



# Transporteur mitochondrial d'ADP/ATP : étude par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse et caractérisation de mutations pathogènes

Martial Jean-Pierre Rey

## ► To cite this version:

Martial Jean-Pierre Rey. Transporteur mitochondrial d'ADP/ATP : étude par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse et caractérisation de mutations pathogènes. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2009. Français. NNT : . tel-00586115

**HAL Id: tel-00586115**

<https://theses.hal.science/tel-00586115>

Submitted on 15 Apr 2011

**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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1  
SCIENCES ET GEOGRAPHIE

## THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Structurale - Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Martial REY

le 10 décembre 2009

# **Transporteur mitochondrial d'ADP/ATP : étude par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse et caractérisation de mutations pathogènes**

Composition du jury :

Mme Christelle BRETON, *Professeur*

Mme Sandrine SAGAN, *Directeur de Recherche* ..... Rapporteur

M. Guy LAUQUIN, *Professeur* ..... Rapporteur

M. Eric FOREST, *Directeur de Recherche*

M. Gérard BRANDOLIN, *Directeur de Recherche* ..... Directeur

M. Ludovic PELOSI, *Maître de Conférence* ..... Co-Directeur

Thèse préparée au Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés  
Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-GRENOBLE

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie tout d'abord Michel Satre et François Boulay, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, de l'Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, dont ils avaient tour à tour la direction.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Sandrine Sagan et Monsieur Guy Lauquin pour avoir examiné avec soins ce manuscrit. Je remercie aussi Madame Christelle Breton d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie Gérard Brandolin et Ludovic Pelosi pour m'avoir formé à la recherche avec rigueur et compétences. Je tiens aussi à leur adresser mes remerciements pour toutes les connaissances qu'ils m'ont apportées tant au niveau technique que fondamental.

Je tiens à remercier tout particulièrement Eric Forest, directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'Institut de Biologie Structurale, pour m'avoir permis d'effectuer une large partie de mes travaux au sein de son laboratoire et pour les nombreux conseils qu'il m'a apportés.

Je voudrais aussi remercier grandement Petr Man pour m'avoir formé avec patience à la spectrométrie de masse, à la technique d'échange hydrogène/deutérium, et pour le rôle important qu'il a joué dans la réalisation de ces travaux.

J'adresse mes remerciements à Jean-Pierre Andrieu pour les expériences de séquençage et à Bernard Dublet pour les analyses en MALDI-ToF (IBS, Grenoble) ainsi qu'à Véronique Trézéguet pour les discussions très enrichissantes que nous avons eues lors de plusieurs congrès.

Je remercie également les membres du laboratoire BBSI et particulièrement Benjamin Clémenton, Claire Lesieur-Chungkham et Denis Rousseau pour avoir apporté leur bonne humeur quotidiennement.

Je voudrais aussi remercier tous ceux qui m'ont soutenu de quelque façon que soit, en particulier ma grand-mère, mes parents, Gaëtan, Laurent, Cédric sans oublier Elise dont la présence au quotidien m'est essentielle.

## RESUME

Le transporteur d'ADP/ATP est une protéine de la membrane interne mitochondriale qui joue un rôle physiologique majeur en catalysant l'échange d'un ADP cytoplasmique contre un ATP néo-synthétisé dans la matrice mitochondriale. Cette protéine peut être inhibée de manière très spécifique par deux poisons naturels, le carboxyatractyloside (CATR) et l'acide bongrekique (BA) qui stabilisent la protéine dans deux états conformationnels distincts adoptés au cours du mécanisme de transport. Afin de mieux appréhender cette dynamique fonctionnelle, une étude du transporteur d'ADP/ATP bovin en complexe avec le CATR ou le BA dans le détergent Triton X-100 a été réalisée par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse.

Ces travaux se sont déroulés en 4 parties. La première a consisté à adapter cette technique à l'étude des protéines membranaires intégrales. En effet, la présence de détergents, nécessaires au maintien en solution de l'état natif de ces protéines, n'a pas permis jusqu'ici de les étudier par cette approche. Pour pallier cette difficulté, un protocole automatisé de chromatographie liquide permettant l'élimination du Triton X-100 a été mis au point. Les cinétiques de deutération des différents complexes ont alors pu être analysées dans le deuxième volet de cette étude. Les données obtenues ont permis de proposer des modèles conformationnels du transport de nucléotides à travers la membrane interne mitochondriale, dans lesquels le transporteur présenterait une cavité ouverte tour à tour vers l'espace intermembranaire et vers la matrice. Afin d'apporter d'autres éléments de réponse sur ce mécanisme de transport et de s'affranchir de différents problèmes liés à l'utilisation des détergents, des essais de deutération du transporteur d'ADP/ATP bovin dans les mitochondries ont été entrepris et représentent le troisième volet de ces travaux. Cette approche, qui nécessite encore plusieurs améliorations, a permis d'obtenir les premières données de deutération d'une protéine membranaire dans son environnement natif.

Le transporteur d'ADP/ATP est aussi impliqué dans des pathologies humaines plus ou moins graves. Dans une dernière partie, l'étude de ces mutations a été abordée en réalisant chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* une étude phénotypique et biochimique de plusieurs mutants du transporteur de l'amibe *Dictyostelium discoideum* correspondant aux mutations humaines. Cette étude a mis en évidence un problème dans le mécanisme intrinsèque de transport, induit par la mutation V291M, qui pourrait être à l'origine de la pathologie associée.

# SOMMAIRE

Abréviations ..... 1

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.	La mitochondrie .....	3
1.1	Rôle et organisation .....	3
1.2	Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP .....	5
1.3	Les transporteurs mitochondriaux .....	7
2.	Le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial.....	10
2.1	Généralités .....	10
2.2	Les caractéristiques biochimiques du transport d'ADP/ATP .....	12
2.2.1	Le transport de nucléotides .....	12
2.2.2	Les inhibiteurs du transport d'ADP/ATP .....	12
2.2.2.1	Les atractylosides .....	12
2.2.2.2	Les acides bongkréiques .....	13
2.2.2.3	Les autres inhibiteurs du transport d'ADP/ATP .....	13
2.2.3	Aspects conformationnels du transporteur d'ADP/ATP.....	14
3.	Le transporteur d'ADP/ATP bovin.....	14
3.1	Etudes biochimiques des différentes conformations du transporteur.....	14
3.1.1	Protéolyse ménagée du transporteur bAnc1p .....	16
3.1.2	Immunomarquage du transporteur bAnc1p .....	16
3.1.3	Marquage chimique du transporteur bAnc1p .....	16
3.1.4	Marquage des résidus cystéines du transporteur bAnc1p .....	18
3.1.5	Etat oligomérique du transporteur .....	19
3.2	Structure du complexe CATR-bAnc1p .....	19
3.3	Conclusion .....	23
4.	Le transporteur d'ADP/ATP de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
4.1	Etude des extrémités N- et C- terminales du transporteur d'ADP/ATP de levure ....	25
4.2	Etude topographique des régions transmembranaires de ScAnc2p .....	27
4.3	Exploration des boucles cytosoliques de ScAnc2p.....	27
4.4	Etude topographique des boucles matricielles m1, m2, m3 de ScAnc2p.....	29
4.5	Les différences conformationnelles des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p .....	30
4.6	Résumé des variations d'accessibilité des régions de ScAnc2p en fonction des inhibiteurs .....	30
4.7	Etudes des mutations pathogènes de <i>hANC1</i> chez <i>S. cerevisiae</i> .....	32
5.	L'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse pour l'analyse de la dynamique des protéines .....	33
5.1	L'échange hydrogène/deutérium .....	34
5.2	Marquage des protéines au deutérium .....	36
5.3	Le problème du ré-échange des atomes de deutérium .....	36
5.4	Analyse par spectrométrie de masse de la protéine marquée.....	39
5.5	Les protéines membranaires en spectrométrie de masse .....	40
6.	Objectifs et organisation du projet.....	43

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1.	Techniques de biochimie .....	47
1.1	Dosage des protéines.....	47
1.2	Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	47
1.2.1	Coloration au bleu de Coomassie des protéines séparées par SDS-PAGE ...	49
1.2.2	Immunorévélation des protéines séparées par SDS-PAGE .....	49
1.3	Préparation des mitochondries .....	51
1.3.1	Extraction des mitochondries de cœur de bœuf.....	51
1.3.2	Extraction des mitochondries de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
1.4	Titration des sites de fixation de l' <sup>3</sup> H]ATR dans une préparation de mitochondries	53
1.5	Mesure de l'activité de transport ADP/ATP des préparations de mitochondries .....	53
1.6	Purification des complexes bAnc1p-inhibiteurs .....	54
1.7	Purification du rhizopuspepsinogène .....	55
1.7.1	Expression de la protéine recombinante.....	55
1.7.2	Isolement des corps d'inclusion .....	55
1.7.3	Renaturation de la protéase .....	55
1.7.4	Activation de la protéase .....	56
1.8	Digestion en solution du transporteur d'ADP/ATP par des protéases acides .....	56
1.9	Deutération du transporteur.....	57
1.9.1	Deutération de la protéine en solution.....	57
1.9.2	Deutération de bAnc1p dans l'état membranaire .....	57
2.	Matériels biologiques .....	57
2.1	Souches de levures et de bactéries utilisées.....	57
2.2	Conditions de culture et milieux utilisés .....	58
2.3	Détermination des courbes de croissance des levures .....	58
3.	Techniques de biologie moléculaire .....	59
3.1	Plasmides utilisés .....	59
3.2	Amplification d'un fragment d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne .....	59
3.3	Digestion d'un brin d'ADN par des enzymes de restriction .....	60
3.4	Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose .....	60
3.5	Préparation du plasmide (« miniprep ») .....	60
3.6	Ligation.....	60
3.7	Transformation.....	61
3.7.1	Levures .....	61
3.7.2	Bactéries .....	61
3.8	Séquençage .....	63
4.	Techniques de spectrométrie de masse .....	63
4.1	Solvants et matériels utilisés lors des chromatographies liquides et des analyses en spectrométrie de masse .....	63
4.2	Préparation des échantillons pour le MALDI.....	64
4.3	Montage de la ligne de la chromatographie en phase liquide .....	64
4.4	Expérience de LC-MSMS .....	64
4.5	Analyse par LC-MS .....	65
4.5.1	Protéine entière .....	65
4.5.2	Protéine digérée .....	65
4.6	Analyse de la deutération des peptides.....	65

## CHAPITRE 3 : RESULTATS

### PARTIE 1 : MISE AU POINT DE LA METHODE

1. Préambule et rappel des contraintes expérimentales .....	67
2. Isolement du transporteur bAnc1p : optimisation pour l'analyse en spectrométrie de masse .....	67
2.1 Dosage du transporteur bAnc1p .....	67
2.2 Extraction et purification de la protéine bAnc1p.....	69
2.3 Mesure de la masse moléculaire de bAnc1p .....	69
3. Mise au point des conditions de protéolyse du transporteur bAnc1p.....	71
3.1 Criblage de protéases acides .....	71
3.2 Production d'une protéase recombinante, la rhizopuspepsine .....	73
3.3 Réalisation des cartes peptidiques du transporteur .....	74
4. Mise au point des conditions d'extraction du détergent.....	78
4.1 Extraction du détergent par adsorption sur BioBeads avant protéolyse acide .....	78
4.2 Extraction du détergent par des solvants organiques après protéolyse .....	80
4.2.1 Extraction du détergent à l'aide de solvants organiques.....	80
4.2.2 Extraction du détergent sur phase solide .....	82
4.3 Mise au point des conditions d'extraction du détergent avant l'analyse en spectrométrie de masse .....	84
4.3.1 Montage d'une ligne LC .....	84
4.3.2 Analyse de la perte de deutération induite par la séquence de lavage.....	86
5. Mises au point des conditions d'échange.....	88
6. Conclusion .....	88

### PARTIE 2 : RESULTATS DES CINETIQUES D'ECHANGE H/D

1. Validation de l'approche à l'aide des données biochimiques et structurales du transporteur .....	91
1.1 Deutération du complexe transporteur-CATR.....	91
1.2 Deutération des cystéines 56, 128 et 256 .....	93
1.3 Conclusion .....	97
2. Analyse des cinétiques d'échange H/D pour les différents complexes protéine-inhibiteur .....	99
2.1 Analyse globale de la deutération des différents complexes .....	99
2.2 Deutération différentielle des complexes transporteur-CATR et transporteur-BA .....	99
2.3 Analyse des hélices transmembranaires impaires.....	101
2.3.1 Hélice H1 (résidus 1 à 35).....	101
2.3.2 Hélice H3 (résidus 110 à 140).....	103
2.3.3 Hélice H5 (résidus 209 à 239).....	103
2.4 Les hélices transmembranaires paires et les boucles de l'espace intermembranaire (c1 et c2) .....	105
2.4.1 L'hélice H2 et le coude c1.....	105
2.4.2 L'hélice H4 .....	107
2.5 Les boucles matricielles m1, m2, m3 .....	107
2.5.1 La boucle m1 (résidus 36 à 73) .....	109
2.5.2 La boucle m2 (résidus 143 à 176) .....	109
2.5.3 La boucle m3 (résidus 240 à 272) .....	111
2.6 Modèle de transition conformationnels de bAnc1p en présence des inhibiteurs .....	111

### **PARTIE 3 : CINETIQUES D'ECHANGE H/D IN ORGANELLO**

1.	Mises au point expérimentales .....	115
1.1	Isolement des complexes bAnc1p-inhibiteurs après deutération <i>in organello</i> .....	117
1.1.1	Marquage des protéines <i>in organello</i> .....	117
1.1.2	Purification de bAnc1p après marquage au deutérium .....	117
1.2	Mise au point des conditions de deutération des membranes mitochondrielles .....	117
1.3	Mise au point des conditions de purification de la protéine dans les conditions d'échange H/D minimum.....	119
2.	Analyse des données de deutération de bAnc1p dans l'état membranaire .....	122
2.1	Deutération de l'hélice H1 dans la membrane mitochondriale.....	124
2.2	Deutération de la boucle m1 dans la membrane mitochondriale .....	126
2.3	Deutération de l'hélice H2 dans la membrane mitochondriale.....	126
2.4	Deutération de l'hélice H3 dans la membrane mitochondriale .....	128
2.5	Deutération des autres régions de bAnc1p dans la membrane mitochondriale .....	128
2.6	Conclusion .....	130

### **PARTIE 4 : ETUDE DES MUTATIONS PATHOGENES DU TRANSPORTEUR D'ADP/ATP**

#### **MITOCHONDRIAL HUMAIN**

1.	Validation du modèle DdAncAp exprimé dans <i>S. cerevisiae</i> .....	135
1.1	Croissance des levures .....	135
1.2	Quantification du transporteur DdAncAp dans les mitochondries .....	135
1.3	Paramètres cinétiques de l'échange ADP/ATP pour le transporteur DdAncAp .....	137
2.	Etude des mutations pathogènes de hAnc1p dans la souche JL1Δ2Δ3u <sup>-</sup> -DdANCA .....	139
2.1	Croissance des levures exprimant les transporteurs DdAncAp mutés .....	139
2.2	Quantification du transporteur DdAncAp-V291M dans les mitochondries.....	141
2.3	Paramètres cinétiques de l'échange ADP/ATP pour le transporteur DdAncAp-V291M .....	141
3.	Conclusion .....	141

### **CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE**

1.	Mise en œuvre de la méthode d'analyse par MS en présence de détergent.....	145
2.	Deutération des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA.....	146
3.	Deutération des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA dans les membranes mitochondrielles .....	151
4.	Etude des mutations pathogènes du transporteur d'ADP/ATP humain.....	152

### **CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

1.	Etude du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin par DXMS .....	155
2.	Etude des mutations de hAnc1p entraînant des pathologies humaines .....	156

