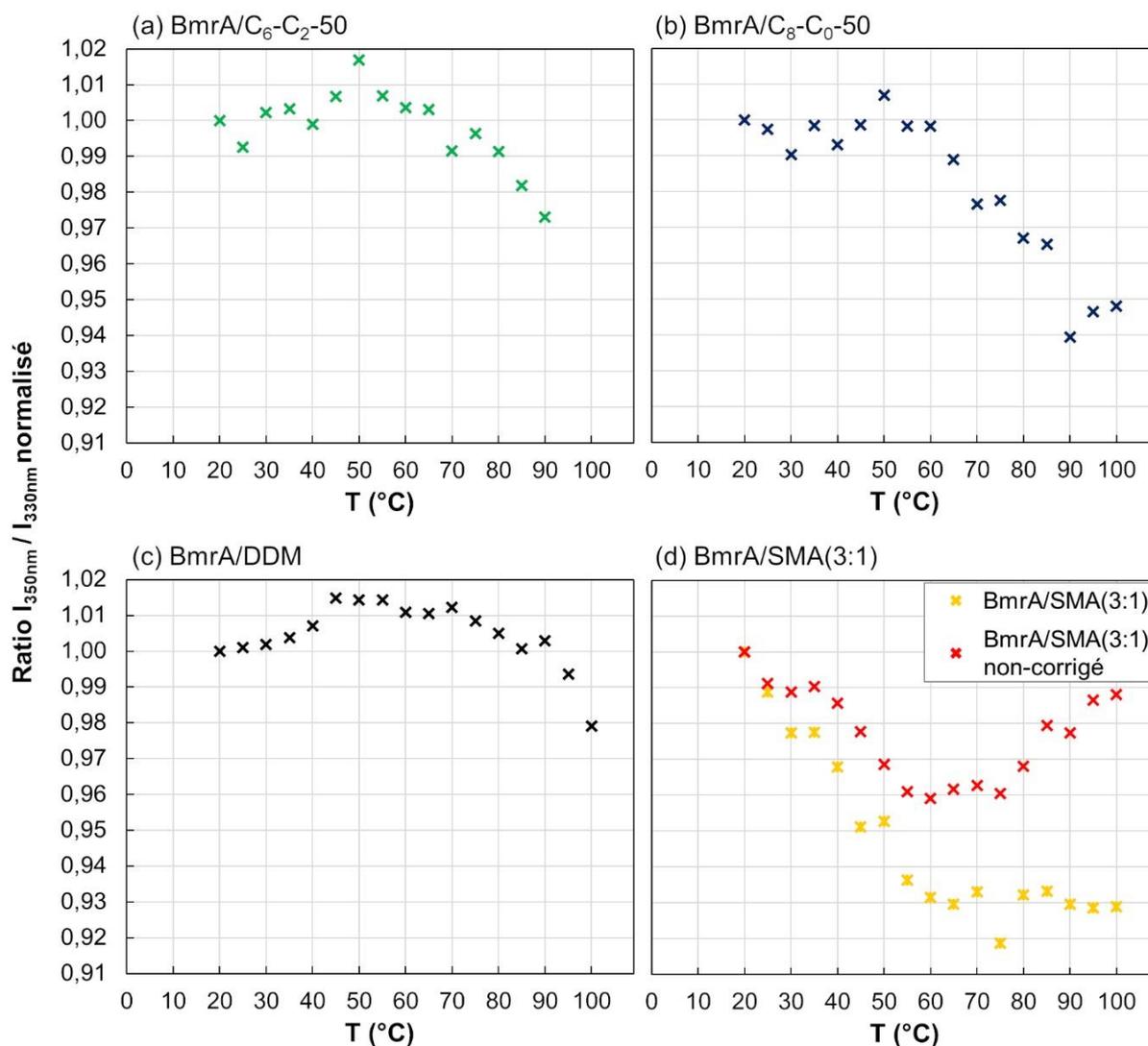


Figure 2.3.5. Variation de la fluorescence des tryptophanes lors de l'exposition d'échantillons de BmrA à une rampe manuelle de température : suivi du ratio $I_{350\text{nm}} / I_{330\text{nm}}$ (excitation à 285 nm) en fonction de la température. Le signal de chaque gamme a été normalisé par le point obtenu à 20°C. Dans le cas du SMA(3:1), une rampe de température a également été appliquée à un blanc (SMA(3:1) à 0,4 g/L en tampon Tris/NaCl), et les spectres obtenus ont été soustraits à ceux obtenus sur l'échantillon BmrA/SMA(3:1) avant calcul des ratios $I_{350\text{nm}} / I_{330\text{nm}}$ (les ratios obtenus en l'absence de correction – points rouges sur la panneau (d) – ont été représentés à titre indicatif).

Les courbes obtenues se sont avérées difficiles à interpréter quel que soit le tensioactif dans lequel BmrA avait été purifié. En premier lieu, leur allure a soulevé pas mal d'interrogations, dans la mesure où en général, une variation sigmoïdale avec infléchissement au niveau de la température de dénaturation est plutôt de mise. Le comportement de l'échantillon BmrA/SMA(3:1) (*panneau (d)*) posait tout particulièrement problème, avec augmentation du ratio à forte température, sans que cela puisse être attribué à une concentration de l'échantillon via évaporation (cellule fermée et niveau constant entre le début et la fin de l'expérience). La compréhension de cette tendance a conduit au principal résultat de cette étude, qui, ironiquement, ne concerne pas du tout BmrA.

Le comportement particulièrement intrigant de l'échantillon en SMA(3:1) a conduit à regarder une éventuelle variation des spectres de fluorescence des tensioactifs (en l'absence de protéine) avec la température. L'exploration effectuée en ce sens est présentée en **Figure 2.3.6**.

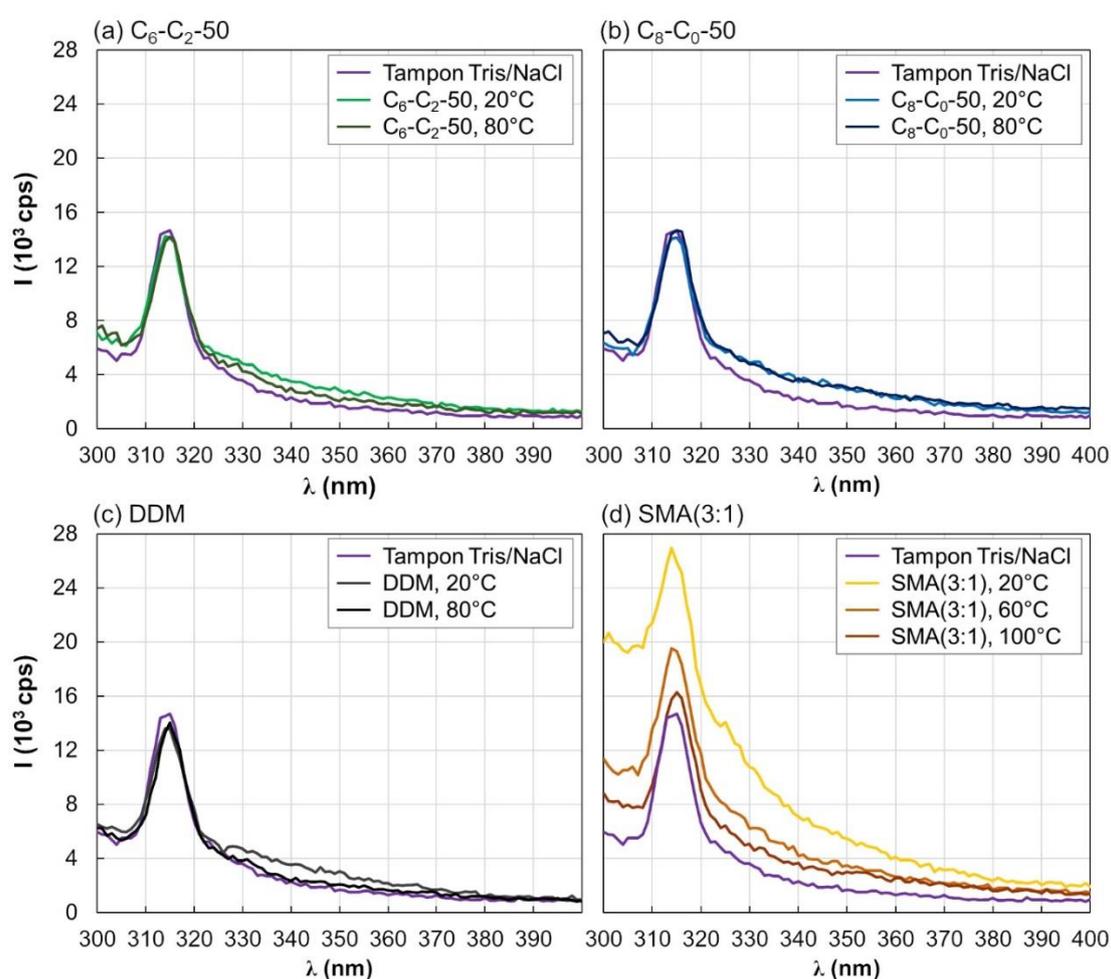


Figure 2.3.6. Exemples de spectres de fluorescence (excitation 285 nm) obtenus sur différents blancs : tampon Tris/NaCl, en absence ou présence de tensioactifs, équilibré à différentes températures. (a) C₆-C₂-50, 0,1 g/L, (b) C₈-C₀-50, 0,1 g/L, (c) DDM, 0,1 mM et (d) SMA(3:1), 0,1 g/L.

Aucun impact significatif de la température sur les spectres acquis n'a pu être mis en évidence dans le cas des CyclAPols ou du DDM. En comparaison, la prise en compte de la contribution intrinsèque du SMA(3:1) s'est avérée nécessaire, avec une forte variation de l'allure des spectres en fonction de la température (*panneau (d)*). Compte-tenu du profil, notamment de l'intensité mesurée aux λ proches de la longueur d'onde d'excitation, il semble probable que cette variation soit due au moins en partie à un problème de diffusion, partiellement résorbé

avec l'augmentation de la température. Cela a toutefois de quoi surprendre, dans la mesure où l'analyse de solutions de SMA(3:1) n'a jamais mis en évidence la présence d'objets de grande taille susceptibles d'induire des phénomènes notables de diffusion, au moins à ma connaissance.

Afin de prendre en compte la contribution du SMA(3:1) lors de l'étude des échantillons BmrA/SMA(3:1), la concentration de polymère au sein de ces échantillons a été mesurée par spectrométrie UV-Vis (plus de détails en Section 3.1.1.3, le ratio massique protéine/polymère trouvé est de l'ordre de 1/2,5). Une solution de SMA(3:1) à cette concentration (0,4 g/L) a ensuite été soumise à la même rampe de température que l'échantillon BmrA/SMA(3:1). Après correction, l'allure de la courbe est un peu plus semblable à celles obtenues dans les autres conditions, même si elles continuent à soulever plusieurs réserves, avec notamment une incertitude sur la durée d'expérimentation (rampes de longue durée nécessaires pour garantir un équilibrage de la température, mais perte du dernier signal en fin d'expérience pour l'échantillon BmrA/C₆-C₂-50, Figure 2.3.5 (a), potentiellement causée par de l'agrégation). Pour lever ces doutes, une analyse de thermostabilité a été menée par nano-DSF, fonctionnant sur le même principe (suivi par fluorescence de l'exposition des tryptophanes), mais permettant de travailler sur des volumes plus faibles et avec des rampes en températures finement contrôlées. Des exemples de résultats sont présentés en **Figure 2.3.7**.