Références Bibliographiques.....	157
----------------------------------	-----

# INDEX DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES :

<b>Figure 1</b> : Tomographie d'une mitochondrie de cerveau de poulet.....	4
<b>Figure 2</b> : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale .....	4
<b>Figure 3</b> : Modèle hypothétique d'un membre de la MCF déduit de la structure 3D de bAnc1p-CATR .....	6
<b>Figure 4</b> : Modèle d'import d'un transporteur mitochondrial .....	8
<b>Figure 5</b> : Structure chimique des principaux inhibiteurs du transporteur d'ADP/ATP .....	11
<b>Figure 6</b> : Etats conformationnels du transporteur d'ADP/ATP .....	15
<b>Figure 7</b> : Structure 3D du complexe transporteur d'ADP/ATP-CATR .....	20
<b>Figure 8</b> : Détails structuraux du complexe bAnc1p-CATR .....	20
<b>Figure 9</b> : Bilan des données d'accessibilité des différentes régions du transporteur bovin dans les complexes transporteur-CATR ou transporteur-BA.....	22
<b>Figure 10</b> : Modèle représentant le changement de conformation de la boucle m2 de ScAnc2p en complexe avec le CATR ou le BA.....	28
<b>Figure 11</b> : Données d'accessibilité des différentes régions du transporteur de levure en fonction des inhibiteurs présents (CATR et BA) .....	31
<b>Figure 12</b> : Vitesse d'échange H/D d'une chaîne de poly-alanine .....	35
<b>Figure 13</b> : Schéma de marquage d'une protéine par échange H/D .....	35
<b>Figure 14</b> : Schéma de l'analyse d'une protéine par spectrométrie de masse après échange H/D	38
<b>Figure 15</b> : Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries de cœur de bœuf.....	51
<b>Figure 16</b> : Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries de levure.....	52
<b>Figure 17</b> : Principe du dosage de l'ATP par le système luciférine-luciférase.....	52
<b>Figure 18</b> : Titration des sites de fixation de l' <sup>3</sup> H]ATR sur des mitochondries de cœur de bœuf	68
<b>Figure 19</b> : Purification de bAnc1p .....	68
<b>Figure 20</b> : Spectres de masse du transporteur d'ADP/ATP analysé en MS-ESI-ToF .....	70
<b>Figure 21</b> : Digestions de bAnc1p par la pepsine et les protéases de type XIII et XVIII analysées par SDS-PAGE .....	72
<b>Figure 22</b> : Recouvrement de bAnc1p obtenu par analyse en MSMS des peptides obtenus après protéolyse de bAnc1p par des protéases acides .....	75
<b>Figure 23</b> : Carte peptidique de bAnc1p digéré par la pepsine immobilisée .....	77
<b>Figure 24</b> : Cinétique d'adsorption par des BioBeads du Triton X-100 contenu dans une préparation de bAnc1p .....	79
<b>Figure 25</b> : Extraction du Triton X-100 d'une préparation de bAnc1p par le dichlorométhane ...	79
<b>Figure 26</b> : Analyse en MALDI-MS de la digestion de bAnc1p par la pepsine .....	81
<b>Figure 27</b> : Montage de la ligne de chromatographie liquide pour son utilisation en DXMS .....	83
<b>Figure 28</b> : Deutération moyenne des peptides issus de la digestion de l'aMb par la pepsine par rapport à la deutération maximale théorique .....	85
<b>Figure 29</b> : Cinétiques de marquage du peptide 129-140 dans les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA .....	87
<b>Figure 30</b> : Cinétiques de marquage du peptide 36-56 dans les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA .....	87
<b>Figure 31</b> : Cinétiques de deutération du complexe bAnc1p-CATR.....	92
<b>Figure 32</b> : Cinétiques de deutération des peptides 36-55 et 36-56.....	94
<b>Figure 33</b> : Cinétiques de deutération des peptides 248-255 et 248-256.....	94
<b>Figure 34</b> : Cinétique de marquage au deutérium de la cystéine 128 située dans l'hélice H3 d'après la structure 3D de bAnc1p .....	96

<b>Figure 35</b> : Deutération globale du transporteur d'ADP/ATP en complexe avec le CATR ou le BA .....	98
<b>Figure 36</b> : Différence de deutération entre les complexes transporteur-inhibiteur.....	98
<b>Figure 37</b> : Cinétiques de deutération de l'hélice H1 .....	100
<b>Figure 38</b> : Cinétiques de deutération de l'hélice H3 .....	102
<b>Figure 39</b> : Cinétiques de deutération de l'hélice H5 .....	104
<b>Figure 40</b> : Cinétiques de deutération de l'hélice H2 .....	104
<b>Figure 41</b> : Cinétiques de deutération de l'hélice H4.....	106
<b>Figure 42</b> : Cinétiques de deutération de la boucle matricielle m1 .....	108
<b>Figure 43</b> : Cinétiques de deutération de la boucle matricielle m2 .....	110
<b>Figure 44</b> : Cinétiques de deutération de la boucle matricielle m3 .....	110
<b>Figure 45</b> : Modèles conformationnels du transporteur bAnc1p .....	112
<b>Figure 46</b> : Principe du marquage des mitochondries en présence de D <sub>2</sub> O après inhibition par le CATR ou le BA.....	116
<b>Figure 47</b> : Séquence opératoire pour l'extraction et purification de bAnc1p après deutération dans les mitochondries .....	116
<b>Figure 48</b> : Deutération de bAnc1p dans la membrane mitochondriale en fonction de la température .....	118
<b>Figure 49</b> : Mise au point des conditions de purification de bAnc1p sur colonne d'HTP essorée.....	120
<b>Figure 50</b> : Cinétiques de deutération <i>in organello</i> de l'hélice H1 .....	123
<b>Figure 51</b> : Cinétiques de deutération <i>in organello</i> de la boucle matricielle m1 .....	125
<b>Figure 52</b> : Cinétiques de deutération <i>in organello</i> de l'hélice H2 .....	127
<b>Figure 53</b> : Cinétiques de deutération <i>in organello</i> de l'hélice H3 .....	129
<b>Figure 54</b> : Cinétiques de deutération <i>in organello</i> des boucles matricielles m2 et m3 et de l'hélice H5.....	131
<b>Figure 55</b> : Modélisation de hAnc1p sur la structure de bAnc1p-CATR .....	134
<b>Figure 56</b> : Analyse phénotypique de la souche JL1Δ2Δ3u <sup>-</sup> transformée par le plasmide pRS314 portant les gènes ScANC2, HANC1, DdANCA .....	136
<b>Figure 57</b> : Analyse de la croissance des souches de levure exprimant différents transporteurs d'ADP/ATP mutés .....	140
<b>Figure 58</b> : Modèle hypothétique du mécanisme de transport d'ADP/ATP réalisé par bAnc1p	148

## TABLEAUX :

<b>Tableau 1</b> : Nature et dilution des anticorps primaires utilisés .....	48
<b>Tableau 2</b> : Liste des amorces utilisées .....	62
<b>Tableau 3</b> : Mutations humaines dans le transporteur hAnc1p et leurs correspondances dans le transporteur DdAncA .....	134
<b>Tableau 4</b> : Données de croissance des souches de levures, de fixation de l' <sup>3</sup> H]ATR et paramètres cinétiques du transport d'ADP/ATP obtenus à partir de mitochondries isolées des souches JL1Δ2Δ3u <sup>-</sup> -ScANC2 et JL1Δ2Δ3u <sup>-</sup> -DdANCA.....	138
<b>Tableau 5</b> : Données de croissance des souches de levures, de fixation de l' <sup>3</sup> H]ATR et paramètres cinétiques du transport d'ADP/ATP obtenus à partir de mitochondries isolées des souches JL1Δ2Δ3u <sup>-</sup> -DdANCA et JL1Δ2Δ3u <sup>-</sup> -DdANCA-V291M.....	142

# **INTRODUCTION**

## ABREVIATIONS

**ADP** : Adénosine diphosphate

**ATP** : Adénosine triphosphate

**Ancp** : Transporteur d'ADP/ATP mitochondrial

**ATR** : Atractyloside

**bANC1** : Gène codant l'isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin

**bAnc1p** : Isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin

**BCA** : Acide bicinchoninique

**BSA** : Albumine sérique bovine

**c1 et c2** : Boucles 1 et 2 du transporteur bAnc1p exposées dans l'espace intermembranaire

**CATR** : Carboxyatractyloside

**CMC** : Concentration micellaire critique

**DCM** : Dichlorométhane

**DdANCA** : Gène codant l'unique isoforme du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de *Dictyostelium discoideum*

**DdAncAp** : Unique isoforme du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de *Dictyostelium discoideum*

**DXMS** : Echange Hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse

**EMA** : Eosine-5-maléimide

**ESI** : Ionisation par électrospray

**H1 à H6** : Hélices transmembranaires 1 à 6 du transporteur bAncp

**h1-2, h3-4 et h5-6** : Hélices matricielles comprises entre H1 et H2, H3 et H4, et H5 et H6

**hANC1** : Gène codant l'isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial humain

**hAnc1p** : Isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial humain

**HTP** : Hydroxyapatite

**LAPAO** : 3-lauryl-amido-N,N'-diméthylamino-propylamine oxide

**m1, m2 et m3** : Boucles matricielles 1, 2 et 3 du transporteur bAnc1p

**MALDI** : Désorption-ionisation laser assistée par matrice

**MS** : Spectrométrie de masse

**NEM** : N-Ethylmaléimide

**ScANC2** : Gène codant l'isoforme 2 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

**ScAnc2p** : Isoforme 2 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

**ToF** : Temps de vol

# **INTRODUCTION**

Tous les êtres vivants ont besoin d'énergie pour se développer. Chez les organismes eucaryotes, caractérisés par la compartimentation de leur cytoplasme, plusieurs organites jouent des rôles essentiels dans la production de l'énergie. L'un d'entre eux, la mitochondrie, est, en conditions aérobie, le siège principal de la synthèse d'ATP, une molécule à haut potentiel énergétique qui intervient dans la plupart des voies métaboliques cellulaires.

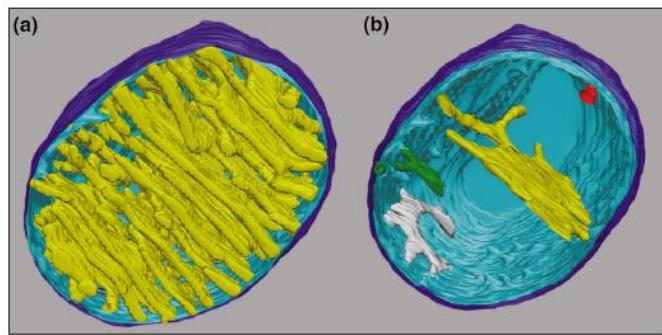
## 1. La mitochondrie

### 1.1. Rôle et organisation

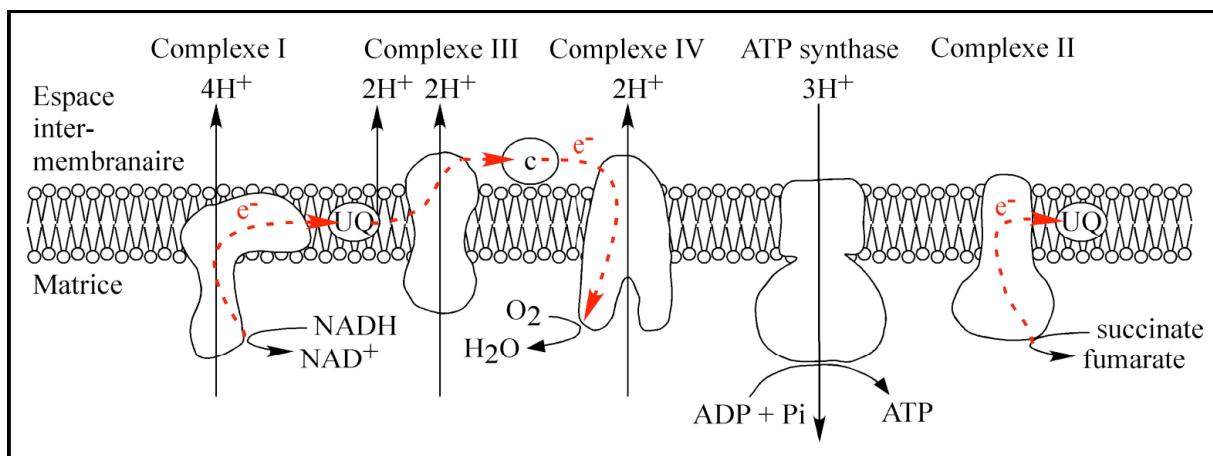
En 1857, à partir d'observations au microscope de cellules musculaires, Kölliker met en évidence un organite, la mitochondrie, qui sera mieux caractérisé par Altmann à la fin du XIXème siècle. Cet organite, présent chez tous les organismes eucaryotes aérobie, est de forme cylindrique (figure 1) et présente une taille voisine de celle d'une bactérie (1 à 3 µm de long pour 0,5 à 1 µm de diamètre). Son nombre au sein de la cellule fluctue en fonction des besoins énergétiques de celle-ci et peut aller de quelques unités à plusieurs milliers dans des cellules musculaires. Cet organite est composé de deux membranes protéolipidiques, aux compositions très différentes, qui isolent l'espace intermembranaire du cytoplasme cellulaire et de l'intérieur de la mitochondrie, appelé aussi matrice mitochondriale.

La membrane externe est très perméable aux petites molécules de taille inférieure à 5000 Da, car elle contient en abondance une protéine appelée porine mitochondriale ou VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) pouvant représenter jusqu'à 20 % des protéines totales de cette membrane. De ce fait, l'espace intermembranaire se trouve peu isolé du cytoplasme cellulaire et sa composition en molécules de petite taille, reste proche de celui-ci.

La membrane interne représente par contre une véritable barrière entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Cette bicouche lipidique présente des invaginations appelées crêtes mitochondrielles qui permettent d'augmenter grandement la surface de contact entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire (figure 1). Récemment, des analyses par tomographie électronique ont montré que les crêtes mitochondrielles ne sont pas de simples replis membranaires mais traversent entièrement la matrice mitochondriale, formant ainsi des compartiments distincts (Mannella, 2006). La membrane interne est très riche en protéines (75 % du poids sec de la membrane)



**Figure 1 : Tomographie d'une mitochondrie de cerveau de poulet (Mannella, 2006).** **a.** Modèle montrant les crêtes mitochondriales en jaune, la membrane interne en bleu clair et la membrane externe en bleu foncé. **b.** 4 types de crêtes en jaune, vert, rouge, blanc ; la membrane interne en bleu clair et la membrane externe en bleu foncé.



**Figure 2 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.** Les flèches noires indiquent les transferts de protons, les flèches rouges représentent le trajet des électrons entre les différents éléments de la chaîne respiratoire. UQ = ubiquinone, c = cytochrome c.

capables d'assurer des fonctions biologiques très variées comme le transport spécifique de métabolites ou le transfert d'électrons.

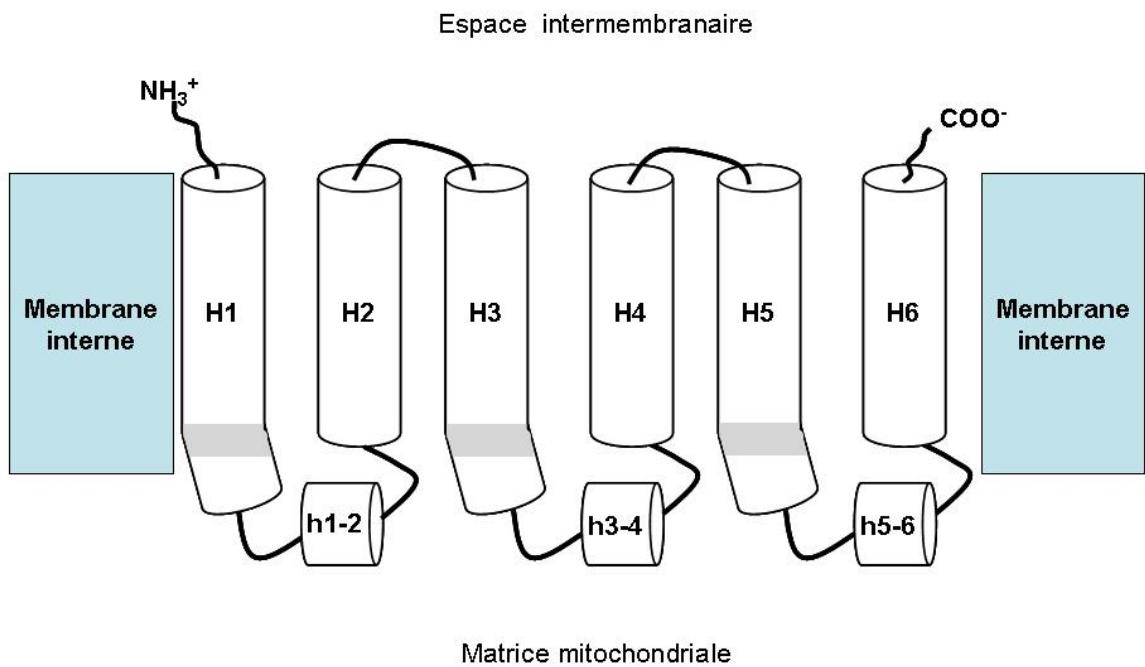
La matrice mitochondriale est composée d'un très grand nombre d'enzymes solubles impliquées dans le métabolisme oxydatif (cycle de Krebs, hélice de Lynen...), de substrats, de cofacteurs nucléotidiques et d'ions inorganiques. Elle contient aussi toute la machinerie génétique (ADN, ARN, ribosomes et polymérases) capable de maintenir le génome mitochondrial et de permettre la synthèse de plusieurs protéines mitochondrielles impliquées dans la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP, mais aussi de nombreux ARN de transfert et ARN ribosomaux. Chez l'homme, le génome mitochondrial contient 37 gènes codant pour 13 protéines, 22 ARNt et 2 ARNr.

## 1.2. Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP

La matrice est le lieu de nombreuses réactions enzymatiques d'oxydation et de décarboxylation de métabolites variés permettant la réduction de différents cofacteurs, comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) en NADH. Ces cofacteurs réduits vont ensuite pouvoir être réoxydés au niveau de la membrane interne en cédant leurs électrons à des complexes membranaires multiprotéiques qui composent la chaîne respiratoire (figure 2). Ainsi le NADH peut être oxydé en NAD<sup>+</sup> en cédant deux électrons au complexe I (NADH-ubiquinone réductase). Ces électrons vont ensuite transiter par l'ubiquinone, qui va passer de l'état oxydé (UQ) à l'état réduit (UQH<sub>2</sub>), puis être délivrés au complexe III (ubiquinol-cytochrome c réductase) de la chaîne respiratoire entraînant la réoxydation de l'ubiquinone. Ils vont enfin être cédés au complexe IV (cytochrome c oxydase) par l'intermédiaire d'une molécule de cytochrome c associée à la membrane du côté de l'espace intermembranaire et finalement permettre la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.

A chaque transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire, entre 2 et 4 protons sont expulsés de la matrice vers l'espace intermembranaire, créant un gradient de concentration de protons et donc une acidification locale de l'espace intermembranaire ( $\Delta\text{pH} \approx 1$ ) et une différence de potentiel d'environ 200 mV.