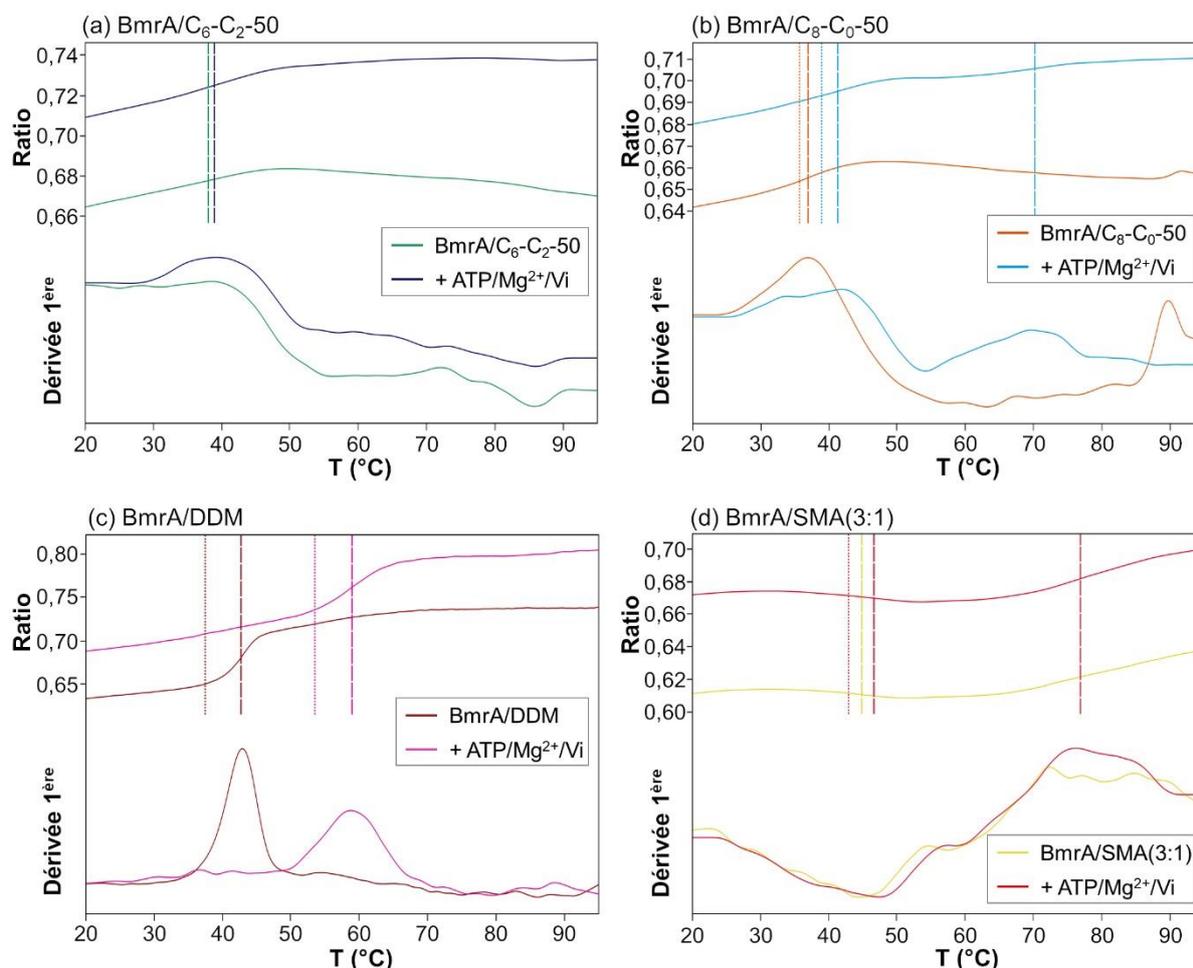


Figure 2.3.7. Variation de la fluorescence des tryptophanes lors de l'exposition d'échantillons de BmrA à une rampe de température automatisée (nano-DSF). Pour chaque tensioactif, la variation du ratio I_{330nm} / I_{350nm} a été mesurée pour l'échantillon de base, ainsi qu'après ajout de ligands (ajout d'ATP/Mg²⁺/Vi aux concentrations 10 mM / 10 mM / 1 mM). Les dérivées de chaque courbe sont également représentées.

L'exemple le plus facilement interprétable a été obtenu dans le cas de l'échantillon BmrA/DDM (**panneau (c)**), montrant une variation sigmoïdale du ratio, avec une température de dénaturation passant de 42,7°C à 58,9°C en présence de ligands. Ce résultat est en bon accord avec la littérature¹⁹⁵. En revanche, les données obtenues avec les échantillons en CyclAPols (**panneaux (a) et (b)**) s'avèrent beaucoup plus difficiles à interpréter, avec notamment une ligne de base mal définie pour la dérivée première. Il semble toutefois ressortir de ces courbes qu'une dénaturation a lieu aux alentours de 40°C. L'ajout de ligand accentue le bruit au niveau de la dérivée première, rendant l'interprétation d'une température de dénaturation encore plus difficile. Les courbes de l'échantillon BmrA/SMA(3:1) vont dans le sens des observations préalables, avec une contribution probable des SMA(3:1) aux signaux de fluorescence qui empêche l'obtention de données exploitables (**panneau (d)**). Ces expériences ont été répétées sur la plateforme de biophysique de l'Institut Pasteur, donnant des résultats similaires à quelques nuances près : pour l'échantillon BmrA/DDM, la température de dénaturation passe de 45,2 à 63,9°C en absence et présence de ligand, respectivement. Par ailleurs, la mesure des spectres entiers des échantillons en présence de ligand a révélé un phénomène de quenching, expliquant l'augmentation du bruit pour ces conditions.

Au final, l'analyse de la thermostabilité de BmrA en CyclAPols et SMA n'a pas été facile à mener, contrairement à celle des échantillons BmrA/DDM. Bien que les valeurs de température de dénaturation de BmrA purifié en CyclAPols soient à prendre avec précaution, la tendance semble pencher vers une stabilité supérieure en environnement DDM, ce qui correspond aussi au cas où l'environnement lipidique est le plus réduit. Afin de compléter ces premières données, des tests visant à mesurer l'activité de BmrA dans les différents tensioactifs, ainsi que sa sensibilité à la protéolyse, ont été effectués.

3.3.2.2. Variation de l'activité et de la stabilité de BmrA en fonction de l'environnement amphiphile

En premier lieu, l'activité ATPasique de BmrA a été mesurée à l'aide d'un test d'enzymes couplées, qui jumèle la consommation d'ATP à celle de NADH, dont l'absorbance à 340 nm permet de suivre la déplétion (illustration en **Figure 2.3.4**, détails expérimentaux en **Section 3.3.1.3**). Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés en **Figure 2.3.8**.

Il est immédiatement apparu que les échantillons de BmrA les plus actifs étaient ceux solubilisés et purifiés en DDM, avec une activité 25 fois supérieure à celle mesurée pour les échantillons solubilisés avec n'importe lequel des 3 autres tensioactifs. Les résultats obtenus en SMA(3:1) sont toutefois à considérer avec précaution, dans la mesure où la température de travail, 37°C, correspond à une température à laquelle le SMA(3:1) semblait provoquer une diffusion significative au cours des expériences de fluorescence (**Figure 2.3.6 (d)**). Des mesures supplémentaires ont été effectuées en CyclAPol et en SMA(3:1) après ajout de DDM. Sur la base des quantités de SMA(3:1) déterminées au sein des échantillons BmrA/SMA(3:1), soit un ratio massique de 2,5 g de SMA (3:1) pour 1 g de BmrA, l'ajout de DDM dans ces échantillons (correspondant à un ratio massique polymère/DDM final de 1/2) a été réalisée dans le but de voir si une partie de l'activité pouvait être restaurée après remplacement, même partiel, du polymère par le DDM. Devant le manque d'impact de cet ajout (aucune variation significative d'activité), un test opposé a été effectué, avec l'ajout de C₆-C₂-50 dans un échantillon BmrA/DDM. Cela a induit une chute d'activité drastique (activité 7,8 fois moins importante que celle de l'échantillon BmrA/DDM initial), qui a été encore réduite après élimination du DDM par ajout de billes de polystyrène (Biobeads), celles-ci captant le détergent en solution, finalisant ainsi le changement d'environnement autour de BmrA du DDM vers le C₆-C₂-50. Ceci a conduit à une activité inférieure à celle des échantillons BmrA/C₆-C₂-50 obtenus par solubilisation directe.

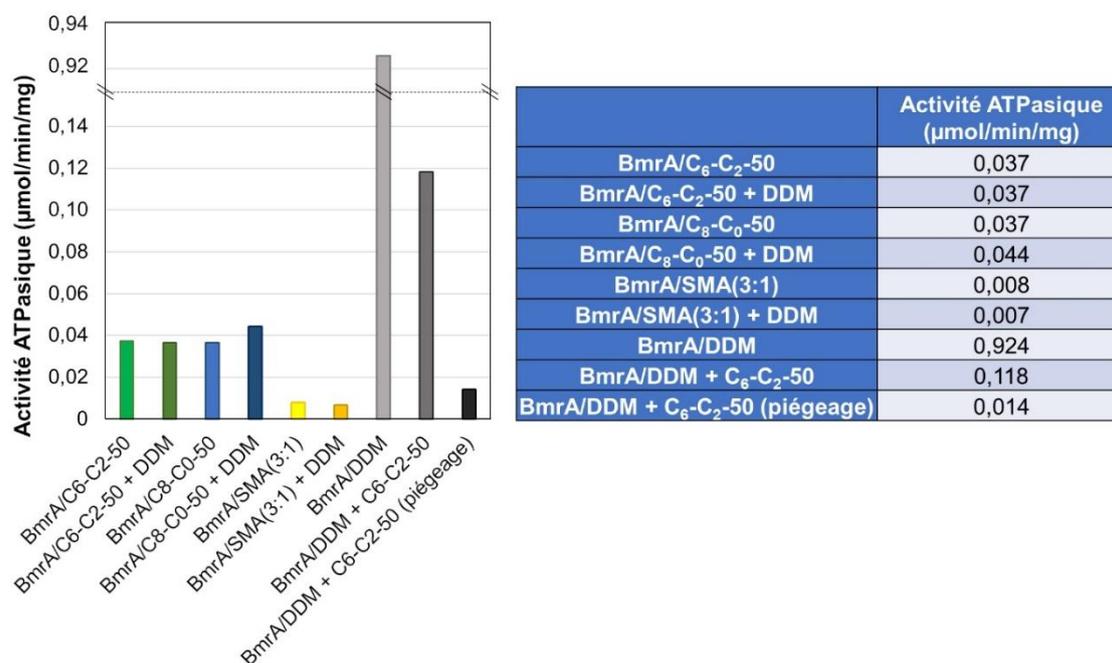


Figure 2.3.8. Résultats des premières investigations sur l'activité ATPasique de BmrA en fonction de son environnement amphiphile. Dans le cas des échantillons solubilisés en CyclAPols et en SMA(3:1), une mesure après ajout de DDM a également été effectuée (ratio massique BmrA/DDM de 1/5, correspondant à une concentration en DDM de 7,2 mM dans l'échantillon avant mélange avec le mix réactionnel, puis à une concentration finale en DDM de 0,8 mM après mélange). Dans le cas de l'échantillon solubilisé en DDM, des mesures après ajout de C₆-C₂-50 ont été effectuées (ratio massique BmrA/C₆-C₂-50 de 1/5, correspondant à une concentration en C₆-C₂-50 de 5 mg/mL avant mélange avec le mix réactionnel, puis à une concentration finale en C₆-C₂-50 de 33 mg/L après mélange), avant et après élimination du DDM via ajout de Biobeads (piégeage). Résultats préliminaires à considérer avec précautions, en raison du manque actuel de répétitions.

A l'heure actuelle, 2 hypothèses sur l'inactivation de BmrA sont actuellement retenues :

- l'activité ATPasique de BmrA requiert la présence d'ions Mg²⁺ dans le milieu, qui peuvent avoir été captés et dépliés par les polymères. Cette hypothèse, mentionnée dans une autre étude portant sur les SMAs¹⁹⁶, semble toutefois assez improbable dans la mesure où en ordre de grandeur, la quantité de fonctions carboxylates des polymères (10 μg de polymère par échantillon, correspondant à 35 nmol de fonctions carboxylates) est négligeable devant la quantité totale de Mg²⁺ présente dans l'échantillon (3 μmol). Par ailleurs, si la déplétion d'ions Mg²⁺ jouait effectivement un rôle prépondérant, l'ajout de C₆-C₂-50 dans l'échantillon BmrA/DDM (ratio massique BmrA/C₆-C₂-50 de 1/5, soit introduction de 10 μg de C₆-C₂-50) devrait induire une chute d'activité similaire à celle observée. Pour vérifier l'ordre de grandeur de la quantité d'ions Mg²⁺ chélatés par les polymères, des mesures de détection des ions par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) ont été récemment entreprises (un grand merci à Grégory Lefèvre, Chimie Paris Tech, pour l'accès à l'instrument et son aide dans la réalisation des mesures,).
- un effet occasionnellement constrictif des amphipols, baptisé effet Gulliver, a été décrit par Picard *et al.*¹⁹⁷ Dans les grandes lignes, il arrive que l'enroulement d'un polymère autour du domaine transmembranaire induise une contrainte suffisante pour limiter, voir interdire les changements de conformation nécessaires à l'activité. Cet effet peut être mitigé avec constitution d'une bouée lipidique au niveau du domaine transmembranaire, faisant tampon entre la PM et le polymère. Dans le cas présent, ce serait cohérent avec les observations faites lors de l'échange DDM vers C₆-C₂-50 : les échantillons solubilisés et purifiés en DDM perdent leur activité au fur et à mesure que l'environnement amphiphile autour de la protéine s'enrichit

en polymère, avec un classement d'activité suivant l'ordre BmrA/DDM > BmrA/DDM/CyclAPol > BmrA/CyclAPol. De plus les échantillons BmrA/DDM étant plus délipidés que BmrA solubilisés en CyclAPols, l'impact négatif du polymère sur l'activité de BmrA lors du passage en environnement C₆-C₂-50 est plus important que dans le cas d'une solubilisation directe en C₆-C₂-50, qui permet de conserver un plus grand nombre de lipides. Cette observation mériterait d'être creusée, en mettant au point par exemple des conditions de solubilisation où le contenu en lipides des complexes serait plus élevé que celui obtenu ici. Une option serait d'adapter les protocoles utilisés pour la reconstitution de protéine en nanodisques. Cela se traduirait ici par l'ajout d'un mélange lipides/DDM à l'échantillon de BmrA purifié en DDM, provoquant l'enrichissement en lipides de l'échantillon, suivi d'un ajout de polymère et d'une élimination du détergent à l'aide de Biobeads. En alternative, une procédure à base de reconstitution de protéine membranaire en protéoliposomes suivie d'une extraction par ajout de polymère, déjà décrite dans le cas d'une extraction en SMA¹⁹⁸, pourra être testée, en permettant éventuellement d'enrichir les complexes BmrA/polymère en lipides. Cette campagne d'expériences permettrait potentiellement de tester si, d'une part, les CyclAPols et le SMA(3:1) limitent l'activité de BmrA via effet Gulliver et si, d'autre part, cet effet peut être mitigé par la quantité de lipides présents.

Un ultime test a été effectué, pour continuer l'exploration en sondant l'éventuelle variation de la flexibilité de BmrA en fonction de son environnement. A cet effet, des échantillons de BmrA solubilisée en DDM et en C₈-C₀-50 ont été utilisés pour une expérience de protéolyse ménagée, dont les résultats sont présentés en **Figure 2.3.9**.

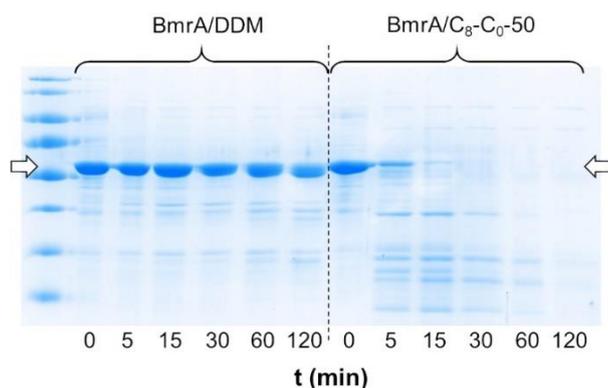


Figure 2.3.9. Protéolyse ménagée d'échantillons de BmrA solubilisés en DDM et en C₈-C₀-50 (25°C, digestion trypsique au ratio massique BmrA/trypsine de 1250/1). Les échantillons ont migré sur gel polyacrylamide-SDS (12% d'acrylamide), qui a été ensuite coloré à l'InstantBlue Coomassie Stain.

L'expérience consistait à suivre la cinétique de dégradation de BmrA après exposition à la trypsine. Là où l'échantillon est resté stable pendant au moins 2 h dans le cas du DDM, une dégradation totale en moins de 15 min a été observée pour l'échantillon solubilisé en C₈-C₀-50. Cette dégradation rapide peut être signe d'une faible stabilité de l'échantillon, mais peut aussi découler d'une stabilisation de la protéine dans une conformation particulièrement exposée à la digestion trypsique, une forme de blocage par effet Gulliver du CyclAPol. Cette hypothèse expliquerait également la perte d'activité observée, la protéine ne pouvant pas accomplir de changements conformationnels en raison des contraintes imposées par la ceinture de polymères. L'expérience serait à reproduire et à étendre aux autres polymères, mais elle va quand-même nettement dans le sens des observations précédentes, à savoir qu'à l'heure actuelle, et malgré son caractère plus délipidant que les alternatives polymères, les détergents comme le DDM (cette étude) ou le LMNG comme reporté précédemment¹⁹⁵, voire les nanodisques (communication personnelle de J.-M. Jault & C. Orelle) sont de meilleurs environnements pour l'étude de BmrA.

Ouverture : polymères amphiphiles et nanodisques

La question de la structuration des échantillons de BmrA purifié en CyclAPols et en SMA a été soulevée. Les SMAs sont réputés pour leur capacité à former des SMALPs (SMA lipids particles)¹⁸⁸, à l'architecture comparable aux systèmes de nanodisques (une protéine membranaire dans un environnement lipidique, natif ou reconstitué, avec une cohérence maintenue par un agent structurant, SMA ou MSP, membrane scaffold protein). Vu les résultats proches obtenus en SMA et en CyclAPols, notamment en termes de quantité de lipides co-purifiés, ne serait-il pas possible que ces derniers puissent également former des assemblages proches des nanodisques ?

L'exploration reste à ce jour très rudimentaire, et n'a pas encore été menée sur des systèmes biologiques : une solubilisation (température ambiante, env. 3 h) de liposomes de DMPC (protocole en **Section 2.1.1.2**) a été effectuée avec le C₈-C₀-50 (ratio massique DMPC/C₈-C₀-50 de 1/1) en tampon Tris/NaCl, avec une concentration finale de DMPC de 2 mg/mL. L'échantillon, uniquement composé de lipides et de CyclAPol, a ensuite été préparé pour une observation en coloration négative (marquage PTA). Cette dernière étape, ainsi que les observations, ont été effectuées sur la plateforme de microscopie électronique d'ImaGIF, avec l'aide très sympathique de Claire Boulogne et Cynthia Gillet. Un exemple d'images acquises est présenté en **Figure 2.4.1**.

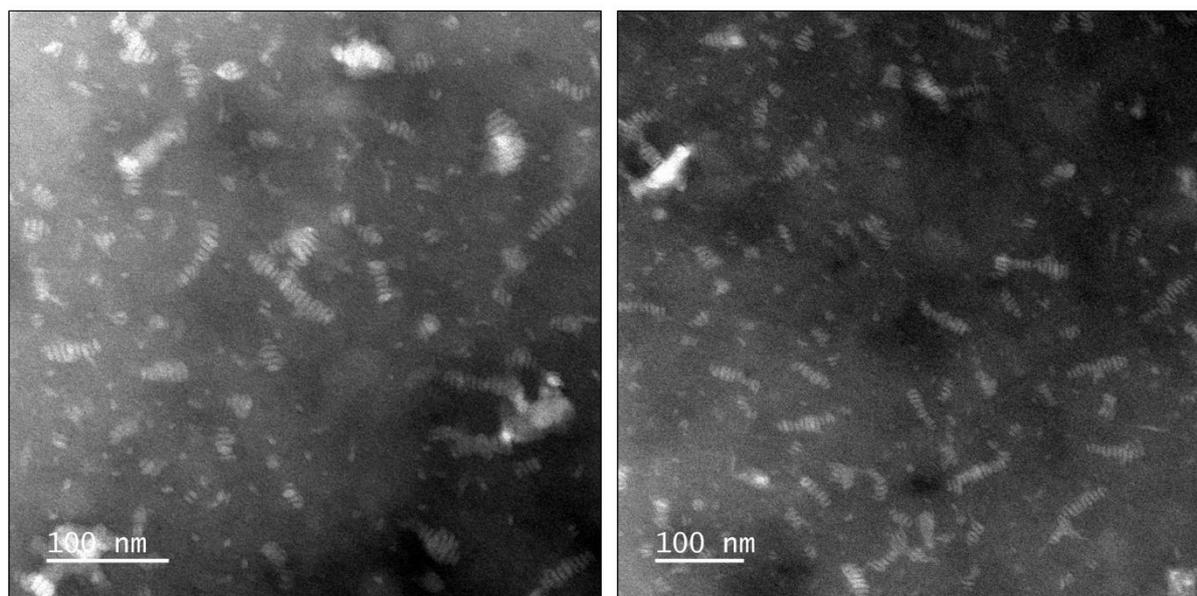


Figure 2.4.1. Images obtenues en microscopie électronique (coloration négative, marquage PTA) après solubilisation de liposomes de DMPC par le C₈-C₀-50. Les empilements observés résultent potentiellement d'un artefact lié à la coloration.

Ces images révèlent la présence d'une grande quantité d'objets discoïdaux d'une dizaine de nm de diamètre, majoritairement agencés sous forme d'empilements (spontanément décrits comme « spaghettis de disques » aux moments des premières observations), mais également visibles de face par endroits. A l'heure actuelle, ces empilements sont considérés comme un artefact causé par le traitement nécessaire à l'observation en coloration négative¹⁹⁹. La meilleure manière de s'en affranchir est de faire les observations sans traitement, en milieu aqueux, par visualisation de ces structures en cryo-microscopie électronique (projet qui devait se faire sur la plateforme de cryo-EM du LPS avec Amélie Leforestier et Jéril Degrouard).

Résumé

Les CyclAPols développés au cours de la thèse d'Anaïs Marconnet ont montré des différences significatives avec les SMA au niveau de leur propriété de solubilisation (concentration minimale en polymère pour extraire les protéines, moindre dépendance à la fluidité des membranes et au contenu lipidique, comme illustré par la fusion de DMPC à la membrane pourpre), de la stabilité des protéines (cas de la BR après extraction), ainsi que des propriétés optiques (comportement différent en fluorescence). Pour les différents systèmes testés, les CyclAPols ont exhibé des capacités de solubilisation remarquables, sans toutefois pouvoir prétendre au titre de solution miracle et universelle, comme l'attestent les résultats mitigés avec BmrA (très bonne solubilisation, préservation d'un certain nombre de lipides natifs, mais impact délétère sur l'activité ATPasique). Ils représentent quand même une alternative viable aux tensioactifs existants sur d'autres systèmes, comme illustré par l'étude actuellement menée par Korantin Le Mouël au sein du laboratoire sur le récepteur de l'acétylcholine, où la protéine est pleinement active en solution après solubilisation en CyclAPols, et plus stable en CylcAPols qu'en DDM. En somme, il ne manque qu'une multiplication d'études sur des systèmes variés pour estimer plus précisément la versatilité des CyclAPols, ce qui devrait être grandement aidé par leur entrée récente sur le marché (uniquement le C₈-C₀-50 à ce jour, commercialisé par Cube Biotech).

Synthèse

L'essor de la cryo-EM depuis une dizaine d'année l'a élevé au rang de technique de référence en biologie structurale, notamment en raison de son potentiel pour donner accès à des structures de macromolécules biologiques avec une résolution quasi-atomique^{16,200–202}. Parmi les principaux freins actuellement rencontrés figurent le manque de contrôle dans la préparation d'échantillon, impliquant une multiplication des grilles préparées, et l'occurrence régulière de problèmes d'orientation préférentielle, réduisant la qualité des structures obtenues. Les études menées sur l'APol A8-35 ont souligné son potentiel pour s'attaquer à ces deux limitations, simplement par introduction d'une quantité précise d'A8-35 dans les échantillons avant dépôt sur grille. Les quelques parallèles mis par ailleurs en évidence entre propriétés physico-chimiques des solutions et leur comportement sur grille ouvre potentiellement la voie pour rechercher rapidement des propriétés similaires chez les autres tensioactifs classiquement utilisés en cryo-EM. Idéalement, ces différents résultats aideront à rationaliser et à gagner en efficacité dans la préparation d'échantillons, le temps que les nouvelles méthodes, qui permettent de s'affranchir de l'étape critique d'épongeage, se démocratisent.