Enfin, l'ATP synthase, un important complexe protéique largement ancré dans la membrane interne va utiliser cette force protomotrice, pour permettre aux protons de traverser la membrane interne mitochondriale à travers sa sous unité F0. Le mouvement transmembranaire des protons imprime une rotation à la sous-unité c de la partie soluble F1 du complexe permettant la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et de phosphate inorganique



**Figure 3 : Modèle hypothétique d'un membre de la MCF déduit de la structure 3D de bAnc1p-CATR.** Les extrémités N et C terminales sont situées dans l'espace intermembranaire. H1 à H6 : hélices transmembranaires. h1-2, h3-4 et h5-6 : hélices matricielles. La zone grisée représente la signature peptidique des membres de la MCF.

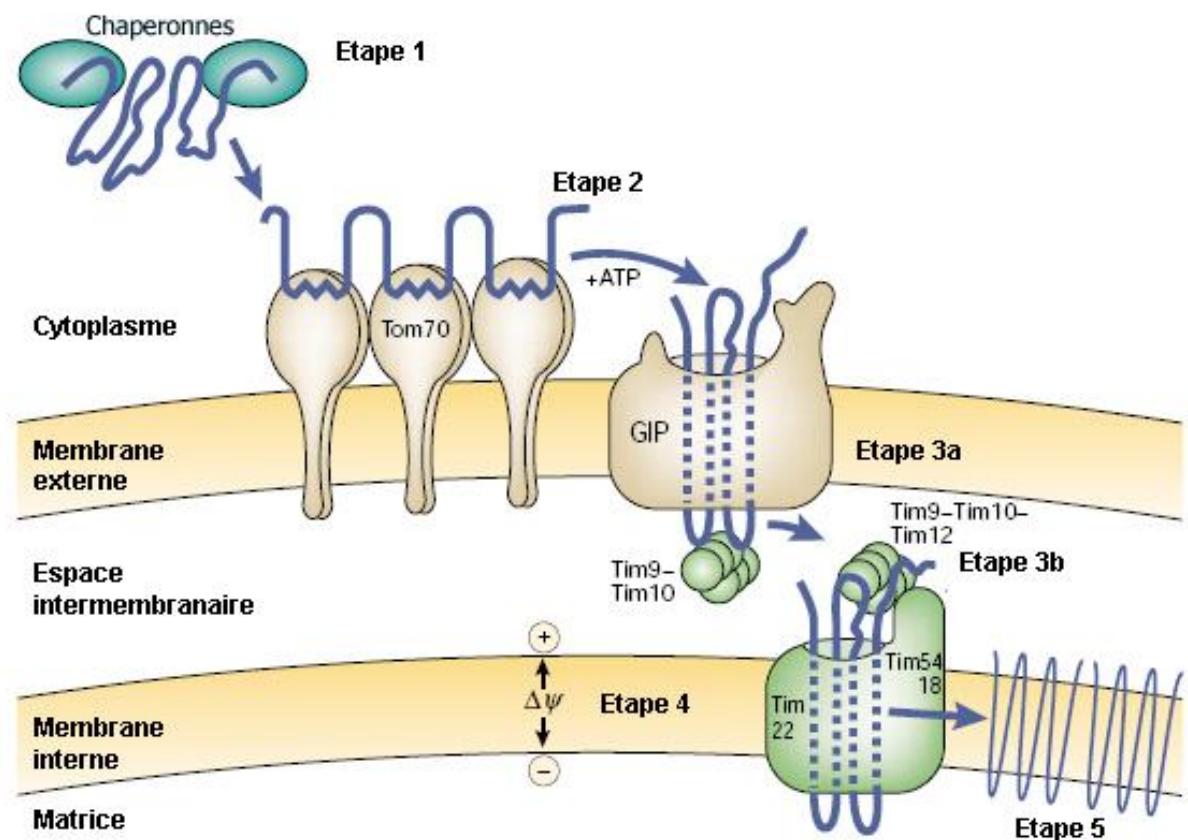
présents dans la matrice mitochondriale (Sambongi *et al.*, 1999). L'import de ces substrats dans la matrice est réalisé grâce à deux transporteurs protéiques spécifiques, localisés dans la membrane interne mitochondriale : le transporteur mitochondrial de phosphate et le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP (Ancp). Ces deux protéines appartiennent à une grande famille de transporteurs localisés dans la membrane interne des mitochondries qui réalisent tous et de manière spécifique un transport de métabolites entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

### 1.3. Les transporteurs mitochondriaux

L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale impose la présence de nombreux transporteurs membranaires capables de réaliser l'import et l'export des métabolites nécessaires au maintien de la vie cellulaire. Ces molécules sont pour la plupart des anions de petite taille (<500 Da) comme des nucléosides-phosphate (ADP, ATP), des acides carboxyliques (oxaloacétate, malate, citrate...), ou encore des molécules inorganiques (phosphate). Il a également été démontré que certains de ces transporteurs étaient capables de prendre en charge des cations. C'est le cas de l'UCP (pour UnCoupling Protein) qui réalise le transport de protons ou des MRS qui transportent du fer sous la forme d'ions ferreux (Froschauer *et al.*, 2009).

Les transporteurs réalisant ces échanges appartiennent tous à une grande famille de protéines membranaires intrinsèques appelés MCF pour *Mitochondrial Carrier Family*. Suivant les espèces, on dénombre aujourd'hui jusqu'à 46 transporteurs appartenant à la MCF caractérisés par la présence, au niveau de la séquence protéique, de la signature suivante : P-X<sub>1</sub>-D/E-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-K/R puis 20 à 30 résidus plus loin D/E-G-X-X-X-X-W/Y/F-K/R-G, où X<sub>1</sub> représente un acide aminé aromatique et X<sub>2</sub> à X<sub>6</sub> des acides aminés quelconques (Walker et Runswick, 1993; Haitina *et al.*, 2006). Tous ces transporteurs présentent en plus d'autres caractéristiques communes dont certaines sont tirées des données obtenues sur le transporteur de nucléotides adényliques :

- Ils sont codés par le génome nucléaire.
- Leur structure primaire est issue de la double duplication d'un gène ancestral (codant 3 fois 100 acides aminés environ) et leur masse molaire est comprise entre 30 et 35 kDa (Walker et Runswick, 1993).
- Chaque tiers de la protéine est composé de deux hélices transmembranaires reliées entre elles par une grande boucle contenant une petite hélice matricielle. Les hélices impaires sont coudées au niveau de la proline de la signature de la MCF (figure 3).



**Figure 4 : Modèle d'import d'un transporteur mitochondrial, d'après Pfanner et Geissler en 2001.** Etape 1 : la préprotéine est transportée à travers le cytosol en complexe avec des chaperons. Etape 2 : plusieurs molécules du récepteur TOM70 se lient à la préprotéine. Etape 3a : translocation de la protéine au travers du pore général d'import de la membrane externe et interaction de la préprotéine avec le complexe TIM9-10. Etape 3b : la préprotéine se lie à la surface de la membrane interne en association avec TIM9-10 et TIM12. Etape 4 : Insertion de la préprotéine dans le complexe TIM22 sous l'effet du potentiel de membrane. Etape 5 : le transporteur se replie dans la membrane interne.

- Leur point isoélectrique est élevé ( $>8$ ).
- Ils ne sont pas retenus sur une colonne d'HTP en absence d'ions phosphate ou calcium (pour revue : Palmieri, 1994).

Les transporteurs étant codés par le génome nucléaire, ils doivent être importés et donc traverser la membrane externe puis être insérés dans la membrane interne mitochondriale. Contrairement à d'autres protéines mitochondrielles synthétisées elles aussi à partir du génome nucléaire, les membres de la MCF ne possèdent pas de pré-séquence clivable portant l'information d'adressage à la mitochondrie (pour revue : Pfanner et Geissler, 2001). Cette information est donc portée par la séquence elle-même et reste à ce jour encore mal caractérisée. Toutefois, les membres de la MCF produits dans les cellules végétales possèdent une séquence d'adressage clivable qui permettrait d'éviter un mauvais adressage vers les chloroplastes (pour revue : Pfanner et Geissler, 2001).

Pour être importées dans la mitochondrie, les protéines appartenant à la MCF vont interagir, une fois synthétisées, avec de nombreux systèmes multi-protéiques qui vont les guider tout au long du mécanisme d'import. Dès le début de la synthèse, la nouvelle chaîne polypeptidique va être prise en charge par des chaperons cytosoliques tels que la protéine HSP 70 et le MSF (Mitochondrial import Stimulating Factor) pour éviter son agrégation. Le complexe transporteur-chaperon va ensuite interagir avec des protéines de la membrane externe de la mitochondrie et le transporteur va être pris en charge par des multimères de TOM70 (Translocase of the Outer Membrane) pour traverser la membrane externe au niveau du pore général d'import des TOM, le GIP (figure 4).

Une fois dans l'espace intermembranaire, le transporteur est pris en charge par le complexe TIM9-10 (Translocase of Inner Membrane) et transporté jusqu'au complexe membranaire TIM22 localisé dans la membrane interne (pour revue : Pfanner et Geissler, 2001). Sous l'action du potentiel de membrane, la préprotéine pénètre dans le complexe TIM22 qui va assurer son repliement correct dans la membrane mitochondriale (figure 4).

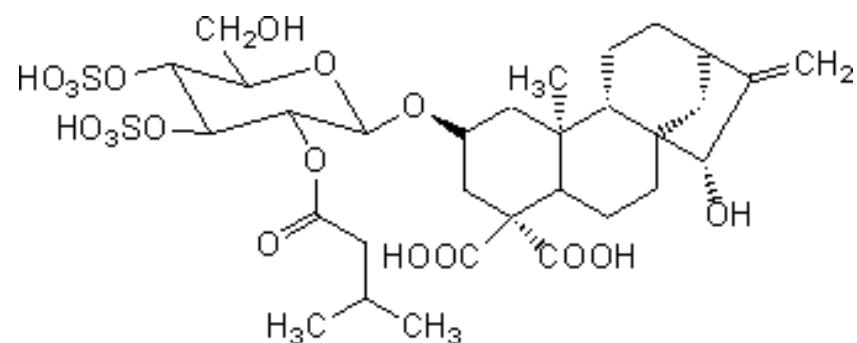
## 2. Le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial

### 2.1. Généralités

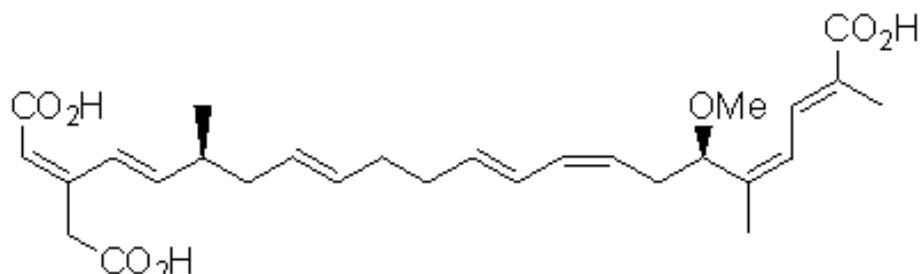
Un des membres de la MCF, le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial, met à la disposition des besoins cellulaires l'ATP néosynthétisé dans la matrice mitochondriale en le libérant dans l'espace intermembranaire par échange contre de l'ADP. C'est en 1965 qu'E. Pfaff met en évidence un échange spécifique des nucléotides adényliques au travers des membranes de mitochondries isolées de foie de rat (Pfaff *et al.*, 1965) et démontre l'existence d'un transporteur spécifique. Peu après, deux équipes démontrent que ce transporteur est de nature protéique (Duée et Vignais, 1965; Pfaff *et al.*, 1965). Le nom de transporteur d'ADP/ATP mitochondrial est alors proposé (Klingenberg et Pfaff, 1968). L'abréviation que nous utiliserons est Ancp.

Cette protéine joue un rôle extrêmement important au niveau physiologique de par la place centrale qu'elle occupe dans le renouvellement de l'énergie cellulaire. En effet, un homme renouvelle en un jour son propre poids d'ATP et pour une large partie, cet ATP transite par l'Ancp. En 1997, la construction d'une lignée de souris transgéniques déficiente pour le gène *mANC1* codant pour la principale isoforme musculaire du transporteur a conduit à des animaux viables mais présentant une hypertrophie cardiaque et une désorganisation des fibres musculaires squelettiques (Graham *et al.*, 1997). Chez l'homme, toute défaillance de cette protéine entraîne de graves pathologies comme les myopathies ou moins sévères comme les ophtalmoplégies (Bakker *et al.*, 1993; Kaukonen *et al.*, 2000; Fiore *et al.*, 2001; Napoli *et al.*, 2001; pour revue : Trézéguet *et al.*, 2008). Il existe 6 mutations ponctuelles pathologiques, une causant une cardiomyopathie (A123D) et 5 causant des ophtalmoplégies externes progressives (adPEO) : une forme sporadique (V289M) et 4 formes familiales (A90D, A114P, L98P, D104G) (Kaukonen *et al.*, 2000; Napoli *et al.*, 2001; Komaki *et al.*, 2002; Siciliano *et al.*, 2003; Deschauer *et al.*, 2005). Toutes ces mutations sont situées du côté de l'espace intermembranaire dans le complexe bAnc1p-CATR et 3 d'entre elles (A90D, L98P et A114P) sont localisées à l'interface lipide-protéine (Trézéguet *et al.*, 2008).

A



B



**Figure 5 : Structure chimique des principaux inhibiteurs du transporteur d'ADP/ATP A. Le carboxyatractyloside (CATR), membre de la famille des atracylosides. B. L'acide bongkrekique (BA).**

## 2.2. Les caractéristiques biochimiques du transport d'ADP/ATP

### 2.2.1. Le transport de nucléotides

Le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial réalise l'échange d'une grande quantité de nucléotides adényliques, mais présente une activité de transport peu élevée de l'ordre de 1000 à 2000 min<sup>-1</sup> à 20°C pour des mitochondries isolées de cœur de rat (Vignais, 1976; Klingenberg, 1980). Cette faible vitesse de transport est palliée par une grande abondance de la protéine dans les membranes mitochondrielles. En effet, le transporteur d'ADP/ATP peut représenter dans certains tissus près de 10 % des protéines de la membrane interne mitochondriale.

Dans les conditions physiologiques, une molécule d'ADP cytosolique est échangée contre une molécule d'ATP matricielle, toutes deux sous la forme de nucléotides libres chargés respectivement 3<sup>-</sup> et 4<sup>-</sup> (Duée et Vignais, 1965; Pfaff *et al.*, 1965). Cet échange est donc électrogénique et sa direction est imposée par le potentiel de membrane créé par la chaîne respiratoire (LaNoue *et al.*, 1978; Duszynski *et al.*, 1981). En l'absence de ce potentiel, le transporteur d'ADP/ATP peut indifféremment échanger de l'ADP ou de l'ATP contre l'un ou l'autre des nucléotides transportés (Krämer et Klingenberg, 1980).

### 2.2.2. Les inhibiteurs du transport d'ADP/ATP

Des molécules d'origine naturelle ont été mises en évidence après avoir causé des empoisonnements aigus chez l'homme et l'animal et se sont révélées être des inhibiteurs de l'échange des nucléotides adényliques. Ces molécules qui bloquent le transporteur d'ADP/ATP appartiennent principalement à deux familles, les atracylosides et les acides bongkréiques (figure 5). Ces molécules, présentant des structures chimiques différentes, sont capables de figer le transporteur dans des conformations stables présentant des propriétés biochimiques différentes.

#### 2.2.2.1. Les atracylosides

Les atracylosides sont des poisons naturels extrêmement toxiques, produits par des plantes telles que le chardon à glu *Atractylis gummifera* (une plante du bassin méditerranéen) au niveau de leurs rhizomes. Ces molécules présentent toutes un résidu de glucose disulfaté sur les carbones 3 et 4 ainsi qu'une chaîne isovalérique sur le carbone 2 et un acide kaurenoïque légèrement modifié (l'atractyligénine) lié au carbone 1 par une liaison éther. En 1878, Lefranc isole le premier membre

de cette famille d'inhibiteurs : l'attractyloside (ATR). Plus tard une molécule très proche de l'ATR est isolée et nommée premièrement gummiférine, puis carboxyattractyloside (CATR) une fois sa structure chimique identifiée et comparée à celle de l'ATR (figure 5A; Stanislas et Vignais, 1964; Vignais *et al.*, 1973). Chez les animaux, l'ATR est un inhibiteur compétitif du transporteur des nucléotides adényliques, alors que le CATR inhibe le transporteur de nucléotides de manière non compétitive. Les constantes de dissociation ( $K_d$ ) des complexes transporteur bovin-inhibiteur ( $bAnc1p$ -ATR et  $bAnc1p$ -CATR) sont respectivement d'environ 200 nM et 20 nM. D'autres plantes produisent des molécules voisines de l'ATR comme *Wedelia asperrima* qui produit le wedeloside dont l'affinité pour le transporteur est comparable à celle du CATR (Klingenberg *et al.*, 1985), ou encore *Xanthium pungens* qui produit des dérivés de CATR désulfaltés (MacLeod *et al.*, 1990; Stewart et Steenkamp, 2000). De nombreux dérivés de l'ATR ou du CATR ont été synthétisés, dans lesquels l'alcool primaire porté par le carbone 6 du résidu glucose (figure 5A) a été modifié par voie chimique afin, par exemple, d'y incorporer un groupement acétyle radioactif (Block *et al.*, 1981).