Dérivés de l'A8-35 et porteurs de chaînes cycliques semblables à celles donnant leurs propriétés de solubilisation aux SMAs, les CyclAPols ont fait leurs preuves quant à leur capacité à extraire et maintenir en solution une variété de protéines membranaires. Si l'on manque encore un peu de recul quant à leur dépendance au système étudié, leur récente arrivée sur le marché devrait aider à démocratiser leur usage, tout en multipliant les informations sur leurs propriétés. Aux vues de la préservation des lipides co-extraits, et de leur capacité probable à former des disques lipidiques rappelant les nanodisques, sur le même principe que les SMALPs en SMA, les CyclAPols semblent remplir les critères pour diversifier la « boîte à outils » utile à la manipulation des protéines membranaires en solution aqueuse.

Bien que les informations manquent encore sur la question, il sera intéressant de voir comment se passe la comparaison en cryo-EM entre l'A8-35 historique et les CyclAPols, petits derniers dans la famille. Pour boucler la boucle, leur portage en cryo-microscopie électronique était initialement prévu. Naturellement, leur comportement ne sera pas rigoureusement identique à celui de l'A8-35, mais il serait surprenant qu'ils s'avèrent complètement dénués d'effet sur la stabilité et l'épaisseur des films de glace. Une première validation de l'utilisation des CyclAPols pour l'étude structurale d'une protéine membranaire en cryo-EM a été publiée en 2021²⁰³. Si cette tendance se confirme, les CyclAPols pourraient ainsi constituer un outil de choix tout au long de la manipulation des protéines membranaires, de la solubilisation et purification au dépôt sur grille de cryo-EM. Le temps a toutefois manqué pour pousser l'exploration jusqu'à ce point, et il faudra attendre les retours et publications des divers utilisateurs actuels pour avoir des débuts d'informations quant à la viabilité des CyclAPols en cryo-EM.

Bibliographie

- (1) Flötenmeyer, M.; Weiss, H.; Tribet, C.; Popot, J.-L.; Leonard, K. The Use of Amphipathic Polymers for Cryo Electron Microscopy of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *J Microsc* **2007**, *227* (3), 229–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01805.x>.
- (2) Baker, M. R.; Fan, G.; Serysheva, I. I. Single-Particle Cryo-EM of the Ryanodine Receptor Channel in an Aqueous Environment. *Basic Appl Myol* **2015**, *25* (1), 35–48.
- (3) Marconnet, A. Synthèse et caractérisation de nouveaux amphipols, polymères amphiphiles dédiés à l'étude de protéines membranaires. *Thèse @Université de Paris* **2019**, 177.
- (4) Marconnet, A.; Michon, B.; Le Bon, C.; Giusti, F.; Tribet, C.; Zoonens, M. Solubilization and Stabilization of Membrane Proteins by Cycloalkane-Modified Amphiphilic Polymers. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (8), 3459–3467. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00929>.
- (5) Ruska, E. The Development of the Electron Microscope and of Electron Microscopy. *Bioscience Reports* **1987**, *7* (8), 607–629. <https://doi.org/10.1007/BF01127674>.
- (6) Wang, F.; Zhang, H.-B.; Cao, M.; Nishi, R.; Takaoka, A. Image Quality of Microns-Thick Specimens in the Ultra-High Voltage Electron Microscope. *Micron* **2010**, *41* (5), 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.01.010>.
- (7) Nishida, T.; Yoshimura, R.; Endo, Y. Three-Dimensional Fine Structure of the Organization of Microtubules in Neurite Varicosities by Ultra-High Voltage Electron Microscope Tomography. *Cell Tissue Res* **2017**, *369* (3), 467–476. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2645-5>.
- (8) Rose, H. Correction of Aberrations, a Promising Means for Improving the Spatial and Energy Resolution of Energy-Filtering Electron Microscopes. *Ultramicroscopy* **1994**, *56* (1–3), 11–25. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(94\)90142-2](https://doi.org/10.1016/0304-3991(94)90142-2).
- (9) Haider, M.; Hartel, P.; Müller, H.; Uhlemann, S.; Zach, J. Current and Future Aberration Correctors for the Improvement of Resolution in Electron Microscopy. *Phil. Trans. R. Soc. A* **2009**, *367*, 3665–3682. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0121>.
- (10) Tanishiro, Y.; Okamoto, K.; Takeguchi, M.; Minoda, H.; Suzuki, T.; Yagi, K. Design Features of a New Ultra-High Vacuum Electron Microscope with an Omega Filter. *Journal of Electron Microscopy* **1999**, *48* (6), 837–842. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a023755>.
- (11) Zhou, Z. H.; Chiu, W. Prospects for Using an IVEM with a FEG for Imaging Macromolecules towards Atomic Resolution. *Ultramicroscopy* **1993**, *49* (1–4), 407–416. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(93\)90246-T](https://doi.org/10.1016/0304-3991(93)90246-T).
- (12) Nagayama, K. Development of Phase Plates for Electron Microscopes and Their Biological Application. *Eur Biophys J* **2008**, *37* (4), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0264-5>.
- (13) Chua, E. Y. D.; Vogirala, V. K.; Inian, O.; Wong, A. S. W.; Nordenskiöld, L.; Plitzko, J. M.; Danev, R.; Sandin, S. 3.9 Å Structure of the Nucleosome Core Particle Determined by Phase-Plate Cryo-EM. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44* (17), 8013–8019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw708>.
- (14) Khoshouei, M.; Radjainia, M.; Baumeister, W.; Danev, R. Cryo-EM Structure of Haemoglobin at 3.2 Å Determined with the Volta Phase Plate. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 16099. <https://doi.org/10.1038/ncomms16099>.
- (15) Kühlbrandt, W. The Resolution Revolution. *Biochemistry* **2014**, *343*, 1443–1444.
- (16) Le Bon, C.; Michon, B.; Popot, J.-L.; Zoonens, M. Amphipathic Environments for Determining the Structure of Membrane Proteins by Single-Particle Electron Cryo-Microscopy. *Quart. Rev. Biophys.* **2021**, *54*, e6. <https://doi.org/10.1017/S0033583521000044>.
- (17) Henderson, R.; Unwin, P. N. T. Three-Dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron Microscopy. *Nature* **1975**, *257* (5521), 28–32. <https://doi.org/10.1038/257028a0>.

- (18) Nannenga, B. L.; Gonen, T. The Cryo-EM Method Microcrystal Electron Diffraction (MicroED). *Nat Methods* **2019**, *16* (5), 369–379. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0395-x>.
- (19) Brenner, S.; Horne, R. W. A Negative Staining Method for High Resolution Electron Microscopy of Viruses. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1959**, *34*, 8.
- (20) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J.-J.; Homo, J.-C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Quart. Rev. Biophys.* **1988**, *21* (2), 129–228. <https://doi.org/10.1017/S0033583500004297>.
- (21) Lepault, J.; Booy, F. P.; Dubochet, J. Electron Microscopy of Frozen Biological Suspensions. *Journal of Microscopy* **1983**, *129* (1), 89–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04163.x>.
- (22) Dubochet, J.; McDowell, A. W. Vitrification of Pure Water for Electron Microscopy. *Journal of Microscopy* **1981**, *124* (3), 3–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x>.
- (23) De Rosier, D. J.; Klug, A. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature* **1968**, *217* (5124), 130–134. <https://doi.org/10.1038/217130a0>.
- (24) Frank, J.; Al-Ali, L. Signal-to-Noise Ratio of Electron Micrographs Obtained by Cross Correlation. **1975**, *256*, 4.
- (25) Frank, J. Averaging of Low Exposure Electron Micrographs of Non-Periodic Objects. *Ultramicroscopy* **1975**, *1*, 154–162.
- (26) Van Heel, M.; Frank, J. Use of Multivariate Statistics in Analysing the Images of Biological Macromolecules. *Ultramicroscopy* **1981**, *6*, 187–194.
- (27) Bai, X. Seeing Atoms by Single-Particle Cryo-EM. *Trends in Biochemical Sciences* **2021**, *46* (4), 253–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.001>.
- (28) Cheng, Y. Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution. *Cell* **2015**, *161* (3), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.049>.
- (29) Cheng, Y. Single-Particle Cryo-EM—How Did It Get Here and Where Will It Go. *Science* **2018**, *361* (6405), 876–880. <https://doi.org/10.1126/science.aat4346>.
- (30) Nakane, T.; Kotecha, A.; Sente, A.; McMullan, G.; Masiulis, S.; Brown, P. M. G. E.; Grigoras, I. T.; Malinauskaite, L.; Malinauskas, T.; Miehl, J.; Uchański, T.; Yu, L.; Karia, D.; Pechnikova, E. V.; de Jong, E.; Keizer, J.; Bischoff, M.; McCormack, J.; Tiemeijer, P.; Hardwick, S. W.; Chirgadze, D. Y.; Murshudov, G.; Aricescu, A. R.; Scheres, S. H. W. Single-Particle Cryo-EM at Atomic Resolution. *Nature* **2020**, *587* (7832), 152–156. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2829-0>.
- (31) Dowell, L. G.; Rinfret, A. P. Low-Temperature Forms of Ice as Studied by X-Ray Diffraction. *Nature* **1960**, *188* (4757), 1144–1148. <https://doi.org/10.1038/1881144a0>.
- (32) Dubochet, J.; Lepault, J.; Freeman, R.; Berriman, J. A.; Homo, J.-C. Electron Microscopy of Frozen Water and Aqueous Solutions. *Journal of Microscopy* **1982**, *128* (3), 219–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1982.tb04625.x>.
- (33) Russo, C. J.; Passmore, L. A. Progress towards an Optimal Specimen Support for Electron Cryomicroscopy. *Current Opinion in Structural Biology* **2016**, *37*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.12.007>.
- (34) Russo, C. J.; Passmore, L. A. Ultrastable Gold Substrates for Electron Cryomicroscopy. *Science* **2014**, *346* (6215), 1377–1380. <https://doi.org/10.1126/science.1259530>.
- (35) Aebi, U.; Pollard, T. D. A Glow Discharge Unit to Render Electron Microscope Grids and Other Surfaces Hydrophilic. *J. Elec. Microsc. Tech.* **1987**, *7* (1), 29–33. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060070104>.
- (36) Isabell, T. C.; Fischione, P. E.; O’Keefe, C.; Guruz, M. U.; Dravid, V. P. Plasma Cleaning and Its Applications for Electron Microscopy. *Microsc Microanal* **1999**, *5* (2), 126–135. <https://doi.org/10.1017/S1431927699000094>.
- (37) Russo, C. J.; Passmore, L. A. Controlling Protein Adsorption on Graphene for Cryo-EM Using Low-Energy Hydrogen Plasmas. *Nat Methods* **2014**, *11* (6), 649–652. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2931>.
- (38) Quispe, J.; Damiano, J.; Mick, S. E.; Nackashi, D. P.; Fellmann, D.; Ajero, T. G.; Carragher, B.; Potter, C. S. An Improved Holey Carbon Film for Cryo-Electron