#### 2.2.2.2. Les acides bongkréiques

La deuxième famille d'inhibiteurs est représentée par les acides bongkréique (BA) et iso-bongkréique (iso-BA). Dans des conditions d'hygroscopie et de température spécifiques, ces molécules naturelles sont sécrétées par une bactérie, *Bukholderia cocovenenans*, qui se développe sur la pulpe de noix de coco (Henderson et Lardy, 1970; Lauquin *et al.*, 1976b). Leur structure chimique, différente de celle des ATRs, contient une longue chaîne carbonée polyinsaturée et trois groupements acides carboxyliques répartis de part et d'autre de la molécule (figure 5B). Néanmoins leur affinité pour le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial est très forte et, comme pour le CATR, caractérisée par des  $K_d$  voisins de 20 nM.

#### 2.2.2.3. Les autres inhibiteurs du transport d'ADP/ATP

D'autres molécules sont capables d'interagir avec le transporteur mais de manière beaucoup moins spécifique. On peut citer par exemple les dérivés d'acides gras comme les Acyl-CoA (Bell, 1980), des agents pontants comme le complexe cuivre-ortho-phénanthroline (Majima *et al.*, 2002), ou des dérivés fluorescents de nucléotides adényliques, photoactivable tel que le 2-azido-3'-O-naphtoyl-ADP (Dianoux *et al.*, 2000), ou non photoactivable comme le naphtoyl-ADP (Mayer *et al.*, 1984; Block *et al.*, 1986). Ces dérivés ont permis l'étude biochimique des Ancp en apportant notamment

des informations structurales sur les conformations adoptées par le transporteur au cours du mécanisme de transport des nucléotides à travers la membrane interne mitochondriale (pour revue : Klingenberg, 2008).

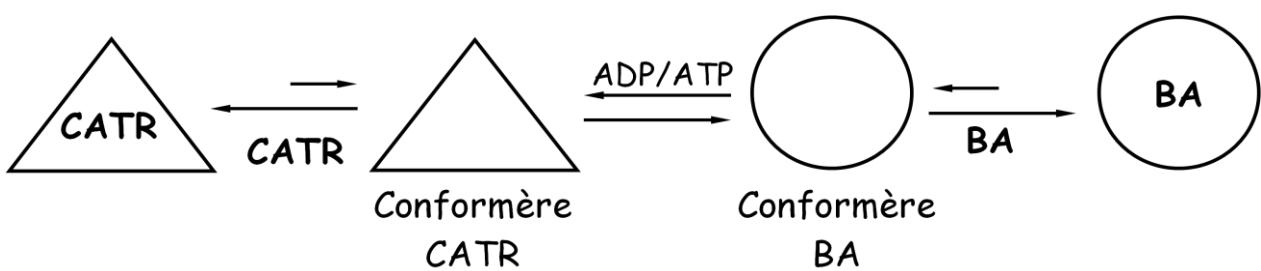
### 2.2.3. Aspects conformationnels du transporteur d'ADP/ATP

Au cours de l'échange des nucléotides, le transporteur d'ADP/ATP oscille entre plusieurs conformations mises en évidence à l'aide de différentes approches (pour revue : Brandolin *et al.*, 1993). Une étude par fluorescence intrinsèque des tryptophanes menée sur le transporteur bovin isolé en micelles de détergent a mis en évidence des états conformationnels, respectivement de basse et haute fluorescence, en présence de CATR et de BA dont le passage de l'un à l'autre nécessite la présence d'ATP (figure 6 ; Brandolin *et al.*, 1985). L'hypothèse selon laquelle le transporteur oscillerait au sein de la membrane entre ces différentes conformations lors du transport des nucléotides a été confirmée par l'utilisation d'un dérivé fluorescent non transporté de l'ADP, le naphtoyl-ADP (Block *et al.*, 1983). Sa fixation sur le transporteur natif dans la membrane et l'analyse de son déplacement par le CATR et le BA a permis de visualiser une augmentation de fluorescence liée à la libération de la sonde fixée, qui n'est totale qu'en présence d'une faible concentration de nucléotides transportables. Une autre étude a mis en évidence que certains détergents, comme le LAPAO et le CHAPS étaient capables de favoriser respectivement la conformation capable de fixer le CATR, appelée conformère CATR et celle capable de fixer le BA, appelée conformère BA (figure 6; Block et Vignais, 1986).

## 3. Le transporteur d'ADP/ATP bovin

### 3.1. Etudes biochimiques des différentes conformations du transporteur

Le transporteur d'ADP/ATP est l'un des transporteurs les plus étudiés. En effet le travail réalisé depuis plus de 40 ans sur l'isoforme exprimée dans les muscles striés a été facilité par la quantité de transporteur présent au niveau des mitochondries extraites de ce tissu, en particulier de cœur de bœuf. Toutes ces études ont permis une accumulation de données biochimiques et structurales qui ont été exploitées pour tenter d'appréhender le mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP.



**Figure 6 : Etats conformatio**nnels du transporteur d'ADP/ATP. Le transporteur d'ADP/ATP oscille entre différentes conformations dont 2, les conformères CATR et BA (représentés respectivement par un triangle et un rond), peuvent être bloquées par le CATR et le BA. Le changement conformationnel d'un conformère à l'autre est accéléré par l'ADP et l'ATP.

### 3.1.1. Protéolyse ménagée du transporteur bAnc1p

Une des approches utilisées pour mettre en évidence les états conformationnels du transporteur bovin a été la protéolyse ménagée. L'action de protéases spécifiques (trypsine, Arg-C, Lys-C) sur des mitochondries de cœur de bœuf ou des particules submitochondriales inversées (SMP) a été analysée afin de réaliser une étude comparative des fragments générés après protéolyse ménagée du transporteur d'ADP/ATP inhibé ou non avec du CATR ou du BA (Brandolin *et al.*, 1989; Marty *et al.*, 1992). Les résultats obtenus ont montré que les arginines 30 et 59 et les lysines 42, 146 et 244 étaient accessibles depuis la matrice dans le complexe bAnc1p-BA, mais pas dans le complexe bAnc1p-CATR. Ce résultat est en accord avec la structure 3D de ce dernier, dans laquelle ces trois lysines, réparties dans chaque tiers de la protéine, appartiennent chacune à un coude matriciel situé entre l'hélice transmembranaire impaire et l'hélice matricielle suivante. Ces régions de la protéine sont donc vraisemblablement impliquées dans le mécanisme de transport des nucléotides. Il a été proposé que ces variations d'accès soient dues à leur mouvement au cours du phénomène de transport.

### 3.1.2. Immunomarquage du transporteur bAnc1p

L'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre les extrémités N- et C-terminales du transporteur a permis de montrer, grâce à la technique de l'ELISA, que le début de la chaîne polypeptidique du transporteur bAnc1p (allant de l'acide aminé 1 à l'acide aminé 11) n'était accessible que dans le complexe transporteur-CATR, démontrant un masquage de cette région dans le complexe transporteur-BA (Brandolin *et al.*, 1989). La partie C-terminale du transporteur n'a pas pu être révélée par des anticorps dirigés contre la séquence des acides aminés 288 à 297 du transporteur bovin, laissant penser à un masquage de cette zone dans le complexe CATR aussi bien que dans le complexe BA.

### 3.1.3. Marquage chimique du transporteur bAnc1p

L'utilisation de l'azidonitrophenyl-butyryl-ATR a permis de délimiter une région impliquée dans la fixation de l'ATR entre la cystéine 159 et la méthionine 200 (Boulay *et al.*, 1983). Le marquage des lysines au phosphate de pyridoxal a permis la localisation, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, d'une majorité d'entre-elles, et cela en fonction de l'inhibiteur utilisé (Bogner *et al.*, 1986). En comparant les lysines marquées sur des SMP à celles marquées dans des

mitochondries fraîches, et en admettant que le réactif utilisé ne pénètre pas les membranes, les auteurs ont pu localiser du côté matriciel les lysines 42, 46, 146, 165 et du côté cytosolique les lysines 91, 93, 95, 162, 198, 205, 259 et 262 (Bogner *et al.*, 1986). Les résultats obtenus pour les lysines 42 et 46 sont cohérents avec les données de protéolyse ménagée qui les ont assignées également du côté matriciel (Bogner *et al.*, 1986). Ceux obtenus pour les lysines 91, 93, 95, 198 et 205 sont corrélés avec les données de la structure 3D du complexe transporteur-CATR qui les localisent au sein de boucles intermembranaires. Cependant plusieurs contradictions sont à noter et remettent en cause les résultats obtenus au cours de cette étude. Tout d'abord le positionnement des lysines 259 et 262 sur la face cytosolique du transporteur est en opposition avec les données de la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR qui les localisent dans la troisième boucle matricielle. Ensuite, les lysines 146, 162 et 165 sont tour à tour positionnées d'un côté ou de l'autre de la membrane. Pour les lysines 146 et 165, leur exposition du côté matriciel correspond à celle observée dans la structure 3D du transporteur. Cependant la lysine 162 est marquée préférentiellement par le phosphate de pyridoxal sur des mitochondries fraîches, suggérant un positionnement sur la face cytosolique de la membrane en désaccord avec les données structurales. Ces résultats sont contradictoires et suggèrent que la méthode utilisée pour quantifier le marquage chimique peut être remise en cause. Ce manque de fiabilité peut aussi être dû en partie au réactif qualifié de « non-pénétrant » les membranes, ce qui n'est jamais vraiment sûr.

Enfin, une étude similaire à celle menée avec un dérivé photoactivable d'ATR a été réalisée avec le 2-azido-ADP (Dalbon *et al.*, 1988). Elle a permis de mettre en évidence deux sites photomarqués par le dérivé d'ADP. Le premier, compris entre les acides aminés 153 et 200, recouvre la totalité du site précédemment marqué par le dérivé d'ATR, et correspond à la boucle matricielle 2 ainsi qu'au segment transmembranaire 4. Le second, situé côté C-terminal de la protéine, entre les acides aminés Y250 et M281, correspond à la boucle matricielle 3 ainsi qu'au début du segment transmembranaire 5. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur le transporteur d'ADP/ATP de la levure *S. cerevisiae* détaillés dans la suite de ce manuscrit.

### 3.1.4. Marquage des résidus cystéines du transporteur bAnc1p

Les cystéines sont classiquement utilisées dans l'étude de la topographie des protéines membranaires car elles sont la cible de réactifs spécifiques pénétrant plus ou moins les bicouches lipidiques. Le transporteur d'ADP/ATP bovin possède 4 cystéines dans sa séquence peptidique. D'après la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR, les cystéines 56, 159 et 256 sont situées respectivement dans les hélices matricielles h1-2, h3-4 et h5-6, la quatrième étant localisée au

milieu de l'hélice H3 en position 128 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Des études ont mis en évidence le potentiel inhibiteur du N-éthylmaléimide (NEM), un réactif spécifique des fonctions thiols des résidus cystéines, sur le transport de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane mitochondriale (Vignais et Vignais, 1972; Vignais *et al.*, 1975). Ces résultats signifient clairement que la protéine responsable de l'échange ADP/ATP présente une ou plusieurs cystéines accessibles au NEM. L'utilisation d'un autre réactif de thiols, l'éosine-5-maléimide (EMA), qualifié de non-pénétrant, a permis d'identifier parmi les 4 cystéines du transporteur (56, 128, 159 et 256) celles accessibles au réactif (Majima *et al.*, 1993). En conditions natives, la cystéine 159, située dans l'hélice matricielle 2, est la plus réactive à l'EMA avec un marquage d'environ 90 % dans des SMP au bout d'une minute, montrant une forte accessibilité de ce résidu. Les autres cystéines présentes dans les deux autres hélices matricielles (cystéines 56 et 256) sont elles aussi marquées mais plus lentement. La seule cystéine localisée dans un segment transmembranaire (cystéine 128) n'est pas marquée par l'EMA. Ce résultat peut être expliqué par la non-pénétration du réactif dans la membrane mitochondriale.

Deux autres études utilisant un marquage à l'aide du NEM et de l'EMA ont été réalisées dans des mitochondries sur les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA (Boulay et Vignais, 1984; Majima *et al.*, 1994). La première étude a montré que le NEM ne pouvait réagir que sur le complexe transporteur-BA et ne marquait qu'un seul résidu cystéine, celui en position 56. La formation d'une liaison covalente entre le NEM et la cystéine 56, située dans l'hélice matricielle 1, conduit à un blocage de la protéine dans la conformation BA et empêche donc toute fixation de CATR (Boulay et Vignais, 1984). La deuxième étude, utilisant l'EMA comme marqueur des cystéines, a permis de confirmer les données obtenues avec le NEM sur les complexes transporteur-inhibiteurs (Majima *et al.*, 1994).

### 3.1.5. Etat oligomérique du transporteur

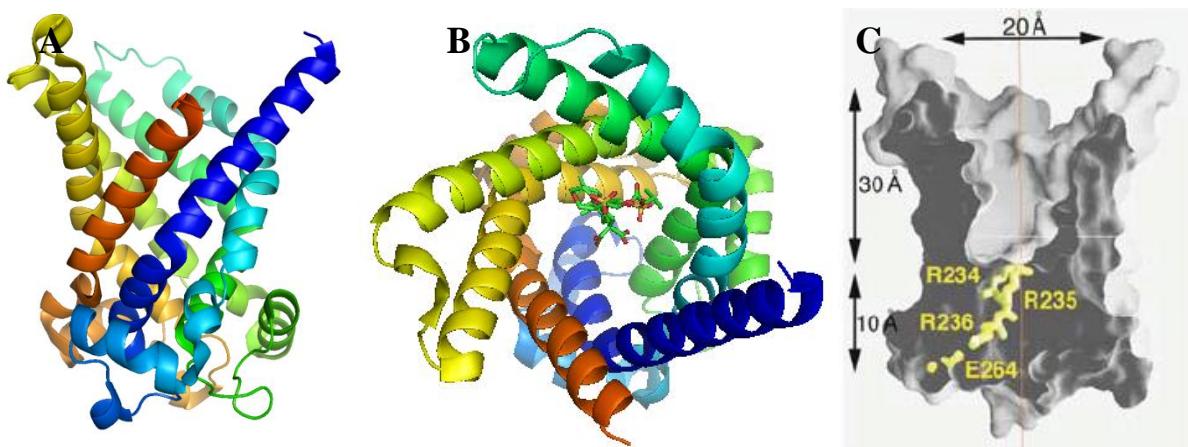
C'est en 1975 que les premières données sur la possible multimérisation du transporteur ont été publiées (Riccio *et al.*, 1975). Une analyse de la stoechiométrie transporteur/CATR a montré qu'une mole d'inhibiteur se fixait sur deux moles de transporteur, suggérant la présence d'une structure dimérique (Riccio *et al.*, 1975). Ces résultats ont été confirmés par d'autres analyses physico-chimiques et biophysiques. En effet, des résultats similaires ont été obtenus avec le complexe transporteur-BA et des expériences de centrifugation analytique et de diffusion de neutrons aux petits angles ont également montré la présence d'une forme dimérique de la protéine dans les micelles de détergents (Aquila *et al.*, 1978; Hackenberg et Klingenberg, 1980; Block *et al.*, 1982).

De plus, des preuves expérimentales d'une structure dimérique pour d'autres membres de la MCF comme le transporteur d'oxaloglutarate, de citrate, ou de phosphate, soutiennent une nouvelle fois l'hypothèse de l'oligomérisation des transporteurs mitochondriaux (Bisaccia *et al.*, 1996; Schroers *et al.*, 1998; Kotaria *et al.*, 1999). L'hypothèse d'une unité fonctionnelle tétramérique peut également être émise car deux sites de fixation des nucléotides d'affinités différentes ont pu être caractérisés par unité de transport et sur chaque face du transporteur (Brandolin *et al.*, 1982; Block et Vignais, 1984).

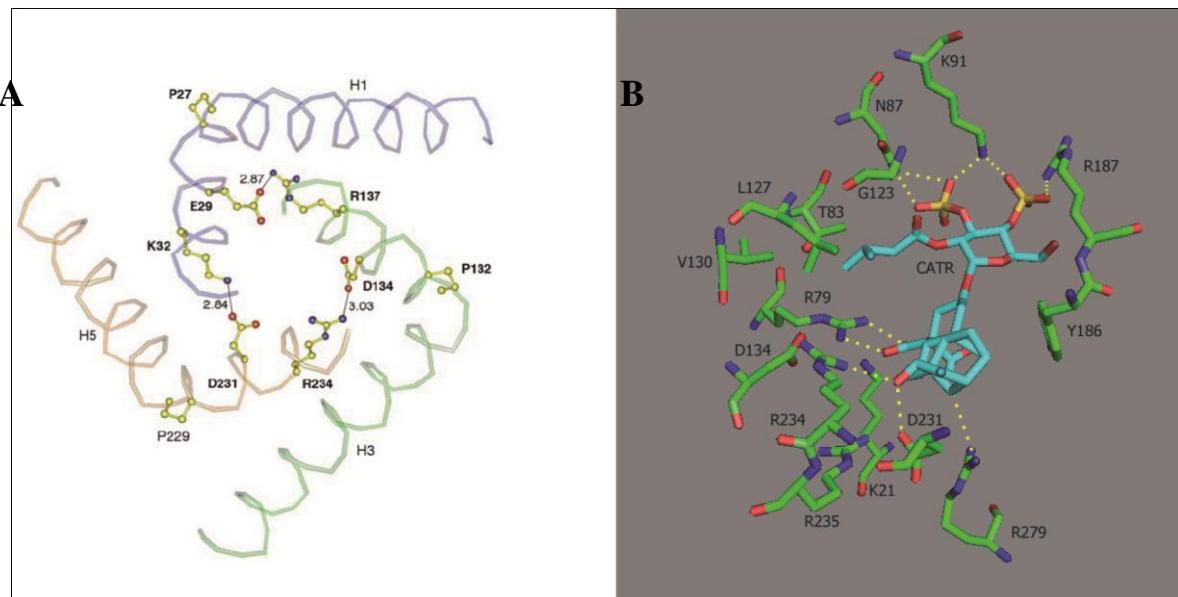
Cependant des résultats récents remettent en cause l'état oligomérique des membres de la MCF. La structure à haute résolution obtenue à partir de cristaux du complexe bAnc1p-CATR met en évidence un monomère unique, sur lequel est fixée une molécule de CATR (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Dans une autre structure du même complexe, ce monomère unique apparaît en contact avec un autre monomère (Nury *et al.*, 2005). Cependant, ce dimère cristallographique semble artéfactuel et va à l'encontre des données précédemment publiées, puisqu'il contient une molécule de CATR par monomère et non par dimère. De plus, les récentes expériences de centrifugation analytique, s'appuyant sur des améliorations des systèmes d'analyse et de traitement des données, remettent en cause les résultats des anciennes expériences et tendent à montrer que le transporteur d'ADP/ATP bovin complexé au CATR serait majoritairement monomérique en solution dans du Triton X100, mais présenterait aussi des formes multimériques (Nury *et al.*, 2008).

### 3.2. Structure du complexe CATR-bAnc1p

La structure à haute résolution obtenue par diffraction des rayons X de cristaux formés par le complexe bAnc1p-CATR montre une protéine essentiellement organisée en hélices  $\alpha$  et présentant une pseudo symétrie d'ordre 3 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Chaque tiers comporte deux hélices transmembranaires fortement inclinées par rapport au plan perpendiculaire à la membrane ainsi qu'une hélice courte, située du côté matriciel, orientée parallèlement à la membrane (figure 7A). Les six hélices membranaires forment une cavité représentant un entonnoir de 20 Å de large et de 30 Å de profondeur dans laquelle est fixé le CATR (figure 7B). Celle-ci est ouverte vers l'espace intermembranaire et fermée du côté matriciel par une barrière polypeptidique de 10 Å d'épaisseur (figure 7C). Le col de la cavité, situé du côté de l'espace intermembranaire, forme un hexagone et le fond, du côté matriciel, est fermé par le resserrement des trois hélices transmembranaires impaires toutes coudées au niveau d'une proline, résidu qui appartient à la signature des transporteurs de la MCF (figure 7A et 7B). Le contact entre les côtés C-terminaux des hélices transmembranaires

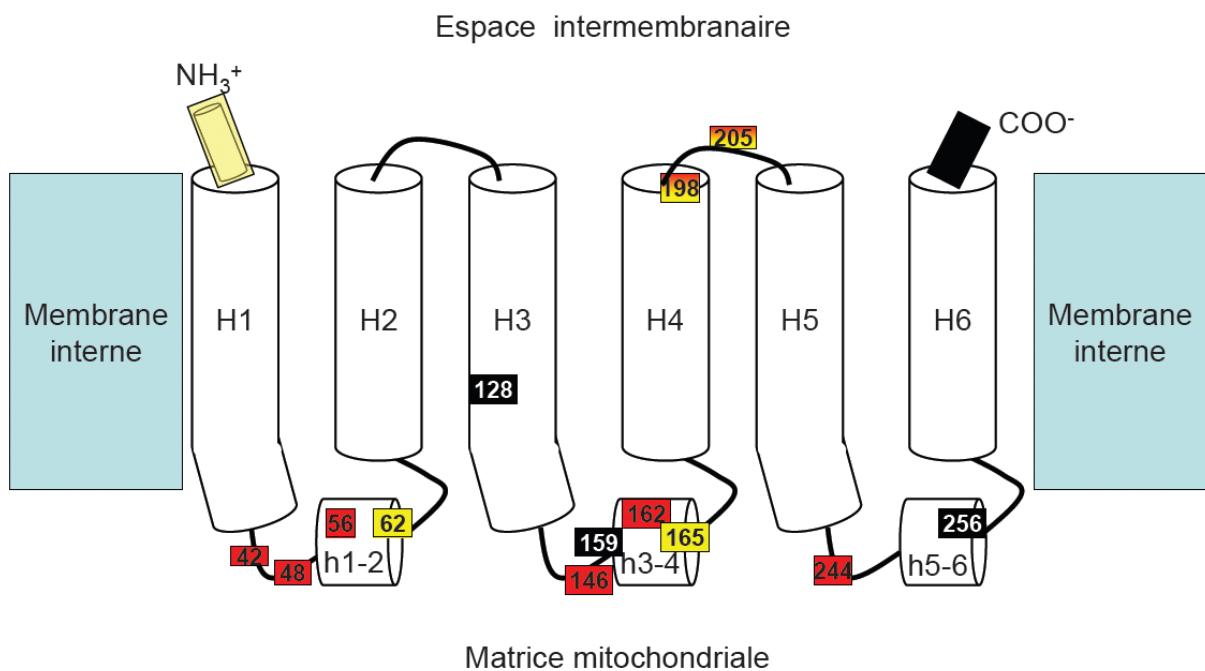


**Figure 7 : Structure 3D du complexe transporteur d'ADP/ATP – CATR.** Diagramme en ruban présentant la protéine vue à travers la membrane (**A**) ou de l'espace intermembranaire complexée avec son inhibiteur (**B**). La structure de la protéine est colorée du bleu (N-terminal) au rouge (C-terminal). (**C**) Vue en coupe de la structure bAnc1p-CATR présentant la séquence RRR contenue uniquement dans la signature des transporteurs d'ADP/ATP mitochondriaux (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).



**Figure 8 : Détails structuraux du complexe bAnc1p-CATR.** **A :** Positionnement des ponts salins dans le complexe bAnc1p-CATR. Les résidus présentés en gras appartiennent à la signature des membres de la MCF, PX(D/E)XX(K/R). Les hélices impaires (H1, H3 et H5) sont les seules représentées sur cette vue (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). **B :** Interaction entre le CATR et bAnc1p. Seul les liaisons H directes (en jaune) et les acides aminés présentant des interactions avec le CATR sont représentés. Le squelette carboné du CATR est représenté en bleu, celui des acides aminés en vert. Les atomes d'oxygène, d'azote et de soufre sont représentés respectivement en rouge, bleu et jaune.

impaires qui ferment la cavité est stabilisé par la présence de trois ponts salins établis entre les chaînes latérales des résidus K32(H1)-D134(H3) ; R137(H3)-D231(H5) ; R234(H5)-E29(H1) (figure 8A). Dans la structure du complexe bAnc1p-CATR, le CATR est fixé au fond de la cavité et du côté de l'hélice H4, ce qui va à l'encontre des propositions localisant le CATR à l'interface entre 2 monomères émises d'après les études par photomarquage (Majima *et al.*, 1993). Il est orienté verticalement, la partie glucosidique vers l'espace intermembranaire et le noyau diterpénoïde vers le fond de la cavité (en direction de la matrice). Sa fixation est stabilisée par des interactions de tous les groupements fonctionnels de la molécule avec la chaîne peptidique, à l'exception de l'alcool primaire porté par le dérivé de glucose (figure 8B). Cette non-implication de la fonction alcool et son faible encombrement stérique explique pourquoi celle-ci est la seule position modifiable par voie chimique qui n'altère pas les propriétés inhibitrices de l'ATR (Vignais, 1976). Cependant, cela n'explique pas pourquoi cette position est difficilement modifiable dans la molécule de CATR. Les autres fonctions portées par le dérivé de glucose, c'est-à-dire les sulfates et la chaîne isovalérienne, participent grandement à l'affinité de la molécule pour le transporteur. Plus précisément, les sulfates portés par les carbones 3 et 4 du glucose interagissent en formant des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales de l'asparagine 87 et de la lysine 91 de l'hélice H2 et de l'arginine 187 de l'hélice H4 (figure 8B). La chaîne isovalérienne en position 2 forme quant à elle des liaisons de type Van der Waals avec différents acides aminés du transporteur, comme la thréonine 83 (H2), la glycine 123, la leucine 127 et la valine 130 (H3), ainsi que l'isoleucine 183 (figure 8B). L'autre partie de l'inhibiteur, c'est à dire le noyau diterpénoïde, est presque parallèle au noyau phénolique de la tyrosine 186 (H4) et interagit par sa fonction hydroxyle avec les résidus aspartate 231 et arginine 234 de l'hélice 5 (figure 8B). Les deux groupements carboxyliques portés par le même carbone ( $C_4$ ) du noyau diterpénoïde sont en interaction directe, ou médiée par une molécule d'eau, avec des lysines ou des arginines. En effet, le groupement carboxylique présent dans le CATR et l'ATR, interagit avec l'arginine 279 portée par l'hélice 6 (figure 8B). L'autre groupement carboxylique, spécifique au CATR, interagit fortement avec l'arginine 79 de l'hélice H2, et forme des liaisons hydrogènes par l'intermédiaire de molécules d'eau avec la lysine 21 de l'hélice 1, l'aspartate 134 de l'hélice 3, et les arginines 234 et 235 de l'hélice 5 (figure 8B). Ces interactions supplémentaires du CATR avec la protéine pourraient expliquer que son affinité pour le transporteur soit 10 fois plus forte que celle de l'ATR.



**Figure 9 : Bilan des données d'accessibilité des différentes zones du transporteur bovin dans les complexes transporteur-CATR ou transporteur-BA.** Les régions et les acides aminés dont l'accessibilité a été étudiée dans les différents complexes sont représentés par des rectangles contenant le numéro de l'acide aminé analysé. Ils sont colorés en jaune et/ou en rouge suivant s'ils sont accessibles dans le complexe bAnc1p-CATR et/ou le complexe bAnc1p-BA. Les régions non marquées dans l'un ou l'autre des complexes sont représentées en noir.

Dans cette structure, le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial est associé de manière étroite à plusieurs molécules de lipides. On peut noter en effet, la présence de 3 cardiolipides par monomère de protéine, répartis de manière symétrique: un par tiers, et situés entre les courtes hélices matricielles. Ce rapport (une protéine pour 3 cardiolipides) est en accord avec la mise en évidences de six molécules de cardiolipides fortement liées par dimère de transporteur (Beyer et Klingenberg, 1985). Ces cardiolipides sont aussi impliqués dans une dimérisation artéfactuelle entre 2 monomères ayant fixé chacun une molécule de CATR, dans une deuxième structure du complexe transporteur-CATR (Nury *et al.*, 2005).

### 3.3. Conclusion

Les études menées sur le transporteur bovin (bAnc1p), débutées depuis plus de 40 ans, ont permis d'apporter des éléments de réponse sur le mécanisme de translocation des nucléotides adényliques et la première structure à haute résolution d'un transporteur mitochondrial de métabolites. La plupart de ces études découlent de l'existence d'inhibiteurs très spécifiques du transporteur d'ADP/ATP (CATR et BA) capables de bloquer celui-ci dans des conformations distinctes dont la réactivité à l'égard de plusieurs molécules chimiques (marqueurs de thiols, substrats ou inhibiteurs photoactivables et/ou fluorescents...) ou de protéines (anticorps, protéases) s'est avérée variable. Ces différences sont le reflet des changements de conformation exposant ou masquant certaines zones du transporteur (figure 9). En résumé, les différences entre les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA mises en évidence jusqu'à maintenant, se situent principalement au niveau de l'extrémité N-terminale et des régions matricielles m1, m2 et m3. La moitié N-terminale des 3 régions matricielles est plus exposée à la matrice dans le complexe BA que dans le complexe CATR, et inversement du côté C-terminal des hélices matricielles 1 et 2. Du côté de l'espace intermembranaire, la boucle 2 du transporteur est accessible dans les deux complexes. Seule la partie N-terminale montre une accessibilité plus importante en présence de CATR. Cette partie de mon introduction illustre parfaitement le manque de données biochimiques et structurales actuellement disponibles au niveau des hélices transmembranaires H1 à H6 pour le complexe bAnc1p-BA.

## 4. Le transporteur d'ADP/ATP de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

L'étude du transporteur d'ADP/ATP a été menée depuis de nombreuses années sur la levure *S. cerevisiae* en s'appuyant sur les possibilités de génie génétique (Lauquin *et al.*, 1976a). La levure *S. cerevisiae* possède 3 isoformes du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial nommées ScAnc1p, ScAnc2p, et ScAnc3p qui présentent des caractéristiques physiologiques différentes.

L'isoforme 1 est codée par le gène *ScANC1* porté par le chromosome XIII de la levure. Il est exprimé faiblement et de manière constitutive en condition aérobie. Il est par contre réprimé en présence d'oxygène (Gavurnikova *et al.*, 1996). La deuxième isoforme est codée par le gène *ScANC2* porté par le chromosome II. Il est fortement exprimé en condition aérobie et en présence d'une source de carbone non fermentescible comme le lactate (Lawson et Douglas, 1988). Il est nécessaire à la croissance des levures sur un milieu non fermentescible et représente donc l'homologue de bAnc1p avec qui il partage 48 % d'identité de séquence (Drgon *et al.*, 1991). De par sa forte expression et son lien avec la production d'énergie lors de la respiration, l'isoforme 2 du transporteur d'ADP/ATP *S. cerevisiae* est la plus étudiée. Enfin, la troisième isoforme est codée par le gène *ScANC3* dont l'expression est réprimée en présence d'oxygène (Kolarov *et al.*, 1990; Sabova *et al.*, 1993). Les trois gènes codent respectivement des transporteurs de 309, 318 et 307 acides aminés. Actuellement, aucune donnée structurale du transporteur d'ADP/ATP de *S. cerevisiae* n'a été obtenue et même si des éléments semblent indiquer des différences notables entre bAnc1p et ScAnc2p, l'organisation spatiale de cette dernière est représentée à l'image de celle du complexe bAnc1p-CATR (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). En combinant la possibilité de réaliser facilement des mutants chez la levure *S. cerevisiae* grâce à l'outil de génie génétique et la faculté des levures à croître en utilisant la fermentation ou la respiration, il a été possible d'étudier au niveau moléculaire, le mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane interne mitochondriale.

### 4.1. Etudes des extrémités N- et C-terminales du transporteur d'ADP/ATP de levure

L'expression hétérologue des protéines bovine (bAnc1p) et humaine (hAnc1p) a été réalisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hashimoto *et al.*, 1999; Hatanaka *et al.*, 2001c ; De Marco *et al.*, 2002). Les résultats obtenus ont montré que même si ces transporteurs étaient importés dans la mitochondrie de levure dépourvue de ses 3 isoformes du transporteur (souche JL 1-3), leur faible quantité ne permettait pas de restaurer sur milieu non fermentescible une croissance satisfaisante

des souches transgéniques. Afin d'améliorer l'expression et l'import de ces transporteurs animaux dans les mitochondries de levure, l'extrémité N-terminale de ScAnc2p a été fusionnée à bAnc1p et hAnc1p *via* leurs régions N-terminales respectives (Hashimoto *et al.*, 1999; Hatanaka *et al.*, 2001a; Hatanaka *et al.*, 2001c). Ces études ont montré que ces chimères étaient capables de restaurer la croissance d'une souche de levure dépourvue d'autres Ancp, mettant en évidence un rôle de la région N-terminale de ScAnc2p dans l'import de ces protéines. Une autre étude s'est attachée à analyser l'accessibilité au solvant de cette région de ScAnc2p par marquage à l'EMA d'un mutant mono-cystéine en position 21, équivalente à la sérine 1 de bAnc1p. Les résultats obtenus n'ont pas montré de différences d'accessibilité de cette région dans les différents complexes, à l'inverse de ceux obtenus pour bAnc1p (Hatanaka *et al.*, 2001b). Un autre mutant mono-cystéine, en position 312, analysé dans cette même étude, n'a été marqué par l'EMA que dans le complexe ScAnc2p-BA. Ce résultat met en évidence un changement conformationnel de la région C-terminale de ScAnc2p dans les différents complexes. Ces données complètent celles obtenues par photomarquage de ScAnc2p à l'aide d'un dérivé photoactivable d'ADP non transporté, le 2-azido-3'-O-naphtoyl-[ $\beta$ -<sup>32</sup>P]-ADP (Dianoux *et al.*, 2000). En effet, cette étude a mis en évidence à l'aide de ce composé que la région C-terminale de ScAnc2p (de l'acide aminé I311 à l'extrémité C-terminale de la protéine) était capable de lier les nucléotides, suggérant une fonction dans le mécanisme de transport. Deux autres études plus récentes ont confirmé et complété ces résultats grâce à l'analyse phénotypique, biochimique et conformationnelle de plusieurs mutants de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p (Clémenton *et al.*, 2008; Iwahashi *et al.*, 2008). Tout d'abord, la délétion un à un des acides aminés C-terminaux de ScAnc2p a permis de mettre en évidence que l'absence des 6 acides aminés C-terminaux n'était pas critique pour la croissance. Cependant la délétion d'un acide aminé supplémentaire altère fortement la croissance des souches de levures sur milieu non fermentescible sans pour autant modifier la quantité de protéine importée dans les mitochondries. Ces résultats confirment donc l'implication de cette région dans le mécanisme de transport (Iwahashi *et al.*, 2008).