- Microscopy. *Microsc Microanal* **2007**, *13* (5), 365–371. <https://doi.org/10.1017/S1431927607070791>.
- (39) Armstrong, M.; Han, B.-G.; Gomez, S.; Turner, J.; Fletcher, D. A.; Glaeser, R. M. Microscale Fluid Behavior during Cryo-EM Sample Blotting. *Biophysical Journal* **2019**, *19*, 21.
- (40) Yu, G.; Li, K.; Jiang, W. Antibody-Based Affinity Cryo-EM Grid. *Methods* **2016**, *100*, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.01.010>.
- (41) Ravelli, R. B. G.; Nijpels, F. J. T.; Henderikx, R. J. M.; Weissenberger, G.; Thewessem, S.; Gijssbers, A.; Beulen, B. W. A. M. M.; López-Iglesias, C.; Peters, P. J. Cryo-EM Structures from Sub-NI Volumes Using Pin-Printing and Jet Vitrification. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 2563. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16392-5>.
- (42) Ashtiani, D.; Venugopal, H.; Belousoff, M.; Spicer, B.; Mak, J.; Neild, A.; de Marco, A. Delivery of Femtolitre Droplets Using Surface Acoustic Wave Based Atomisation for Cryo-EM Grid Preparation. *Journal of Structural Biology* **2018**, *203* (2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.03.012>.
- (43) Kontziampasis, D.; Klebl, D. P.; Iadanza, M. G.; Scarff, C. A.; Kopf, F.; Sobott, F.; Monteiro, D. C. F.; Trebbin, M.; Muench, S. P.; White, H. D. A Cryo-EM Grid Preparation Device for Time-Resolved Structural Studies. *IUCrJ* **2019**, *6* (6), 1024–1031. <https://doi.org/10.1107/S2052252519011345>.
- (44) Jain, T.; Sheehan, P.; Crum, J.; Carragher, B.; Potter, C. S. Spotiton: A Prototype for an Integrated Inkjet Dispense and Vitrification System for Cryo-TEM. *Journal of Structural Biology* **2012**, *179* (1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.04.020>.
- (45) Razinkov, I.; Dandey, V. P.; Wei, H.; Zhang, Z.; Melnekoff, D.; Rice, W. J.; Wigge, C.; Potter, C. S.; Carragher, B. A New Method for Vitrifying Samples for CryoEM. *Journal of Structural Biology* **2016**, *195* (2), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.001>.
- (46) Arnold, S. A.; Albiez, S.; Bieri, A.; Syntychaki, A.; Adaixo, R.; McLeod, R. A.; Goldie, K. N.; Stahlberg, H.; Braun, T. Blotting-Free and Lossless Cryo-Electron Microscopy Grid Preparation from Nanoliter-Sized Protein Samples and Single-Cell Extracts. *Journal of Structural Biology* **2017**, *197* (3), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.11.002>.
- (47) Ahn, J.; Lee, D.; Jo, I.; Jeong, H.; Hyun, J.-K.; Woo, J.-S.; Choi, S.-H.; Ha, N.-C. Real-Time Measurement of the Liquid Amount in Cryo-Electron Microscopy Grids Using Laser Diffraction of Regular 2-D Holes of the Grids. *Molecules and Cells* **2020**, *43* (3), 298–303. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2020.2238>.
- (48) Zhang, F.; Zhang, W. B.; Shi, Z.; Wang, D.; Jin, J.; Jiang, L. Nanowire-Haired Inorganic Membranes with Superhydrophilicity and Underwater Ultralow Adhesive Superoleophobicity for High-Efficiency Oil/Water Separation. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (30), 4192–4198. <https://doi.org/10.1002/adma.201301480>.
- (49) Wei, H.; Dandey, V. P.; Zhang, Z.; Raczkowski, A.; Rice, W. J.; Carragher, B.; Potter, C. S. Optimizing “Self-Wicking” Nanowire Grids. *Journal of Structural Biology* **2018**, *202* (2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.01.001>.
- (50) Angert, I.; Burmester, C.; Dinges, C.; Rose, H.; Schröder, R. R. Elastic and Inelastic Scattering Cross-Sections of Amorphous Layers of Carbon and Vitrified Ice. *Ultramicroscopy* **1996**, *63*, 181–192.
- (51) Feja, B.; Aebi, U. Determination of the Inelastic Mean Free Path of Electrons in Vitrified Ice Layers for On-Line Thickness Measurements by Zero-Loss Imaging. *Journal of Microscopy* **1999**, *193* (1), 15–19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1999.00436.x>.
- (52) Rice, W. J.; Cheng, A.; Noble, A. J.; Eng, E. T.; Kim, L. Y.; Carragher, B.; Potter, C. S. Routine Determination of Ice Thickness for Cryo-EM Grids. *Journal of Structural Biology* **2018**, *204* (1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.06.007>.
- (53) Brown, H. G.; Hanssen, E. MeasureIce: Accessible on-the-Fly Measurement of Ice Thickness in Cryo-Electron Microscopy. **2021**. <https://doi.org/10.1101/2021.12.08.471523>.
- (54) Noble, A. J.; Dandey, V. P.; Wei, H.; Brasch, J.; Chase, J.; Acharya, P.; Tan, Y. Z.; Zhang, Z.; Kim, L. Y.; Scapin, G.; Rapp, M.; Eng, E. T.; Rice, W. J.; Cheng, A.; Negro,

- C. J.; Shapiro, L.; Kwong, P. D.; Jeruzalmi, D. Routine Single Particle CryoEM Sample and Grid Characterization by Tomography. *eLife* **2018**, *7*, 42.
- (55) Kojima, R.; Yoshidome, T. A Measure for the Identification of Preferred Particle Orientations in Cryo-Electron Microscopy Data: A Simulation Study. *BIOPHYSICS* **2021**, *18* (0), 96–107. <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v18.011>.
- (56) Glaeser, R. M.; Han, B.-G. Opinion: Hazards Faced by Macromolecules When Confined to Thin Aqueous Films. *Biophys Rep* **2017**, *3*(1–3), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s41048-016-0026-3>.
- (57) D’Imprima, E.; Floris, D.; Joppe, M.; Sánchez, R.; Grininger, M.; Kühlbrandt, W. Protein Denaturation at the Air-Water Interface and How to Prevent It. *eLife* **2019**, *8*, e42747. <https://doi.org/10.7554/eLife.42747>.
- (58) Noble, A. J.; Wei, H.; Dandey, V. P.; Zhang, Z.; Tan, Y. Z.; Potter, C. S.; Carragher, B. Reducing Effects of Particle Adsorption to the Air–Water Interface in Cryo-EM. *Nat Methods* **2018**, *15* (10), 793–795. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0139-3>.
- (59) Carragher, B.; Cheng, Y.; Frost, A.; Glaeser, R. M.; Lander, G. C.; Nogales, E.; Wang, H. -W. Current Outcomes When Optimizing ‘Standard’ Sample Preparation for Single-particle Cryo-EM. *Journal of Microscopy* **2019**, *276* (1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/jmi.12834>.
- (60) Glaeser, R. M.; Han, B.-G.; Csencsits, R.; Killilea, A.; Pulk, A.; Cate, J. H. D. Factors That Influence the Formation and Stability of Thin, Cryo-EM Specimens. *Biophysical Journal* **2016**, *110* (4), 749–755. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.07.050>.
- (61) Han, B.-G.; Glaeser, R. M. Simple Assay for Adsorption of Proteins to the Air–Water Interface. *Journal of Structural Biology* **2021**, *213* (4), 107798. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107798>.
- (62) Chen, J.; Noble, A. J.; Kang, J. Y.; Darst, S. A. Eliminating Effects of Particle Adsorption to the Air/Water Interface in Single-Particle Cryo-Electron Microscopy: Bacterial RNA Polymerase and CHAPSO. *Journal of Structural Biology: X* **2019**, *1*, 100005. <https://doi.org/10.1016/j.yjsbx.2019.100005>.
- (63) Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J.-L. Amphipols: Polymers That Keep Membrane Proteins Soluble in Aqueous Solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (26), 15047–15050. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15047>.
- (64) Gohon, Y.; Giusti, F.; Prata, C.; Charvolin, D.; Timmins, P.; Ebel, C.; Tribet, C.; Popot, J.-L. Well-Defined Nanoparticles Formed by Hydrophobic Assembly of a Short and Polydisperse Random Terpolymer, Amphipol A8-35. *Langmuir* **2006**, *22* (3), 1281–1290. <https://doi.org/10.1021/la052243g>.
- (65) Giusti, F.; Popot, J.-L.; Tribet, C. Well-Defined Critical Association Concentration and Rapid Adsorption at the Air/Water Interface of a Short Amphiphilic Polymer, Amphipol A8-35: A Study by Förster Resonance Energy Transfer and Dynamic Surface Tension Measurements. *Langmuir* **2012**, *28* (28), 10372–10380. <https://doi.org/10.1021/la300774d>.
- (66) Giusti, F.; Rieger, J.; Catoire, L. J.; Qian, S.; Calabrese, A. N.; Watkinson, T. G.; Casiraghi, M.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E.; Popot, J.-L. Synthesis, Characterization and Applications of a Perdeuterated Amphipol. *J Membrane Biol* **2014**, *247* (9–10), 909–924. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9656-x>.
- (67) Vial, F.; Rabhi, S.; Tribet, C. Association of Octyl-Modified Poly(Acrylic Acid) onto Unilamellar Vesicles of Lipids and Kinetics of Vesicle Disruption. *Langmuir* **2005**, *21* (3), 853–862. <https://doi.org/10.1021/la048039v>.
- (68) Opačić, M.; Giusti, F.; Popot, J.-L.; Broos, J. Isolation of Escherichia Coli Mannitol Permease, Ellmtl, Trapped in Amphipol A8-35 and Fluorescein-Labeled A8-35. *J Membrane Biol* **2014**, *247* (9–10), 1019–1030. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9691-7>.
- (69) Charvolin, D.; Perez, J.-B.; Rouvière, F.; Giusti, F.; Bazzacco, P.; Abdine, A.; Rappaport, F.; Martinez, K. L.; Popot, J.-L. The Use of Amphipols as Universal Molecular Adapters to Immobilize Membrane Proteins onto Solid Supports. *PNAS* **2009**, *106* (2), 405–410. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807132106>.

- (70) Giusti, F.; Kessler, P.; Hansen, R. W.; Della Pia, E. A.; Le Bon, C.; Mourier, G.; Popot, J.-L.; Martinez, K. L.; Zoonens, M. Synthesis of a Polyhistidine-Bearing Amphipol and Its Use for Immobilizing Membrane Proteins. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (12), 3751–3761. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01010>.
- (71) Zoonens, M.; Catoire, L. J.; Giusti, F.; Popot, J.-L. NMR Study of a Membrane Protein in Detergent-Free Aqueous Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102* (25), 8893–8898. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503750102>.
- (72) Catoire, L. J.; Damian, M.; Giusti, F.; Martin, A.; Heijenoort, C. van; Popot, J.-L.; Guittet, É.; Banères, J.-L. Structure of a GPCR Ligand in Its Receptor-Bound State: Leukotriene B4 Adopts a Highly Constrained Conformation When Associated to Human BLT2. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (26), 9049–9057. <https://doi.org/10.1021/ja101868c>.
- (73) Picard, M.; Dahmane, T.; Garrigos, M.; Gauron, C.; Giusti, F.; le Maire, M.; Popot, J.-L.; Champeil, P. Protective and Inhibitory Effects of Various Types of Amphipols on the Ca²⁺-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: A Comparative Study. *Biochemistry* **2006**, *45* (6), 1861–1869. <https://doi.org/10.1021/bi051954a>.
- (74) Tribet, C.; Diab, C.; Dahmane, T.; Zoonens, M.; Popot, J.-L.; Winnik, F. M. Thermodynamic Characterization of the Exchange of Detergents and Amphipols at the Surfaces of Integral Membrane Proteins. *Langmuir* **2009**, *25* (21), 12623–12634. <https://doi.org/10.1021/la9018772>.
- (75) Dahmane, T.; Giusti, F.; Catoire, L. J.; Popot, J.-L. Sulfonated Amphipols: Synthesis, Properties, and Applications. *Biopolymers* **2011**, *95* (12), 811–823. <https://doi.org/10.1002/bip.21683>.
- (76) Bazzacco, P.; Billon-Denis, E.; Sharma, K. S.; Catoire, L. J.; Mary, S.; Le Bon, C.; Point, E.; Banères, J.-L.; Durand, G.; Zito, F.; Pucci, B.; Popot, J.-L. Nonionic Homopolymeric Amphipols: Application to Membrane Protein Folding, Cell-Free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* **2012**, *51* (7), 1416–1430. <https://doi.org/10.1021/bi201862v>.
- (77) Sharma, K. S.; Durand, G.; Gabel, F.; Bazzacco, P.; Le Bon, C.; Billon-Denis, E.; Catoire, L. J.; Popot, J.-L.; Ebel, C.; Pucci, B. Non-Ionic Amphiphilic Homopolymers: Synthesis, Solution Properties, and Biochemical Validation. *Langmuir* **2012**, *28* (10), 4625–4639. <https://doi.org/10.1021/la205026r>.
- (78) Popot, J.-L. Membrane Proteins in Aqueous Solutions: From Detergents to Amphipols; Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering; Springer International Publishing, 2018.
- (79) Rice, W. J.; Cheng, A.; Noble, A. J.; Eng, E. T.; Kim, L. Y.; Carragher, B.; Potter, C. S. Routine Determination of Ice Thickness for Cryo-EM Grids. *Journal of Structural Biology* **2018**, *204* (1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.06.007>.
- (80) Brown, H.; Hanssen, E. MeasureIce: Accessible Ice Thickness Measurement for Single Particle Cryogenic Transmission Electron Microscopy. *Microsc Microanal* **2022**, *28* (S1), 1232–1234. <https://doi.org/10.1017/S1431927622005128>.
- (81) Drulyte, I.; Johnson, R. M.; Hesketh, E. L.; Hurdiss, D. L.; Scarff, C. A.; Porav, S. A.; Ranson, N. A.; Muench, S. P.; Thompson, R. F. Approaches to Altering Particle Distributions in Cryo-Electron Microscopy Sample Preparation. *Acta Cryst.* **2018**, *12*.
- (82) Saulnier, L. Étude de la coalescence et du mûrissement dans les mousses liquides: des expériences modèles à différentes échelles. *Thèse@Université de Paris-Sud 11* **2012**, 213.
- (83) Boulogne, F. Cheap and Versatile Humidity Regulator for Environmentally Controlled Experiments. *The European Physical Journal E* **2019**, *42* (51).
- (84) Sheludko, A. Thin Liquid Films. *Advances in Colloid and Interface Science* **1967**, *1* (4), 391–464. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(67\)85001-2](https://doi.org/10.1016/0001-8686(67)85001-2).
- (85) Poulain, S.; Bourouiba, L. Biosurfactants Change the Thinning of Contaminated Bubbles at Bacteria-Laden Water Interfaces. *Phys. Rev. Lett.* **2018**, *121* (20), 204502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.121.204502>.
- (86) Miguet, J. Amincissement et stabilité de bulles de surface. *Thèse@Université Paris Saclay* **2019**, 164.