Afin d'étudier en détail le rôle de cette région, une analyse par « cystéine-scanning » a été réalisée sur les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA (Iwahashi *et al.*, 2008). Cette technique consiste à remplacer un à un par génie génétique les acides aminés d'une région protéique par des cystéines. L'accessibilité de ces résidus est ensuite analysée à l'aide de réactifs pénétrant plus ou moins les membranes et spécifiques de la fonction thiol. Cette étude a montré que l'extrémité C-terminale de ScAnc2p, jusqu'à l'acide aminé M310, était accessible à l'EMA dans les deux complexes. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus précédemment par la même méthode et mettent en évidence un manque de fiabilité dans la quantification du marquage par fluorescence de l'EMA

et/ou de la protéine par Western-blot. Ils remettent donc fortement en cause cette partie des résultats (Iwahashi *et al.*, 2008). La seconde étude, menée sur l'extrémité C-terminale de ScAnc2p, a été réalisée par une analyse comparative de ScAnc2p et d'un mutant de ScAnc2p dépourvu des 8 acides aminés C-terminaux, ScAnc2p-Δ8Cter (Clémenton *et al.*, 2008). Les deux souches présentent autant de sites de fixation de l'<sup>3</sup>H]-ATR, ce qui suggère une quantité identique de transporteur importé dans les mitochondries. Par contre, la mesure de leurs temps de génération a montré que leurs vitesses de croissances sur un milieu non fermentescible étaient très différentes : 2,5 et 16 heures respectivement pour ScAnc2p et ScAnc2p-Δ8Cter (Clémenton *et al.*, 2008). Cette étude a donc confirmé que la délétion des 8 acides aminés N-terminaux de ScAnc2p induisait une déficience du mécanisme de transport et non un problème d'import de la protéine mutante. L'étude de la fixation de [<sup>14</sup>C]-ADP sur ScAnc2p ou ScAnc2p-Δ8Cter au sein des mitochondries a mis en évidence que ces deux souches présentaient un nombre similaire de sites ADP. L'ensemble de ces résultats montre ainsi que l'extrémité C-terminale de ScAnc2p ne correspond donc pas à proprement parler à un des sites de fixation des nucléotides prédit par les données de photomarquage (Dianoux *et al.*, 2000; Clémenton *et al.*, 2008). Cependant, les constantes de dissociation des complexes ScAnc2p-[<sup>14</sup>C]ADP et ScAnc2p-Δ8Cter-[<sup>14</sup>C]ADP présentent des différences importantes. En effet, les données obtenues sur ScAnc2p montrent une coopérativité négative entre deux classes distinctes de sites de fixation de l'ADP et sont conformes aux données établies précédemment avec bAnc1p, alors que celles obtenues sur ScAnc2p-Δ8Cter ne présentent qu'une seule classe de sites de fixation des nucléotides (Block et Vignais, 1984; Clémenton *et al.*, 2008). En conclusion, la partie C-terminale de ScAnc2p ne serait pas un site de fixation des nucléotides à part entière, mais participerait au mécanisme de transport en permettant le passage d'un site de haute affinité à un site de faible affinité.

#### 4.2. Etude topographique des régions transmembranaires de ScAnc2p

Le second segment transmembranaire putatif de ScAnc2p, déduit de la structure du complexe bAnc1p-CATR, a été étudié par « cystéine-scanning » (Hatanaka *et al.*, 2001b; Kihira *et al.*, 2004; Kihira *et al.*, 2005). La seconde étude a permis de mettre en évidence une rotation d'environ 120° de l'hélice transmembranaire 2 induite par la fixation du CATR ou du BA, exposant tour à tour au réactif les résidus 100, 101 et 104, 105 (CATR) et 100, 103 et 106 (BA) (Kihira *et al.*, 2004). La seconde étude, réalisée grâce à un réactif non pénétrant, l'EMA, a cherché des différences d'accessibilité au niveau du coude c1 et de la région C-terminale de cette hélice (Kihira *et al.*, 2005). Les résultats obtenus montrent que cette région, comprise entre les acides aminés 108 et 115,

est plus ou moins accessible en fonction des inhibiteurs et qu'elle présente un marquage plus important dans le complexe ScAnc2-CATR que dans le complexe ScAnc2p-BA. Un modèle dans lequel un enfouissement de cette zone dans la membrane mitochondriale, la rendant moins accessible à l'EMA, a été proposé pour le complexe ScAnc2p-BA (Kihira *et al.*, 2005).

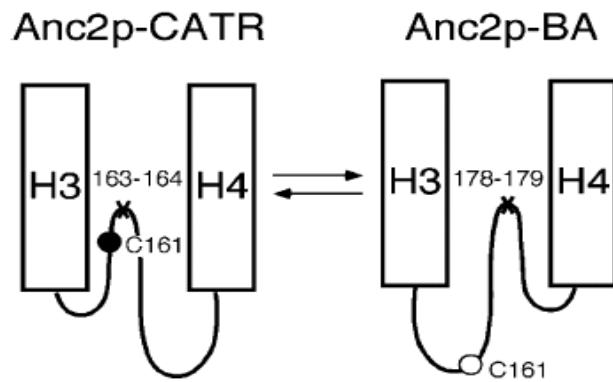
Une étude similaire a permis de montrer que l'extrémité N-terminale de l'hélice H5 (des acides aminés 223 à 230) était plus accessible dans le complexe ScAnc2p-CATR que dans le complexe ScAnc2p-BA (Iwahashi *et al.*, 2006). Cette région exposée du côté de l'espace intermembranaire semble donc subir des changements conformationnels similaires à ceux de la région de l'hélice H2 situé du même côté de la membrane.

#### 4.3. Exploration des boucles cytosoliques de ScAnc2p

L'accessibilité des boucles cytosoliques au sein des complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA a également été analysée par « cystéine-scanning » (Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006). Les résultats obtenus sur les boucles cytosoliques 1 et 2 (comprises respectivement entre les acides aminés 116-127 et 216-228) montrent que cette région est accessible à l'EMA quel que soit l'inhibiteur utilisé (Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données montrent que les différences conformationnelles observées pour les hélices H2 et H5, localisées du côté de l'espace intermembranaire, ne semblent pas se répercuter directement sur les boucles cytosoliques associées, quel que soit l'inhibiteur testé.

#### 4.4. Etude topographique des boucles matricielles m1, m2, m3 de ScAnc2p

La topographie des boucles matricielles (m1, m2 et m3) a également été étudiée chez la levure. La boucle m1 contient une cystéine en position 73 (équivalente à la cystéine 56 de bAnc1p). Le marquage de cette cystéine par l'EMA montre une accessibilité de ce résidu dans le complexe ScAnc2p-BA et un masquage dans le complexe ScAnc2p-CATR. Ce résultat indique une conformation différente de cette région dans les deux complexes, confirmant les données obtenues avec bAnc1p (Hatanaka *et al.*, 2001b).



**Figure 10: Modèle représentant le changement de conformation de la boucle m2 de ScAnc2p en complexe avec le CATR ou le BA (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005).** La croix représente le site de protéolyse par la trypsine. Le cercle représente la position d'une cystéine exogène marquée (en noir) ou pas (en blanc) par un réactif non pénétrant, l'EMA.

Le marquage photochimique de ScAnc2p à l'aide de dérivés d'ATP photoactivables (le 2-azido-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP et le 8-azido-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP) a permis l'identification d'une zone unique de fixation de l'ATP, localisée entre les résidus 172 et 210 (Mayinger *et al.*, 1989). Ce peptide débute dans la région N-terminale de la boucle matricielle 2 et se termine dans l'extrémité C-terminale de l'hélice transmembranaire 4, par référence à la structure de bAnc1p-CATR. Ce résultat a mis en évidence dans ScAnc2p la présence d'un site photomarqué, localisé dans une région équivalente à l'une de celles identifiées dans bAnc1p à l'aide du 2-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ADP. Ces résultats confirment le rôle de cette région dans le mécanisme de transport (Dalbon *et al.*, 1988; Mayinger *et al.*, 1989). Une seconde étude utilisant un nouveau dérivé photoactivable, le 2-azido-3'-O-naphtoyl-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ADP, a par contre mis en évidence deux sites photomarqués, l'un dans la région C-terminale de ScAnc2p, et l'autre localisé entre la boucle matricielle m2 et le début de l'hélice H4 (acides aminés 182 à 190), affinant les résultats obtenus précédemment (Mayinger *et al.*, 1989; Dianoux *et al.*, 2000). Cependant, même si un second site a été mis en évidence dans cette étude, sa localisation diffère de celle identifiée pour bAnc1p (voir Introduction, 3.1.3). En effet, le deuxième site photomarqué dans bAnc1p est localisé sur la boucle m3 et sur l'hélice H6 du côté matriciel alors que celui de ScAnc2p se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine, c'est-à-dire dans l'espace intermembranaire. Les données de photomarquage des protéines ScAnc2p et bAnc1p semblent donc concorder au niveau du nombre de sites mis en évidence mais des différences dans leur localisation sont relevées. Plus récemment, une étude comparative de la topologie de la boucle matricielle m2 dans les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA a été réalisée par protéolyse ménagée à la trypsine et par marquage d'un résidu cystéine exogène en position 161 (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). Dans les deux complexes, cette boucle est sensible à l'action de la trypsine sur des mitochondries fraîchement purifiées, montrant une exposition de cette région du côté de l'espace intermembranaire (figure 10). Ces résultats ne sont pas en accord avec la structure du complexe bAnc1p-CATR, dans laquelle la boucle m2 est située du côté matriciel, symétriquement aux boucles m1 et m3 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). L'analyse comparative des sites de coupure au sein de chaque complexe a montré qu'ils étaient distants l'un de l'autre de 15 acides aminés et situés entre les acides aminés 163-164 pour le complexe ScAnc2p-CATR et 178-179 pour ScAnc2p-BA (figure 10). Le marquage à l'EMA de la cystéine 161 dans des mitochondries fraîchement isolées n'a été possible que dans le complexe ScAnc2p-CATR. La protection de ce résidu dans le complexe ScAnc2p-BA suggère donc une exposition matricielle de cette région dans ce complexe (figure 10). L'ensemble de ces résultats illustrent un mouvement de balancier de cette région permettant de passer d'une conformation à une autre mimant le mécanisme de transport (figure 10).

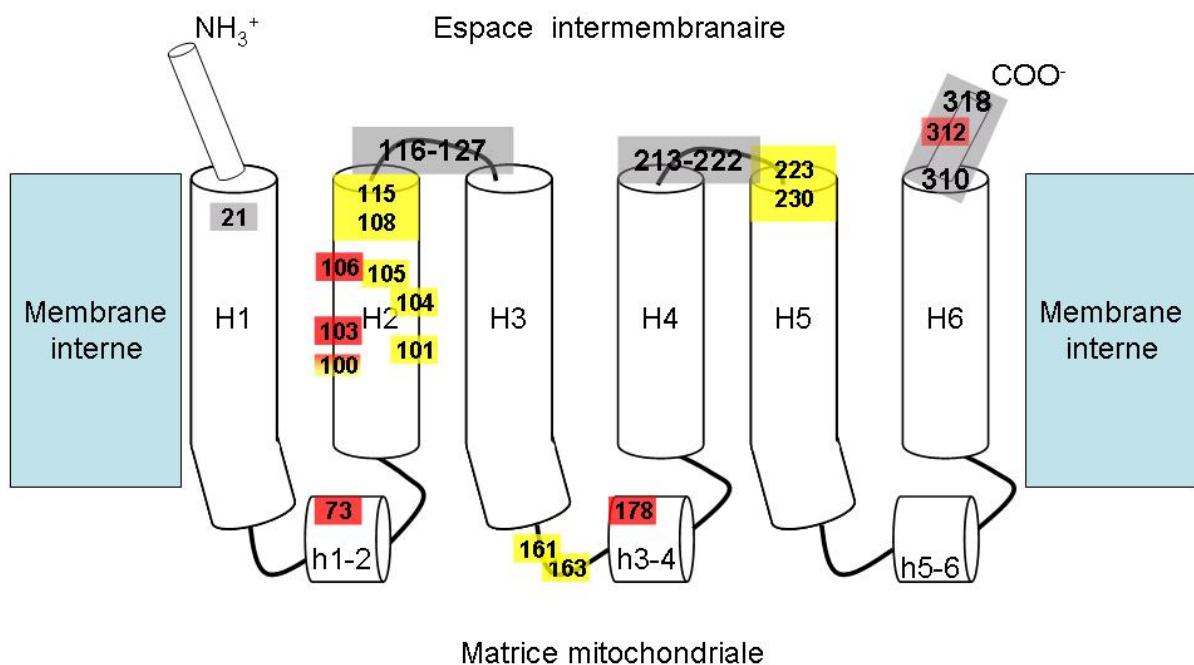
#### 4.5. Les différences conformationnelles des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p

L'étude biochimique des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p a montré que ces protéines partagent de grandes similitudes, et suggère que ScAnc2p présente une structure 3D proche de celle de bAnc1p (Boulay et Vignais, 1984; Brandolin *et al.*, 1989; Hatanaka *et al.*, 2001b; Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006; Clémenton *et al.*, 2008; Iwahashi *et al.*, 2008). Cependant des différences importantes sont également notées et incompatibles avec la structure 3D de bAnc1p-CATR. Ceci vient d'être exposé pour le cas de la boucle m2. De plus, les données d'accessibilité des extrémités N- et C-terminales des deux protéines bAnc1p et ScAnc2p en complexe avec les inhibiteurs sont elles aussi en contradiction. En effet, l'extrémité N-terminale de bAnc1p présente des accessibilités différentes en fonction de l'inhibiteur testé, contrairement à ScAnc2p (Brandolin *et al.*, 1989; Hatanaka *et al.*, 2001b).

#### 4.6. Résumé des variations d'accessibilité des régions de ScAnc2p en fonction des inhibiteurs.

Les différences conformationnelles existant entre les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2-BA concernent plusieurs régions de la protéine probablement impliquées dans le mécanisme de transport des nucléotides. Si les différentes études ont montré que les boucles cytosoliques étaient peu modifiées dans les différents complexes, la partie des hélices H2 et H5, exposée dans l'espace intermembranaire est par contre plus accessible dans le complexe ScAnc2p-CATR (Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006). De plus, nous pouvons noter que l'hélice H2 expose des résidus de manière alternée dans les différents complexes, suggérant une rotation de cette structure (figure 11; Kihira *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les boucles matricielles montrent elles aussi des accessibilités différentes dans les complexes CATR ou BA. La cystéine 73 est seulement accessible dans le complexe BA tout comme la liaison 178-179 de la boucle m2 (figure 11; Hatanaka *et al.*, 2001b; Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). A l'inverse, le coude présent entre l'hélice H3 et la boucle matricielle m2 n'est accessible que dans le complexe CATR.



**Figure 11: Données d'accessibilité des différentes zones du transporteur de levure en fonction des inhibiteurs présents (CATR et BA).** Les régions et les acides aminés dont l'accessibilité a été étudiée dans les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA sont représentés par des rectangles contenant le numéro de l'acide aminé analysé. Ils sont colorés en jaune ou en rouge suivant s'ils sont accessibles dans le complexe ScAnc2p-CATR ou ScAnc2p-BA. Les régions accessibles dans les deux complexes sont représentées en gris.

#### 4.7. Etudes des mutations pathogènes de hANC1 chez *S. cerevisiae*.

En dehors des analyses structurales réalisées sur ScAnc2p à l'aide de différentes approches, *S. cerevisiae* a été utilisée comme modèle d'étude du transporteur d'ADP/ATP humain et plus particulièrement des mutations identifiées chez des patients atteints d'adPEO ou de cardiomyopathies. Chez l'homme, 4 gènes, nommés hANC1 à hANC4, codent respectivement les isoformes hAnc1p à hAnc4p qui sont exprimées avec spécificité tissulaire. L'isoforme 1 (hAnc1p) est spécifique du cœur, des muscles squelettiques, du cerveau et des organes à faible régénération mitotique. La deuxième isoforme (hAnc2p) est faiblement exprimée dans tout l'organisme. La troisième (hAnc3p) est fortement exprimée dans les cellules en croissance où la demande énergétique est forte, comme les reins, le foie, la rate mais aussi dans les cellules cancéreuses (Stepien *et al.*, 1992; Chevrollier *et al.*, 2005). Enfin, la quatrième isoforme (hAnc4p) a été identifiée à partir d'une collection de séquences et ce transcrit a été localisé dans les testicules, le foie et le cerveau (Dolce *et al.*, 2005). L'implication directe de mutants de hAnc1p a été décrite dans 5 cas d'ophtalmoplégies, un sporadique (V291M) et 4 familiaux (A90D, A114P, L98P, D104G), et un cas de cardiomyopathie (A123D). Cependant, l'étude des mutations de hANC1 causant des pathologies humaines est compromise dans des lignées cellulaires humaines pour plusieurs raisons. Premièrement, les cultures de cellules provenant des patients atteints d'adPEO ne présentent aucun phénotype caractéristique. Deuxièmement, hANC1 est réprimé dans toutes les cultures hormis dans les myoblastes (Kaukonen *et al.*, 2000). Troisièmement, la surexpression de hANC1 induit l'apoptose des cellules en culture (Bauer *et al.*, 1999). Ce dernier point est cependant remis en cause par une étude récente (Walter *et al.*, 2007). C'est donc en tirant parti des nombreux avantages de la levure que des travaux ont pu être réalisés afin d'étudier certaines de ces mutations. L'expression du gène hANC1 sauvage a tout d'abord permis de restaurer la croissance de levures dépourvues de transporteur d'ADP/ATP sur une source de carbone non fermentescible. Cependant, la faible quantité de transporteur hAnc1p importée dans les mitochondries de levures s'est avérée problématique pour aborder une caractérisation biochimique complète de ce transporteur. L'étude de deux mutations pathogènes du transporteur hAnc1p (A114P et V289M) a été menée chez la levure, mais ces transporteurs n'ont pas pu être caractérisés biochimiquement à cause d'un problème d'import de ces protéines (De Marcos Lousa *et al.*, 2002). En utilisant comme base de travail l'alignement des séquences de ScAnc2p et hAnc1p, les mutations de hANC1 entraînant des pathologies ont été introduites chez ScANC2 à des positions équivalentes (Kaukonen *et al.*, 2000; Chen, 2002; De Marcos Lousa *et al.*, 2002; Fontanesi *et al.*, 2004; De Marcos Lousa *et al.*, 2005; Palmieri *et al.*, 2005; Lodi *et al.*, 2006). Les résultats obtenus lors de ces différentes études ont été

très hétérogènes. En effet, certaines mutations (comme S303M) ont été décrite comme entraînant soit une perte total soit une faible modification du transport. Il est donc difficile de déterminer l'effet de ces mutations sur les propriétés de ces transporteurs.

Au vu des résultats obtenus au cours de ces études, le transporteur ScAnc2p ne semble pas être un bon modèle pour étudier ces mutations. En gardant comme organisme modèle la levure afin de tirer parti des possibilités d'alternance entre un métabolisme fermentaire et respiratoire, des transporteurs plus proches du transporteur humain sont en cours d'investigation (pour revue : Trézéguet *et al.*, 2008).

## 5. L'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse pour l'analyse de la dynamique des protéines

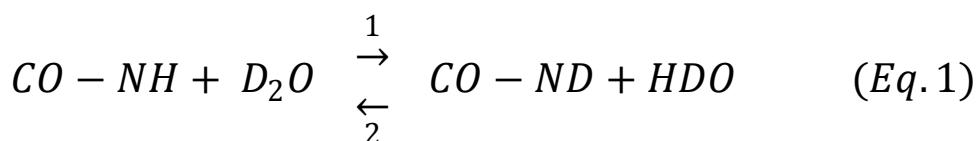
La compréhension poussée des mécanismes moléculaires du vivant fait appel à un grand nombre de techniques plus ou moins faciles à mettre en œuvre. Beaucoup de ces techniques ont été utilisées dans l'étude du mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP, allant des plus simples comme le SDS-PAGE à d'autres, beaucoup plus compliquées, comme la diffraction des rayons X. Afin de comprendre toujours mieux les phénomènes biologiques, le développement de nouvelles techniques est nécessaire et fournit de nouveaux moyens d'études.

Différentes techniques, utilisées depuis plusieurs décennies dans le cadre d'études biophysiques de protéines, font appel à un marquage réversible des protéines par des atomes de deutérium. C'est le cas de la spectrométrie infrarouge, ou de la spectroscopie RMN (pour revue : Dyson et Wright, 2004). Son utilisation en spectrométrie de masse est quant à elle beaucoup plus récente. En effet, les premières applications d'un marquage de protéines par échange hydrogène/deutérium couplé à une analyse en spectrométrie de masse sont apparues immédiatement après la mise au point de la source electrospray dans le cadre de l'étude des molécules biologiques, et datent du début des années 90 (Chowdhury *et al.*, 1990; Katta et Chait, 1991; Zhang et Smith, 1993). Depuis, le développement de cette méthode est en progression constante. Ainsi, l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (DXMS) est en train de devenir un outil de plus en plus performant pour étudier la dynamique conformationnelle des protéines, leur repliement ou leurs interactions avec des partenaires, protéiques ou non. Cette méthode est basée sur la labilité des hydrogènes des liaisons peptidiques qui vont pouvoir être remplacés par des deutériums après dilution de la protéine dans un milieu deutéré (comme le D<sub>2</sub>O). Ce marquage non invasif, ne déstructurant pas les protéines, peut donc être utilisé pour mettre en évidence des changements de conformation. La vitesse

d'incorporation des deutériums, ainsi que leurs localisations dans la protéine, peuvent être suivies en analysant avec précision la masse des différents peptides issus de la protéolyse de la protéine d'intérêt (pour revue : Wales et Engen, 2006). La comparaison des vitesses d'échange d'une zone protéique dans des conditions différentes rend compte d'une augmentation ou diminution de l'exposition au solvant de la zone observée et renseigne sur les changements conformationnels de la protéine (pour revue : Wales et Engen, 2006).

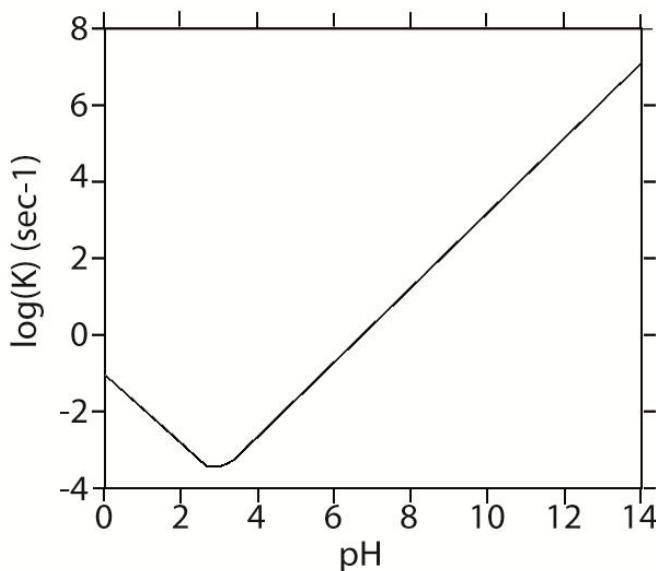
### 5.1. L'échange hydrogène/deutérium

Les hydrogènes portés par les protéines peuvent être regroupés en trois grandes classes, en fonction de leur vitesse relative d'échange : ceux qui ne s'échangent pas, ceux qui s'échangent trop vite et ceux dont la vitesse est comprise entre quelques secondes et plusieurs mois. Les premiers, portés par les carbones des acides aminés, ne s'échangent pas et ne peuvent donc pas être concernés par cette technique. Les seconds sont les hydrogènes portés par les hétéroatomes des chaînes latérales des acides aminés. Leur échange est extrêmement rapide et le marquage ne pourra pas être conservé durant la phase d'analyse. Les seuls hydrogènes ayant une vitesse d'échange compatible avec la technique sont ceux portés par les liaisons peptidiques. Leur vitesse d'échange est extrêmement variable et dépend de nombreux paramètres, comme le pH, la température, la structure secondaire de la zone, l'implication de l'hydrogène dans une liaison H, l'accessibilité de la zone au solvant (pour revue : Wales et Engen, 2006).

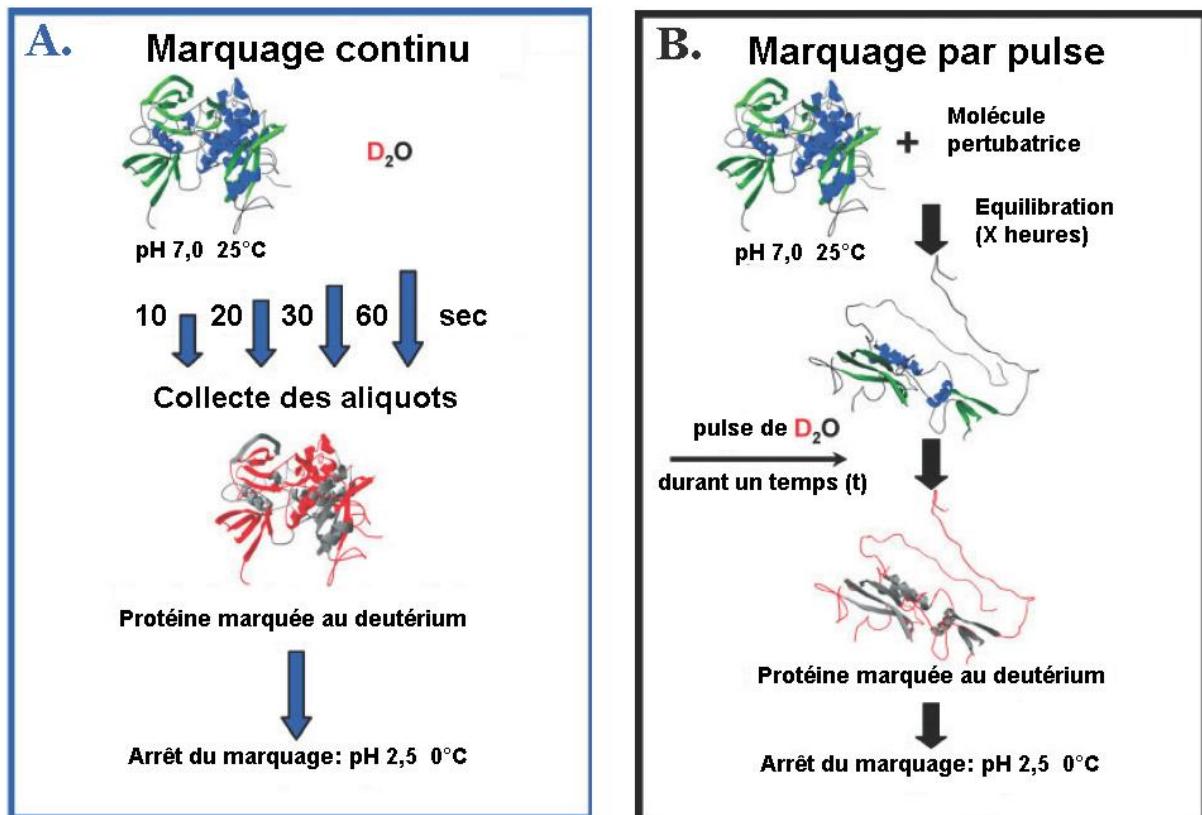


Parmi tous les paramètres influençant la vitesse d'échange, un intérêt tout particulier est porté au pH et à la température. En effet, il a été montré que la vitesse d'échange des hydrogènes des liaisons peptidiques d'une chaîne de poly-alanine variait d'un facteur dix pour chaque unité de pH (figure 12) et d'un facteur trois tous les dix degrés Celsius (Bai *et al.*, 1993).

Pour ces raisons, le marquage, une fois réalisé dans les conditions adéquates au maintien de la structure de la protéine étudiée, sera arrêté en amenant le pH entre 2 et 3 et en congelant l'échantillon jusqu'à son analyse en spectrométrie de masse.



**Figure 12: Vitesse d'échange H/D d'une chaîne de poly-alanine.** Vitesse d'échange d'une chaîne de Poly-L-Alanine à 5°C dans 0,5 M KCl. La zone de moindre échange est comprise entre pH=2,5 et 3 (Bai *et al.*, 1993).



**Figure 13: Schéma de marquage d'une protéine par échange H/D.** A. Méthode de marquage continu. B. Méthode de marquage par pulse de  $D_2O$ . (Wales et Engen, 2006).

## 5.2. Marquage des protéines au deutérium

Le marquage des protéines par du deutérium est un processus assez simple. En effet, la méthode la plus courante est la dilution d'une solution de protéine protonée dans un milieu deutéré (figure 13A). Typiquement, une dilution de 15 à 20 fois de la solution de protéine dans le milieu deutéré permet d'obtenir un milieu réactionnel contenant plus de 90 % D<sub>2</sub>O. Ceci permet de favoriser la réaction d'échange dans le sens du marquage de la protéine (équation 1, sens 1).

Une fois la dilution réalisée, des aliquotes vont être prélevées à différents intervalles de temps et la réaction de marquage par échange arrêtée en abaissant le pH au point d'échange le plus lent (pH compris entre 2,5 et 3) et en congelant l'échantillon dans de l'azote liquide (figure 13, étape d'arrêt du marquage ; Wales et Engen, 2006).

Une alternative au marquage continu permettant de traiter plus de conditions simultanément est aussi fréquemment employée (figure 13B). Elle consiste à diluer la protéine d'intérêt dans le milieu deutéré pendant un temps fixe pour chaque condition, puis à arrêter la réaction de marquage de la même manière que précédemment. L'utilisation de cette technique peut aussi passer par l'emploi d'un système « quench-flow » et d'une automatisation de plus en plus avancée, rendant le marquage plus reproductible et simple à mettre en œuvre (Yang et Smith, 1997).

## 5.3. Le problème du ré-échange des atomes de deutérium.

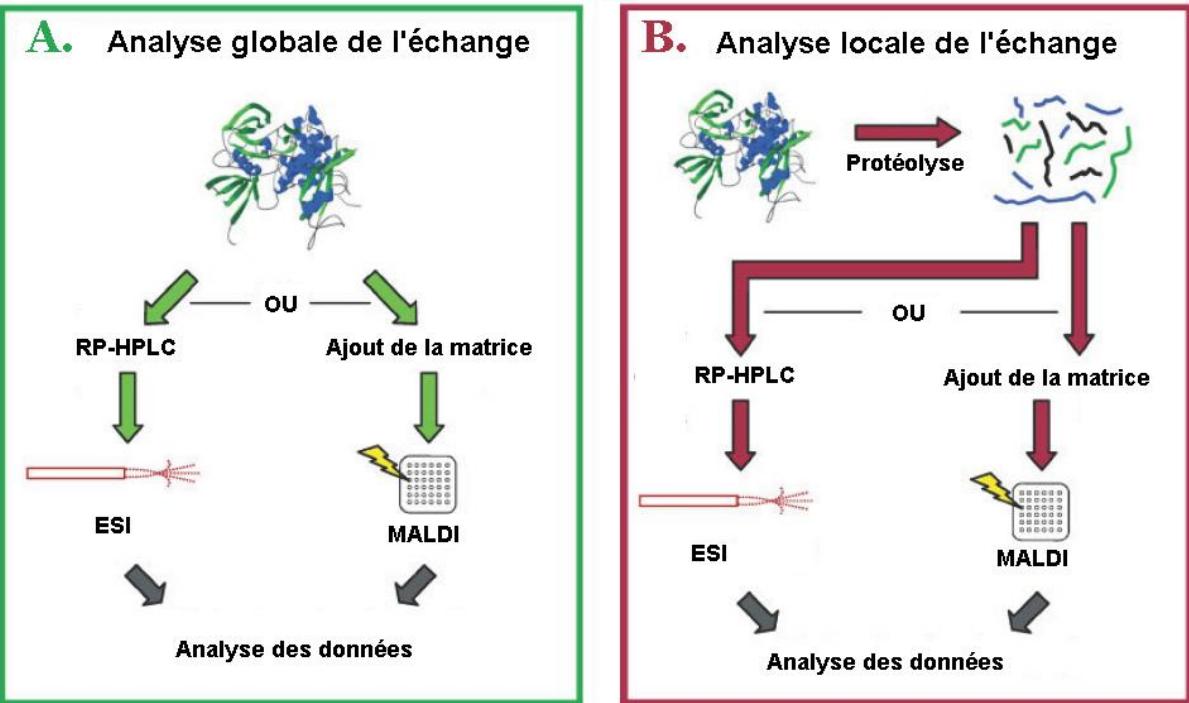
Comme la deutération est réalisée par échange, une perte d'informations liée au contre-échange des deutériums par des hydrogènes présents dans les solvants utilisés pour l'analyse peut avoir lieu. Afin de minimiser au maximum cette perte, les étapes suivantes de l'analyse doivent être aussi rapides que possible et doivent se dérouler aux conditions de pH et de température les plus défavorables à l'échange des protons, c'est-à-dire en milieu acide (pH 2,5-3) et à basse température (0°C). Dans de bonnes conditions, le contre-échange cause une perte de 1 à 3 % de l'information lors de l'analyse de la protéine entière, et de 10 à 20 % si on réalise une protéolyse puis une séparation par HPLC des peptides libérés. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour essayer de corriger la perte d'information. L'une d'entre elles suggère de comparer la deutération d'un peptide à la deutération maximale du même peptide, toutes deux obtenues dans des conditions similaires d'analyse (Zhang et Smith, 1993). Ceci est possible à deux conditions. D'une part, il faut obtenir une protéine entièrement deutérée, et d'autre part il faut que la perte de deutération ne soit pas influencée par la quantité de deutérium incorporé. Dans ces conditions on peut appliquer l'équation 2 et obtenir le taux de deutération corrigé du contre-échange.

$$D = 100 * \frac{M - M_H}{M_D - M_H} \quad (eq.2)$$

**Equation 2: Equation de correction du contre-échange (Zhang et Smith, 1993).** D représente le taux de deutérium incorporé une fois corrigé (en %); M, la masse moyenne observée, M<sub>H</sub> la masse moyenne hydrogénée, M<sub>D</sub> la masse moyenne totalement deutérée observée.

L'obtention d'une protéine totalement deutérée est un point fondamental de la correction. Mais toutes les protéines ne supportent pas les méthodes employées pour réaliser une deutération poussée et complète sur toute la séquence. Ces méthodes consistent par exemple à effectuer des cycles de dilution/concentration dans un tampon deutéré en présence d'agents dénaturants, ou à lyophiliser plusieurs fois la protéine après resuspension dans un milieu deutéré. De plus, et même si la protéine supporte la dénaturation ou la lyophilisation, il est très difficile d'être sûr que 100 % des liaisons soient deutérées (pour revue : Wales et Engen, 2006).

Cependant, l'utilisation de données corrigées n'est importante que si l'on souhaite obtenir le nombre exact de deutériums incorporés. Dans la plupart des cas, l'étude est menée en comparant l'accessibilité d'une même zone (même séquence) dans différentes conditions. Dans ce protocole, la correction du contre-échange n'est pas nécessaire, puisqu'elle affecte de la même manière la même séquence dans les différentes conditions (pour revue : Wales et Engen, 2006).



**Figure 14:** Schéma de l'analyse d'une protéine par spectrométrie de masse après échange H/D. **A.** Schéma de la méthode d'analyse fine par spectrométrie de masse du taux de deutérium incorporé dans une protéine après échange H/D. **B.** Schéma de la méthode d'analyse globale par spectrométrie de masse du taux de deutérium incorporé dans une protéine après échange H/D (Wales et Engen, 2006).