- (87) Freed, K. F.; Edwards, S. F. Polymer Viscosity in Concentrated Solutions. *J. Chem. Phys.* **1974**, *61* (9), 3626–3633. <https://doi.org/10.1063/1.1682545>.
- (88) Teclis Scientific Webpage. *TRACKER Automatic drop tensiometers*. teclis-scientific. <https://www.teclis-scientific.com/fr/products-tensiometers> (accessed 2022-07-21).
- (89) Fainerman, V. B.; Makievski, A. V.; Miller, R. The Analysis of Dynamic Surface Tension of Sodium Alkyl Sulphate Solutions, Based on Asymptotic Equations of Adsorption Kinetic Theory. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1994**, *87* (1), 61–75. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02747-1](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02747-1).
- (90) Leica Microsystems Webpage. *Leica EM ACE600 Pulvérisateur cathodique sous vide poussé*. <https://www.leica-microsystems.com/fr/produits/preparation-dechantillons-pour-metmeb/informations-detaillees/leica-em-ace600/> (accessed 2022-07-21).
- (91) Vanaken, T.; Foxall-Vanaken, S.; Castleman, S.; Ferguson-Miller, S. [3] Alkyl Glycoside Detergents: Synthesis and Applications to the Study of Membrane Proteins. In *Biomembranes Part M; Methods in Enzymology*; Elsevier, 1986; Vol. 125, pp 27–35.
- (92) Perlmutter, J. D.; Drasler, W. J.; Xie, W.; Gao, J.; Popot, J.-L.; Sachs, J. N. All-Atom and Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations of a Membrane Protein Stabilizing Polymer. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 10523–10537. <https://doi.org/10.1021/la202103v>.
- (93) Zoonens, M.; Giusti, F.; Zito, F.; Popot, J.-L. Dynamics of Membrane Protein/Amphipol Association Studied by Förster Resonance Energy Transfer: Implications for in Vitro Studies of Amphipol-Stabilized Membrane Proteins †. *Biochemistry* **2007**, *46* (36), 10392–10404. <https://doi.org/10.1021/bi7007596>.
- (94) Polovinkin, L.; Hassaine, G.; Perot, J.; Neumann, E.; Jensen, A. A.; Lefebvre, S. N.; Corringer, P.-J.; Neyton, J.; Chipot, C.; Dehez, F.; Schoehn, G.; Nury, H. Conformational Transitions of the Serotonin 5-HT₃ Receptor. *Nature* **2018**, *563* (7730), 275–279. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0672-3>.
- (95) Polovinkin, L. Structural Studies of the 5-HT₃ Receptor. *Thèse @Université Grenoble Alpes* **2019**, 134.
- (96) Le Bon, C.; Marconnet, A.; Masscheleyn, S.; Popot, J.-L.; Zoonens, M. Folding and Stabilizing Membrane Proteins in Amphipol A8-35. *Methods* **2018**, *147*, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.012>.
- (97) Chen, X.; Farber, M.; Gao, Y.; Kulaots, I.; Suuberg, E. M.; Hurt, R. H. Mechanisms of Surfactant Adsorption on Non-Polar, Air-Oxidized and Ozone-Treated Carbon Surfaces. *Carbon* **2003**, *41*, 1489–1500.
- (98) Sanders, C. R.; Nagy, J. K. Misfolding of Membrane Proteins in Health and Disease: The Lady or the Tiger? *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, *10* (4), 438–442. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00112-3).
- (99) Cross, T. A.; Sharma, M.; Yi, M.; Zhou, H.-X. Influence of Solubilizing Environments on Membrane Protein Structures. *Trends in Biochemical Sciences* **2011**, *36* (2), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.005>.
- (100) Chipot, C.; Dehez, F.; Schnell, J. R.; Zitzmann, N.; Pebay-Peyroula, E.; Catoire, L. J.; Miroux, B.; Kunji, E. R. S.; Veglia, G.; Cross, T. A.; Schanda, P. Perturbations of Native Membrane Protein Structure in Alkyl Phosphocholine Detergents: A Critical Assessment of NMR and Biophysical Studies. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (7), 3559–3607. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00570>.
- (101) Bayburt, T. H.; Carlson, J. W.; Sligar, S. G. Reconstitution and Imaging of a Membrane Protein in a Nanometer-Size Phospholipid Bilayer. *Journal of Structural Biology* **1998**, *123* (1), 37–44. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4007>.
- (102) Bayburt, T. H.; Grinkova, Y. V.; Sligar, S. G. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Letters* **2002**, *2* (8), 853–856. <https://doi.org/10.1021/nl025623k>.
- (103) Denisov, I. G.; Sligar, S. G. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (6), 4669–4713. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00690>.
- (104) Sligar, S. G.; Denisov, I. G. Nanodiscs: A Toolkit for Membrane Protein Science. *Protein Science* **2021**, *30* (2), 297–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3994>.

- (105) Borch, J.; Hamann, T. The Nanodisc: A Novel Tool for Membrane Protein Studies. *Biological Chemistry* **2009**, *390* (8), 805–814. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.091>.
- (106) Malhotra, K.; Alder, N. N. Advances in the Use of Nanoscale Bilayers to Study Membrane Protein Structure and Function. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **2014**, *30* (1), 79–93. <https://doi.org/10.1080/02648725.2014.921502>.
- (107) Nath, A.; Atkins, W. M.; Sligar, S. G. Applications of Phospholipid Bilayer Nanodiscs in the Study of Membranes and Membrane Proteins†. *Biochemistry* **2007**, *46* (8), 2059–2069. <https://doi.org/10.1021/bi602371n>.
- (108) Sanders, C. R.; Landis, G. C. Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid-Rich Bilayered Mixed Micelles for NMR Studies. *Biochemistry* **1995**, *34* (12), 4030–4040. <https://doi.org/10.1021/bi00012a022>.
- (109) Faham, S.; Bowie, J. U. Bicelle Crystallization: A New Method for Crystallizing Membrane Proteins Yields a Monomeric Bacteriorhodopsin Structure¹¹ Edited by D. Rees. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *316* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5295>.
- (110) Loudet, C.; Khemtémourian, L.; Aussenac, F.; Gineste, S.; Achard, M.-F.; Dufourc, E. J. Bicelle Membranes and Their Use for Hydrophobic Peptide Studies by Circular Dichroism and Solid State NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2005**, *1724* (3), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.04.026>.
- (111) De Angelis, A. A.; Opella, S. J. Bicelle Samples for Solid-State NMR of Membrane Proteins. *Nat Protoc* **2007**, *2* (10), 2332–2338. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.329>.
- (112) McGregor, C.-L.; Chen, L.; Pomroy, N. C.; Hwang, P.; Go, S.; Chakrabarty, A.; Privé, G. G. Lipopeptide Detergents Designed for the Structural Study of Membrane Proteins. *Nat Biotechnol* **2003**, *21* (2), 171–176. <https://doi.org/10.1038/nbt776>.
- (113) Schafmeister, C. E.; Miercke, L. J. W.; Stroud, R. M. Structure at 2.5 Å of a Designed Peptide That Maintains Solubility of Membrane Proteins. *Science* **1993**, *262* (5134), 734–738. <https://doi.org/10.1126/science.8235592>.
- (114) Dempsey, C. E.; Sternberg, B. Reversible Disc-Micellization of Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers Induced by Melittin and [Ala-14]Melittin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**, *1061* (2), 175–184. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90283-E](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90283-E).
- (115) Koutsopoulos, S.; Kaiser, L.; Eriksson, H. M.; Zhang, S. Designer Peptide Surfactants Stabilize Diverse Functional Membrane Proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1721–1728. <https://doi.org/10.1039/C1CS15180K>.
- (116) Breyton, C.; Chabaud, E.; Chaudier, Y.; Pucci, B.; Popot, J.-L. Hemifluorinated Surfactants: A Non-Dissociating Environment for Handling Membrane Proteins in Aqueous Solutions? *FEBS Letters* **2004**, *564* (3), 312–318. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00227-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00227-3).
- (117) Chabaud, E.; Barthélémy, P.; Mora, N.; Popot, J. L.; Pucci, B. Stabilization of Integral Membrane Proteins in Aqueous Solution Using Fluorinated Surfactants. *Biochimie* **1998**, *80* (5), 515–530. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)80017-6](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)80017-6).
- (118) Lebaupain, F.; Salvay, A. G.; Olivier, B.; Durand, G.; Fabiano, A.-S.; Michel, N.; Popot, J.-L.; Ebel, C.; Breyton, C.; Pucci, B. Lactobionamide Surfactants with Hydrogenated, Perfluorinated or Hemifluorinated Tails: Physical-Chemical and Biochemical Characterization. *Langmuir* **2006**, *22* (21), 8881–8891. <https://doi.org/10.1021/la061083l>.
- (119) Polidori, A.; Passet, M.; Lebaupain, F.; Ameduri, B.; Popot, J.-L.; Breyton, C.; Pucci, B. Fluorinated and Hemifluorinated Surfactants Derived from Maltose: Synthesis and Application to Handling Membrane Proteins in Aqueous Solution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (22), 5827–5831. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.070>.
- (120) Polidori, A.; Raynal, S.; Barret, L.-A.; Dahani, M.; Barrot-Ivolot, C.; Jungas, C.; Frotscher, E.; Keller, S.; Ebel, C.; Breyton, C.; Bonneté, F. Sparingly Fluorinated Maltoside-Based Surfactants for Membrane-Protein Stabilization. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40* (6), 5364–5378. <https://doi.org/10.1039/C5NJ03502C>.

- (121) Breyton, C.; Gabel, F.; Abla, M.; Pierre, Y.; Lebaupain, F.; Durand, G.; Popot, J.-L.; Ebel, C.; Pucci, B. Micellar and Biochemical Properties of (Hemi)Fluorinated Surfactants Are Controlled by the Size of the Polar Head. *Biophysical Journal* **2009**, *97* (4), 1077–1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.053>.
- (122) Chaudier, Y.; Zito, F.; Barthélémy, P.; Stroebel, D.; Améduri, B.; Popot, J.-L.; Pucci, B. Synthesis and Preliminary Biochemical Assessment of Ethyl-Terminated Perfluoroalkylamine Oxide Surfactants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12* (12), 1587–1590. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00242-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00242-1).
- (123) Frotscher, E.; Danielczak, B.; Vargas, C.; Meister, A.; Durand, G.; Keller, S. A Fluorinated Detergent for Membrane-Protein Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (17), 5069–5073. <https://doi.org/10.1002/anie.201412359>.
- (124) Wehbie, M.; Onyia, K. K.; Mahler, F.; Roy, A. L.; Deletraz, A.; Bouchemal, I.; Vargas, C.; Babalola, J. O.; Breyton, C.; Ebel, C.; Keller, S.; Durand, G. Maltose-Based Fluorinated Surfactants for Membrane-Protein Extraction and Stabilization. *Langmuir* **2021**, *37* (6), 2111–2122. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03214>.
- (125) Helenius, A.; Simons, K. Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1975**, *415* (1), 29–79. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(75\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(75)90016-7).
- (126) Tanford, C.; Reynolds, J. A. Characterization of Membrane Proteins in Detergent Solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1976**, *457* (2), 133–170. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(76\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(76)90009-5).
- (127) Hjelmeland, L. M. A Nondenaturing Zwitterionic Detergent for Membrane Biochemistry: Design and Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77* (11), 6368–6370. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6368>.
- (128) Chevallet, M.; Santoni, V.; Poinas, A.; Rouquié, D.; Fuchs, A.; Kieffer, S.; Kieffer, S.; Lunardi, J.; Garin, J.; Rabilloud, T. New Zwitterionic Detergents Improve the Analysis of Membrane Proteins by Two-Dimensional Electrophoresis. *Electrophoresis* **1998**, *19* (11), 1901–1909. <https://doi.org/10.1002/elps.1150191108>.
- (129) Breyton, C.; Javed, W.; Vermot, A.; Arnaud, C.-A.; Hajjar, C.; Dupuy, J.; Petit-Hartlein, I.; Le Roy, A.; Martel, A.; Thépaut, M.; Orelle, C.; Jault, J.-M.; Fieschi, F.; Porcar, L.; Ebel, C. Assemblies of Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG) and LMNG-Solubilized Membrane Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861* (5), 939–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.02.003>.
- (130) Knowles, T. J.; Finka, R.; Smith, C.; Lin, Y.-P.; Dafforn, T.; Overduin, M. Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer. *J. AM. CHEM. SOC.* **2009**, *131*, 7484–7485.
- (131) Sauvage, E.; Amos, D. A.; Antalek, B.; Schroeder, K. M.; Tan, J. S.; Plucktaveesak, N.; Colby, R. H. Amphiphilic Maleic Acid-Containing Alternating Copolymers—1. Dissociation Behavior and Compositions. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2004**, *42* (19), 3571–3583. <https://doi.org/10.1002/polb.20202>.
- (132) Di Cola, E.; Plucktaveesak, N.; Waigh, T. A.; Colby, R. H.; Tan, J. S.; Pyckhout-Hintzen, W.; Heenan, R. K. Structure and Dynamics in Aqueous Solutions of Amphiphilic Sodium Maleate-Containing Alternating Copolymers. *Macromolecules* **2004**, *37* (22), 8457–8465. <https://doi.org/10.1021/ma049260h>.
- (133) Dominguez Pardo, J. J.; Dörr, J. M.; Iyer, A.; Cox, R. C.; Scheidelaar, S.; Koorengevel, M. C.; Subramaniam, V.; Killian, J. A. Solubilization of Lipids and Lipid Phases by the Styrene–Maleic Acid Copolymer. *Eur Biophys J* **2017**, *46* (1), 91–101. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1181-7>.
- (134) Dörr, J. M.; Scheidelaar, S.; Koorengevel, M. C.; Dominguez, J. J.; Schäfer, M.; van Walree, C. A.; Killian, J. A. The Styrene–Maleic Acid Copolymer: A Versatile Tool in Membrane Research. *Eur Biophys J* **2016**, *45* (1), 3–21. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1093-y>.
- (135) Scheidelaar, S.; Koorengevel, M. C.; Pardo, J. D.; Meeldijk, J. D.; Breukink, E.; Killian, J. A. Molecular Model for the Solubilization of Membranes into Nanodisks by Styrene

- Maleic Acid Copolymers. *Biophysical Journal* **2015**, *108* (2), 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.3464>.
- (136) Vargas, C.; Cuevas Arenas, R.; Frotscher, E.; Keller, S. Nanoparticle Self-Assembly in Mixtures of Phospholipids with Styrene/Maleic Acid Copolymers or Fluorinated Surfactants. *Nanoscale* **2015**, *7* (48), 20685–20696. <https://doi.org/10.1039/C5NR06353A>.
- (137) Zhang, R.; Sahu, I. D.; Liu, L.; Osatuke, A.; Comer, R. G.; Dabney-Smith, C.; Lorigan, G. A. Characterizing the Structure of Lipodisc Nanoparticles for Membrane Protein Spectroscopic Studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848* (1), 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.008>.
- (138) Hazell, G.; Arnold, T.; Barker, R. D.; Clifton, L. A.; Steinke, N.-J.; Tognoloni, C.; Edler, K. J. Evidence of Lipid Exchange in Styrene Maleic Acid Lipid Particle (SMALP) Nanodisc Systems. *Langmuir* **2016**, *32* (45), 11845–11853. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02927>.
- (139) Morrison, K. A.; Akram, A.; Mathews, A.; Khan, Z. A.; Patel, J. H.; Zhou, C.; Hardy, D. J.; Moore-Kelly, C.; Patel, R.; Odiba, V.; Knowles, T. J.; Javed, M.-H.; Chmel, N. P.; Dafforn, T. R.; Rothnie, A. J. Membrane Protein Extraction and Purification Using Styrene–Maleic Acid (SMA) Copolymer: Effect of Variations in Polymer Structure. *Biochemical Journal* **2016**, *473* (23), 4349–4360. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160723>.
- (140) Scheidelaar, S.; Koorengel, M. C.; van Walree, C. A.; Dominguez, J. J.; Dörr, J. M.; Killian, J. A. Effect of Polymer Composition and PH on Membrane Solubilization by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophysical Journal* **2016**, *111* (9), 1974–1986. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.025>.
- (141) Long, A. R.; O'Brien, C. C.; Malhotra, K.; Schwall, C. T.; Albert, A. D.; Watts, A.; Alder, N. N. A Detergent-Free Strategy for the Reconstitution of Active Enzyme Complexes from Native Biological Membranes into Nanoscale Discs. *BMC Biotechnology* **2013**, *13* (1), 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-41>.
- (142) Swainsbury, D. J. K.; Scheidelaar, S.; van Grondelle, R.; Killian, J. A.; Jones, M. R. Bacterial Reaction Centers Purified with Styrene Maleic Acid Copolymer Retain Native Membrane Functional Properties and Display Enhanced Stability. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (44), 11997–12001. <https://doi.org/10.1002/ange.201406412>.
- (143) Brown, L. S.; Ernst, O. P. Recent Advances in Biophysical Studies of Rhodopsins – Oligomerization, Folding, and Structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2017**, *1865* (11), 1512–1521. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.007>.
- (144) Gohon, Y.; Dahmane, T.; Ruigrok, R. W. H.; Schuck, P.; Charvolin, D.; Rappaport, F.; Timmins, P.; Engelman, D. M.; Tribet, C.; Popot, J.-L.; Ebel, C. Bacteriorhodopsin/Amphipol Complexes: Structural and Functional Properties. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (9), 3523–3537. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121848>.
- (145) Lanyi, J. K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol* **1999**, *187* (66), 665–688.
- (146) Lanyi, J. K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.* **2004**, *66* (1), 665–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150049>.
- (147) Subramaniam, S.; Henderson, R. Molecular Mechanism of Vectorial Proton Translocation by Bacteriorhodopsin. *Nature* **2000**, *406* (6796), 653–657. <https://doi.org/10.1038/35020614>.
- (148) Chaptal, V.; Zampieri, V.; Wiseman, B.; Orelle, C.; Martin, J.; Nguyen, K.-A.; Magnard, S.; Gobet, A.; Cesare, M. D.; Javed, W.; Kilburg, A.; Peuchmaur, M.; Marcoux, J.; Monticelli, L.; Högbom, M.; Jault, J.-M.; Boumendjel, A.; Falson, P. Drug-Bound and -Free Outward-Facing Structures of a Multidrug ABC Exporter Point to a Swing Mechanism. **2021**. <https://doi.org/10.1101/2021.03.12.435132>.
- (149) Dalmas, O.; Do Cao, M.-A.; Lugo, M. R.; Sharom, F. J.; Di Pietro, A.; Jault, J.-M. Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Shows That the Bacterial Multidrug ABC Half-Transporter BmrA Functions as a Homodimer. *Biochemistry* **2005**, *44* (11), 4312–4321. <https://doi.org/10.1021/bi0482809>.

- (150) Dalmas, O.; Orelle, C.; Foucher, A.-E.; Geourjon, C.; Crouzy, S.; Di Pietro, A.; Jault, J.-M. The Q-Loop Disengages from the First Intracellular Loop during the Catalytic Cycle of the Multidrug ABC Transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (44), 36857–36864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503266200>.
- (151) Fribourg, P. F.; Chami, M.; Sorzano, C. O. S.; Gubellini, F.; Marabini, R.; Marco, S.; Jault, J.-M.; Lévy, D. 3D Cryo-Electron Reconstruction of BmrA, a Bacterial Multidrug ABC Transporter in an Inward-Facing Conformation and in a Lipidic Environment. *Journal of Molecular Biology* **2014**, *426* (10), 2059–2069. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.002>.
- (152) Kunert, B.; Gardiennet, C.; Lacabanne, D.; Calles-Garcia, D.; Falson, P.; Jault, J.-M.; Meier, B. H.; Penin, F.; Bäckmann, A. Efficient and Stable Reconstitution of the ABC Transporter BmrA for Solid-State NMR Studies. *Front. Mol. Biosci.* **2014**, *1*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00005>.
- (153) Orelle, C.; Dalmas, O.; Gros, P.; Di Pietro, A.; Jault, J.-M. The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-Binding Cassette Transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (47), 47002–47008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308268200>.
- (154) Ravaud, S.; Do Cao, M.-A.; Jidenko, M.; Ebel, C.; Le Maire, M.; Jault, J.-M.; Di Pietro, A.; Haser, R.; Aghajari, N. The ABC Transporter BmrA from *Bacillus Subtilis* Is a Functional Dimer When in a Detergent-Solubilized State. *Biochemical Journal* **2006**, *395* (2), 345–353. <https://doi.org/10.1042/BJ20051719>.
- (155) Steinfels, E.; Orelle, C.; Fantino, J.-R.; Dalmas, O.; Rigaud, J.-L.; Denizot, F.; Di Pietro, A.; Jault, J.-M. Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus Subtilis*. *Biochemistry* **2004**, *43* (23), 7491–7502. <https://doi.org/10.1021/bi0362018>.
- (156) Wiseman, B.; Kilburg, A.; Chaptal, V.; Reyes-Mejia, G. C.; Sarwan, J.; Falson, P.; Jault, J.-M. Stubborn Contaminants: Influence of Detergents on the Purity of the Multidrug ABC Transporter BmrA. *PLoS ONE* **2014**, *9* (12), e114864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114864>.
- (157) Morrison, K. A.; Akram, A.; Mathews, A.; Khan, Z. A.; Patel, J. H.; Zhou, C.; Hardy, D. J.; Moore-Kelly, C.; Patel, R.; Odiba, V.; Knowles, T. J.; Javed, M.-H.; Chmel, N. P.; Dafforn, T. R.; Rothnie, A. J. Membrane Protein Extraction and Purification Using Styrene–Maleic Acid (SMA) Copolymer: Effect of Variations in Polymer Structure. *Biochemical Journal* **2016**, *473* (23), 4349–4360. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160723>.
- (158) Chaptal, V.; Zampieri, V.; Wiseman, B.; Orelle, C.; Martin, J.; Nguyen, K.-A.; Gobet, A.; Di Cesare, M.; Magnard, S.; Javed, W.; Eid, J.; Kilburg, A.; Peuchmaur, M.; Marcoux, J.; Monticelli, L.; Høgbom, M.; Schoehn, G.; Jault, J.-M.; Boumendjel, A.; Falson, P. Substrate-Bound and Substrate-Free Outward-Facing Structures of a Multidrug ABC Exporter. *Science Advances* **2022**, *8* (4), eabg9215. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg9215>.
- (159) Marconnet, A.; Michon, B.; Prost, B.; Solgadi, A.; Le Bon, C.; Giusti, F.; Tribet, C.; Zoonens, M. Influence of Hydrophobic Groups Attached to Amphipathic Polymers on the Solubilization of Membrane Proteins along with Their Lipids. *Anal. Chem.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01746>.
- (160) Devaraj, N. K.; Finn, M. G. Introduction: Click Chemistry. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 6697–6698. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00469>.
- (161) Lahann, J. *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*; John Wiley & Sons, 2009.
- (162) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The Growing Applications of Click Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249–1262. <https://doi.org/10.1039/B613014N>.
- (163) Popot, J.-L. *Membrane Proteins in Aqueous Solutions*; Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering; Springer International Publishing, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73148-3>.
- (164) Williams, A.; Ibrahim, I. T. Carbodiimide Chemistry: Recent Advances. *Chem. Rev.* **1981**, *81* (6), 589–636. <https://doi.org/10.1021/cr00046a004>.

- (165) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519. <https://doi.org/10.1021/ja8053805>.
- (166) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299. <https://doi.org/10.1021/bc8004446>.
- (167) Selinger, Z.; Lapidot, Y. Synthesis of Fatty Acid Anhydrides by Reaction with Dicyclohexylcarbodiimide. *J. Lipid Res.* **1966**, *7*, 174–175.
- (168) Lange, C.; H.Nett, J.; L.Trumpower, B.; Hunte, C. Specific Roles of Protein-Phospholipid Interactions in the Yeast Cytochrome Bc1 Complex Structure. *The EMBO Journal* **2001**, *20* (23), 6591–6600. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6591>.
- (169) Gohon, Y.; Dahmane, T.; Ruigrok, R. W. H.; Schuck, P.; Charvolin, D.; Rappaport, F.; Timmins, P.; Engelman, D. M.; Tribet, C.; Popot, J.-L.; Ebel, C. Bacteriorhodopsin/Amphipol Complexes: Structural and Functional Properties. *Biophys. J.* **2008**, *94* (9), 3523–3537. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121848>.
- (170) Belrhali, H.; Nollert, P.; Royant, A.; Menzel, C.; Rosenbusch, J. P.; Landau, E. M.; Pebay-Peyroula, E. Protein, Lipid and Water Organization in Bacteriorhodopsin Crystals: A Molecular View of the Purple Membrane at 1.9 Å Resolution. *Structure* **1999**, *7* (8), 909–917. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80118-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80118-X).
- (171) Orwick, M. C.; Judge, P. J.; Procek, J.; Lindholm, L.; Graziadei, A.; Engel, A.; Gröbner, G.; Watts, A. Detergent-Free Formation and Physicochemical Characterization of Nanosized Lipid–Polymer Complexes: Lipodisq. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (19), 4653–4657. <https://doi.org/10.1002/anie.201201355>.
- (172) Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium Halobium. *Nature New Biolo.* **1971**, *233*, 149–152.
- (173) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (7), 2039–2044. <https://doi.org/10.1021/ja00449a004>.
- (174) Dong, D. C.; Winnik, M. A. The Py Scale of Solvent Polarities. *Can. J. Chem.* **1984**, *62* (11), 2560–2565. <https://doi.org/10.1139/v84-437>.
- (175) Wilhelm, M.; Zhao, C. L.; Wang, Y.; Xu, R.; Winnik, M. A.; Mura, J. L.; Riess, G.; Croucher, M. D. Poly(Styrene-Ethylene Oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water: A Fluorescence Probe Study. *Macromolecules* **1991**, *24* (5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1021/ma00005a010>.
- (176) Petit-Agnely, F.; Iliopoulos, I.; Zana, R. Hydrophobically Modified Sodium Polyacrylates in Aqueous Solutions: Association Mechanism and Characterization of the Aggregates by Fluorescence Probing. *Langmuir* **2000**, *16* (25), 9921–9927. <https://doi.org/10.1021/la000709j>.
- (177) Broecker, J.; Eger, B. T.; Ernst, O. P. Crystallogenes of Membrane Proteins Mediated by Polymer-Bounded Lipid Nanodiscs. *Structure* **2017**, *25* (2), 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.004>.
- (178) Lacabanne, D.; Wiegand, T.; Di Cesare, M.; Orelle, C.; Ernst, M.; Jault, J.-M.; Meier, B. H.; Böckmann, A. Solid-State NMR Reveals Asymmetric ATP Hydrolysis in the Multidrug ABC Transporter BmrA. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (27), 12431–12442. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c04287>.
- (179) Ravaud, S.; Do Cao, M.-A.; Jidenko, M.; Ebel, C.; Le Maire, M.; Jault, J.-M.; Di Pietro, A.; Haser, R.; Aghajari, N. The ABC Transporter BmrA from Bacillus Subtilis Is a Functional Dimer When in a Detergent-Solubilized State. *Biochemical Journal* **2006**, *395* (2), 345–353. <https://doi.org/10.1042/BJ20051719>.
- (180) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37* (8), 911–917.
- (181) Schmidt, V.; Sidore, M.; Bechara, C.; Duneau, J.-P.; Sturgis, J. N. The Lipid Environment of Escherichia Coli Aquaporin Z. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861* (2), 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.017>.

- (182) Dörr, J. M.; Koorengel, M. C.; Schäfer, M.; Prokofyev, A. V.; Scheidelaar, S.; van der Crujisen, E. A. W.; Dafforn, T. R.; Baldus, M.; Killian, J. A. Detergent-Free Isolation, Characterization, and Functional Reconstitution of a Tetrameric K⁺ Channel: The Power of Native Nanodiscs. *Proc Natl Acad Sci USA* **2014**, *111* (52), 18607–18612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416205112>.
- (183) Raetz, C. R. Enzymology, Genetics, and Regulation of Membrane Phospholipid Synthesis in Escherichia Coli. *MICROBIOL. REV.* **1978**, *42*, 46.
- (184) Rouser, G.; Fleischer, S.; Yamamoto, A. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids* **1970**, *5* (5), 494–496. <https://doi.org/10.1007/BF02531316>.
- (185) Grime, R. L.; Goulding, J.; Uddin, R.; Stoddart, L. A.; Hill, S. J.; Poyner, D. R.; Briddon, S. J.; Wheatley, M. Single Molecule Binding of a Ligand to a G-Protein-Coupled Receptor in Real Time Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, Rendered Possible by Nano-Encapsulation in Styrene Maleic Acid Lipid Particles. *Nanoscale* **2020**, *12* (21), 11518–11525. <https://doi.org/10.1039/D0NR01060J>.
- (186) Hall, S. C. L.; Tognoloni, C.; Price, G. J.; Klumperman, B.; Edler, K. J.; Dafforn, T. R.; Arnold, T. Influence of Poly(Styrene- Co -Maleic Acid) Copolymer Structure on the Properties and Self-Assembly of SMALP Nanodiscs. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (3), 761–772. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01539>.
- (187) Jamshad, M.; Charlton, J.; Lin, Y.-P.; Routledge, S. J.; Bawa, Z.; Knowles, T. J.; Overduin, M.; Dekker, N.; Dafforn, T. R.; Bill, R. M.; Poyner, D. R.; Wheatley, M. G-Protein Coupled Receptor Solubilization and Purification for Biophysical Analysis and Functional Studies, in the Total Absence of Detergent. *Bioscience Reports* **2015**, *35* (2), e00188. <https://doi.org/10.1042/BSR20140171>.
- (188) Postis, V.; Rawson, S.; Mitchell, J. K.; Lee, S. C.; Parslow, R. A.; Dafforn, T. R.; Baldwin, S. A.; Muench, S. P. The Use of SMALPs as a Novel Membrane Protein Scaffold for Structure Study by Negative Stain Electron Microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848* (2), 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.018>.
- (189) Chaptal, V.; Zampieri, V.; Wiseman, B.; Orelle, C.; Martin, J.; Nguyen, K.-A.; Gobet, A.; Di Cesare, M.; Magnard, S.; Javed, W.; Eid, J.; Kilburg, A.; Peuchmaur, M.; Marcoux, J.; Monticelli, L.; Høgbom, M.; Schoehn, G.; Jault, J.-M.; Boumendjel, A.; Falson, P. Substrate-Bound and Substrate-Free Outward-Facing Structures of a Multidrug ABC Exporter. *Sci. Adv.* **2022**, *8* (4), eabg9215. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg9215>.
- (190) Swainsbury, D. J. K.; Scheidelaar, S.; van Grondelle, R.; Killian, J. A.; Jones, M. R. Bacterial Reaction Centers Purified with Styrene Maleic Acid Copolymer Retain Native Membrane Functional Properties and Display Enhanced Stability. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (44), 11997–12001. <https://doi.org/10.1002/ange.201406412>.
- (191) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3e ed.; Springer, 2006.
- (192) Orelle, C.; Gubellini, F.; Durand, A.; Marco, S.; Lévy, D.; Gros, P.; Di Pietro, A.; Jault, J.-M. Conformational Change Induced by ATP Binding in the Multidrug ATP-Binding Cassette Transporter BmrA. *Biochemistry* **2008**, *47* (8), 2404–2412. <https://doi.org/10.1021/bi702303s>.
- (193) Pullman, M. E.; Penefsky, H. S.; Datta, A.; Racker, E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **1960**, *235* (11), 3322–3329.
- (194) Orelle, C. Mécanisme d'hydrolyse de l'ATP et de transport de drogues par BmrA, homologue bactérien de la glycoprotéine-P. *Thèse@Université Lyon 1* **2004**.
- (195) Breyton, C.; Javed, W.; Vermot, A.; Arnaud, C.-A.; Hajjar, C.; Dupuy, J.; Petit-Hartlein, I.; Le Roy, A.; Martel, A.; Thépaut, M.; Orelle, C.; Jault, J.-M.; Fieschi, F.; Porcar, L.; Ebel, C. Assemblies of Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG) and LMNG-Solubilized Membrane Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861* (5), 939–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.02.003>.

- (196) Patel, J. H.; Pollock, N. L.; Maher, J.; Rothnie, A. J.; Allen, M. C. The Function of BK Channels Extracted and Purified within SMALPs. *Biochemical Journal* **2022**, *479* (15), 1609–1619. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210628>.
- (197) Picard, M.; Dahmane, T.; Garrigos, M.; Gauron, C.; Giusti, F.; le Maire, M.; Popot, J.-L.; Champeil, P. Protective and Inhibitory Effects of Various Types of Amphipols on the Ca²⁺-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: A Comparative Study. *Biochemistry* **2006**, *45* (6), 1861–1869. <https://doi.org/10.1021/bi051954a>.
- (198) Logez, C.; Damian, M.; Legros, C.; Dupré, C.; Guéry, M.; Mary, S.; Wagner, R.; M'Kadmi, C.; Nosjean, O.; Fould, B.; Marie, J.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Ferry, G.; Boutin, J. A.; Banères, J.-L. Detergent-Free Isolation of Functional G Protein-Coupled Receptors into Nanometric Lipid Particles. *Biochemistry* **2016**, *55* (1), 38–48. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01040>.
- (199) Hoenger, A.; Aebi, U. 3-D Reconstructions from Ice-Embedded and Negatively Stained Biomacromolecular Assemblies: A Critical Comparison. *Journal of Structural Biology* **1996**, *117* (2), 99–116. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0075>.
- (200) Lyumkis, D. Challenges and Opportunities in Cryo-EM Single-Particle Analysis. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294* (13), 5181–5197. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.005602>.
- (201) Renaud, J.-P.; Chari, A.; Ciferri, C.; Liu, W.; Rémigy, H.-W.; Stark, H.; Wiesmann, C. Cryo-EM in Drug Discovery: Achievements, Limitations and Prospects. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17* (7), 471–492. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.77>.
- (202) Wang, F.; Gnewou, O.; Solemanifar, A.; Conticello, V. P.; Egelman, E. H. Cryo-EM of Helical Polymers. *Chemical Reviews* **2022**, *122* (17), 14055–14065. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00753>.
- (203) Higgins, A. J.; Flynn, A. J.; Marconnet, A.; Musgrove, L. J.; Postis, V. L. G.; Lippiat, J. D.; Chung, C.; Ceska, T.; Zoonens, M.; Sobott, F.; Muench, S. P. Cycloalkane-Modified Amphiphilic Polymers Provide Direct Extraction of Membrane Proteins for CryoEM Analysis. *Commun Biol* **2021**, *4* (1), 1337. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02834-3>.