#### 5.4. Analyse par spectrométrie de masse de la protéine marquée

Une fois le deutérium incorporé dans la protéine repliée, celle-ci doit être analysée par spectrométrie de masse afin de pouvoir mesurer le plus précisément possible le gain de masse induit par l'addition de deutériums. L'analyse peut être conduite dans deux optiques différentes selon le but recherché, à savoir rapide et globale, ou plus longue et plus précise (respectivement figure 14A et 14B).

La première technique permet une mise en évidence de la différence globale d'accessibilité des liaisons amides de la protéine et rend compte de l'exposition moyenne de la protéine au solvant. En effet, plus la surface en interaction avec le milieu extérieur est importante, plus la protéine est globalement deutérée. Cette méthode permet en outre un criblage rapide des partenaires interagissant avec une protéine donnée, pour peu que ceux-ci influent suffisamment sur la structure de cette protéine.

L'autre méthode est beaucoup plus précise, et peut pour certaines zones de la protéine apporter des informations fines quand à l'accessibilité d'une liaison amide au solvant. Pour atteindre la meilleure résolution spatiale possible, la protéine, une fois deutérée, va devoir être clivée en un maximum de peptides courts (5-10 acides aminés) et chevauchants (Zhang et Smith, 1993). Des peptides présentant une extrémité commune vont permettre d'affiner l'analyse de la deutération en retranchant la masse deutérée d'un petit peptide à celle d'un plus grand (Garcia *et al.*, 2004). Du fait des risques de contre-échange lors de l'étape de digestion, celle-ci doit être la plus courte possible et s'effectuer en milieu acide. Généralement, une protéolyse par la pepsine de 1 à 2 min à 0°C donne de bons résultats, mais il existe néanmoins plusieurs problèmes à résoudre. En effet, l'utilisation de protéases acides imposée par les conditions d'échange minimum génère des fragments peptidiques imprévisibles du fait de la non-spécificité des protéases de ce type. Ceci ajoute donc une étape d'identification des produits de protéolyse, préalable à l'analyse du taux de deutération des peptides, étape qui est classiquement réalisée à l'aide des techniques de spectrométrie de masse en tandem. Néanmoins, et pour des conditions expérimentales rigoureusement fixées (milieu, concentration de protéine et de protéases), la protéolyse s'opère en général de manière très reproductible. De plus, et c'est tout particulièrement vrai pour de grosses protéines (>30-40 kDa), l'utilisation de la pepsine peut générer des peptides de plus de 15 acides aminés de longueur ou laisser une ou plusieurs parties de la protéine intactes, altérant alors la précision des informations obtenues. Pour augmenter le nombre de peptides différents générés et donc la précision des données collectées, plusieurs améliorations ont été apportées à l'étape de protéolyse. Premièrement, une palette de protéases « acides » utilisées en association ou séparément permet d'améliorer la

résolution en produisant de nouveaux peptides chevauchants, plus courts ou issus d'une région laissée intacte par la pepsine (Cravello *et al.*, 2003; Man *et al.*, 2007). Deuxièmement l'emploi d'agents chaotropiques durant l'étape de protéolyse ainsi que l'utilisation de protéases couplées à une phase solide permet de fournir de nouvelles conditions de protéolyse susceptibles d'améliorer la résolution spatiale de la méthode (Rey *et al.*, 2009).

Une fois la protéine deutérée et les différents peptides générés par la protéolyse, il faut séparer les peptides afin de pouvoir en analyser le plus grand nombre. Cette séparation s'effectue le plus souvent par une chromatographie liquide en phase inverse (LC) après concentration de l'échantillon sur un piège (petite colonne hydrophobe) et dessalage. Enfin, après les avoir séparés selon leur degré d'hydrophobicité, les différents peptides sont analysés, à l'aide soit d'une source electrospray soit d'une source MALDI. Finalement, le contenu en deutériums de chaque peptide est calculé en mesurant la masse moyenne du massif isotopique obtenu.

De nouvelles méthodes d'analyse permettent maintenant de fragmenter les ions obtenus et de mesurer la masse des ions « fils ». Ces techniques de fragmentation permettent d'obtenir des informations locales, au niveau de chaque acide aminé, et accroissent encore la précision des informations obtenues. Parmi les méthodes actuellement utilisées, on trouve par exemple les techniques de fragmentation par collision (Collision Induced Dissociation ou CID) ou de dissociation par capture électronique (Electron Capture Dissociation ou ECD). Récemment il a été mis en évidence que les hydrogènes d'un peptide étaient capables de se déplacer de proche en proche avant leur fragmentation. Ce mouvement dépend de nombreux facteurs et conduit à une moyenne du contenu en deutérium du peptide, rendant les données récoltées erronées (Demmers *et al.*, 2002; Hoerner *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005). Cependant la méthode ECD étant suffisamment rapide, il est possible de trouver des conditions d'analyse où la fragmentation est plus rapide que le déplacement des hydrogènes en phase gazeuse, rendant cette méthode applicable (Pan *et al.*, 2008).

## 5.5. Les protéines membranaires en spectrométrie de masse

Le DXMS a permis l'étude de nombreuses protéines solubles depuis sa première application en 1991 (Katta et Chait, 1991). Cependant, peu de protéines membranaires ont été étudiées par cette approche, et aucune en conditions natives (Joh *et al.*, 2008, Pan *et al.*, 2009). En effet, l'étude de ces protéines par spectrométrie de masse est beaucoup plus compliquée que celle des protéines solubles pour de nombreuses raisons. La première d'entre elles provient de l'emploi de fortes concentrations de détergent lors de l'extraction et de la purification des protéines de ce type, ce qui

induit d'importants problèmes d'analyse. Cela est d'abord dû au rapport entre les concentrations de la protéine et des molécules contaminantes, inhérent à la méthode de solubilisation de ces protéines. En effet, une préparation de protéine membranaire contient environ 100 à 10000 fois plus de molécules de détergent que de protéines. De plus, la présence de lipides et de petites molécules hydrophobes dans les micelles de détergent augmente encore le nombre de molécules contaminantes qui vont altérer, par leur quantité élevée, la qualité des informations obtenues lors de l'analyse même si la préparation ne contient qu'une seule protéine. De plus, les détergents en forte concentration, utilisés lors de l'extraction des protéines membranaires des membranes, vont altérer l'ionisation des particules au niveau de la source du spectromètre de masse, que celle-ci soit du type MALDI ou ESI. Dans le premier cas, ils vont interférer avec la formation des cristaux de matrice et donc avec le transfert d'énergie du LASER à la matrice puis à l'échantillon (Brinkworth et Bourne, 2007). Dans le cas d'une source ESI, et par leur nature amphiphile, les détergents vont exposer leurs queues hydrophobes à l'air et leur tête hydrophile au solvant au niveau du cône de Taylor, ce qui va altérer à la fois sa stabilité, sa formation, le passage en phase gazeuse des molécules et l'ionisation des particules. De plus les détergents sont des molécules très facilement ionisables, ce qui accroît leur détection lors de l'analyse et masque potentiellement des informations. Pour toutes ces raisons, il est préférable de retirer le détergent de la préparation avant l'analyse pour pouvoir étudier ces protéines par MS.

Afin de réduire la quantité de détergent présents dans l'échantillon, différentes techniques, comme la dialyse, la filtration sur gel, l'absorption sur des billes de polystyrène ou encore l'emploi de cyclodextrine peuvent être mises en œuvre. Ces méthodes qui s'appliquent à une solution de protéines membranaires ne permettent cependant pas de réduire la concentration en détergent au dessous de la CMC (concentration micellaire critique) sans risquer d'entraîner la précipitation de la protéine. De plus, la présence de détergents, même à la CMC, est souvent délétère pour l'analyse en spectrométrie de masse et explique que ces approches restent plus préférentiellement employées en biochimie. D'autres voies ont donc été explorées. Une des techniques utilisées pour supprimer le détergent de la préparation de protéines membranaires a été de précipiter les protéines, le détergent et les lipides à l'aide de solvants ou d'acides, puis d'extraire sélectivement ces deux derniers à l'aide d'autres solvants organiques (Whitelegge *et al.*, 1999; le Coutre *et al.*, 2000; Trimpin et Brizzard, 2009). D'autres approches se sont tournées vers l'emploi de nouveaux détergents. Ainsi, des détergents sensibles aux milieux acides, les ALS (Acid-Labile Surfactants), ont été employés avec succès dans plusieurs études (Yu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007). Ces détergents ont la propriété de se couper en deux en milieu acide, séparant les parties hydrophiles et hydrophobes. Après protéolyse, le détergent peut être hydrolysé en milieu acide. La partie hydrophobe, insoluble

dans l'eau, peut alors être éliminée par centrifugation alors que la partie hydrophile, qui n'interfère pas avec l'analyse, reste en solution. Cependant, des études ont montré que des peptides hydrophobes peuvent être perdus lors de cette étape, entraînant une forte réduction de la couverture peptidique obtenue (Yu *et al.*, 2004). D'autres études ont été réalisées après solubilisation des protéines membranaires à l'aide de solvants organiques (Barnidge *et al.*, 1999; Blonder *et al.*, 2002). Cette approche a permis de s'affranchir de l'emploi de détergent pour solubiliser les protéines et les analyser par spectrométrie de masse. Enfin, diverses autres méthodes ont été mises au point pour séparer les détergents, non pas d'une solution de protéines membranaires, mais d'un mélange de peptides issus de leur protéolyse. Ces méthodes sont basées sur les différences de charge ou d'hydrophobicité des peptides vis-à-vis des détergents ioniques ou non. Ainsi, l'utilisation de colonnes échangeuses d'ions peut être employée pour retenir spécifiquement les peptides d'une solution contenant des détergents non-ioniques ou, à l'inverse, retenir plus fortement les détergents ioniques que les peptides présents (Vissers *et al.*, 1996). Pour tirer parti des différences d'hydrophobicité, l'emploi de colonnes HILIC permet de séparer efficacement les peptides d'un détergent non ionique, mais ne permet pas une aussi bonne séparation des peptides entre-eux qu'une chromatographie en phase inverse.

Le deuxième problème lié à l'étude des protéines membranaires est leur résistance à la protéolyse enzymatique. En effet, les grandes parties hydrophobes de ces protéines se trouvent isolées de l'eau et donc des protéases par les membranes ou les micelles de détergents et de lipides. De ce fait, il est souvent nécessaire de combiner une protéolyse enzymatique puis chimique, ou inversement, ainsi qu'une séparation des peptides par chromatographie d'exclusion afin d'obtenir une couverture peptidique importante de la protéine d'intérêt. Ainsi, la bactériorhodopsine, une protéine présente dans les membranes de certains microorganismes (comme *Halobacterium salinarum*), est très difficile à protéolyser, et des protocoles particuliers ont du être développés pour obtenir des peptides recouvrant toute la séquence de la protéine (Yu *et al.*, 2004).

Malheureusement tous les protocoles proposés dans le cadre de ces études, que ce soit pour éliminer le détergent au niveau protéique ou peptidique, ou pour améliorer la protéolyse des protéines membranaires, ne sont pas applicables à la technique de DXMS par leur complexité et les conditions dans lesquelles ont été effectuées les préparations de protéines.

Récemment, une étude par DXMS de l'apomyoglobine de cachalot (une petite protéine modèle de la famille des globines), produite de manière recombinante a été réalisée. Elle a permis d'étudier les régions de la protéine qui interagissent, en fonction des conditions de pH, avec des liposomes qui miment les membranes biologiques. Dans cette étude, les lipides ont été séparés des peptides par LC en phase inverse et n'ont pas perturbé l'analyse par spectrométrie de masse (Man *et al.*, 2007).

De la même manière plusieurs autres protéines interagissant avec des lipides ont pu être étudiées par DXMS. C'est le cas par exemple de la phospholipase A<sub>2</sub> dont les zones de fixation à la bicouche lipidique et ses interaction avec divers composés ont pu être étudiées (Burke *et al.*, 2008, Hsu *et al.*, 2009). Une autre étude de protéines membranaires par spectrométrie de masse dans l'état natif a été réalisée récemment par l'équipe de Carol Robinson. Celle-ci a permis d'étudier les états oligomériques de différents transporteurs membranaires en s'affranchissant du détergent par l'optimisation des réglages du spectromètre de masse (Barrera *et al.*, 2009). Ces résultats ont été obtenus en utilisant du  $\beta$ -D-dodécyl-maltoside et du  $\beta$ -D-décyl-maltoside à des concentrations proches de la CMC.

Tout ces travaux représentent un pas en avant dans l'étude des protéines membranaires en spectrométrie de masse, notamment par échange H/D, et ouvrent la voie à l'application de cette technique aux protéines membranaires.

## 6. Objectifs et organisation du projet

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'étude des différentes conformations du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial. Cette protéine est depuis longtemps étudiée au sein du laboratoire *via* des approches biochimiques, biophysiques et structurales, comme la spectroscopie de fluorescence, l'immunoréactivité, le marquage chimique, la cristallographie. Afin de compléter et d'affiner les nombreuses données déjà collectées sur cette protéine et comprendre son mécanisme d'action, l'étude du transporteur d'ADP/ATP par DXMS a été entreprise en collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP) de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Cette technique innovante est de plus en plus utilisée dans des études structurales et fonctionnelles de protéines solubles et permet d'obtenir des informations sur leur dynamique moléculaire. Le récent développement de cette méthode associé à l'étude de protéines interagissant transitoirement avec des membranes ouvrent la porte à l'étude de protéines membranaires intégrales comme le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial.

Dans cet objectif, mon projet s'est appuyé sur l'expertise technique de l'équipe Transporteur Mitochondrial et du LSMP. Premièrement, la connaissance approfondie de la biochimie des protéines membranaires et plus particulièrement du transporteur d'ADP/ATP a été un atout majeur dans la réalisation de ce projet. De plus, l'expertise du LSMP dans la technique de DXMS m'a permis de mieux appréhender son développement pour l'étude des protéines membranaires intégrales.

L'exposé de ce travail est divisé en trois parties. La première concerne les mises au point effectuées pour adapter les conditions d'analyses des cinétiques de marquage par échange hydrogène/deutérium à l'étude des protéines membranaires. Ce développement constitue une amélioration significative de la technique car il s'agit de la première protéine membranaire intégrale étudiée à l'aide de cette approche. Il s'inscrit dans la suite des travaux des membres du LSMP visant à améliorer la technique de DXMS pour l'étude des protéines et à la rendre la plus ubiquitaire possible (Cravello *et al.*, 2003; Man *et al.*, 2007).

La seconde partie traitera des données obtenues et des informations qu'elles apportent sur la compréhension des différentes conformations qu'adoptent les deux complexes transporteurs inhibiteurs (transporteur-CATR et transporteur-BA). Je rappellerai ici que l'utilisation de ces inhibiteurs permet de bloquer la protéine dans des conformations stables représentant des étapes clés du mécanisme de transport. La structure tridimensionnelle à haute résolution du complexe bAnc1p-CATR a servi de base à l'analyse des différentes cinétiques d'échange H/D et nous a permis de valider les résultats d'accessibilité aux solvants obtenus pour ce complexe (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Enfin, en confrontant les nombreuses données de la littérature aux différentes cinétiques d'échange et en comparant entre elles ces cinétiques, nous avons pu accéder à des différences de conformations entre les complexes protéine-inhibiteur et proposer des modèles pour le complexe bAnc1p-BA.

La troisième partie de mes travaux a porté sur l'analyse de l'accessibilité des différentes régions de bAnc1p par DXMS au sein des membranes mitochondrielles. Cette étude *in organello* apporte un progrès technique et ouvre la possibilité d'étudier d'autres conformations du transporteur de nucléotides. En effet, elle représente la première analyse par DXMS d'une protéine dans son environnement naturel et a nécessité la mise au point d'une méthode de purification très rapide dans les conditions de contre-échange minimum (milieu acide, basse température). La réalisation du marquage avant les étapes d'extraction, de purification, et de concentration, nécessaires à la préparation de la protéine pour les expériences de DXMS en état micellaire, a aussi permis de s'affranchir des risques d'altération de la conformation du transporteur lors de ces différentes étapes, qui sont tout autant de facteurs pouvant biaiser les résultats obtenus. De plus, réaliser le marquage au sein des mitochondries permet d'utiliser des ligands de faible affinité, dont la fixation aurait été compromise lors de l'étape de concentration, et d'accéder ainsi à des conformations différentes de celles imposées par le CATR ou le BA. Une fois mise au point, cette technique a permis de réaliser des cinétiques d'échange H/D du transporteur au sein des membranes mitochondrielles et d'obtenir, sans l'aide de modifications chimiques, les premières données d'accessibilité d'une protéine membranaire dans son environnement naturel.

Dans un dernier volet, j'ai abordé l'étude des mutations pathogènes du transporteur hAnc1p humain à l'aide de méthodes biochimiques. Ce travail, initié dans l'équipe, a nécessité la validation d'un nouveau modèle pour appréhender l'effet des mutations humaines, afin de pallier les problèmes exposés précédemment. En effet, l'étude de ces transporteurs est difficile au sein de la levure et dans des cultures cellulaires à cause respectivement de leur très faible expression et de leur répression. De plus, la non-conservation des acides aminés des régions où sont localisées certaines mutations humaines chez les transporteurs ScAnc2p et hAnc1p ne permet que difficilement l'analyse de l'effet de ces mutations au sein de la levure. Celle-ci représente pourtant un organisme de choix pour étudier les transporteurs mitochondriaux. En effet, l'alternance possible entre des métabolismes respiratoires et fermentaires, permettant d'étudier des mutants non fonctionnels du transporteur. Notre approche s'est donc orientée vers l'utilisation d'un modèle mixte composé de l'organisme d'étude le plus approprié, c'est-à-dire la levure, et d'un transporteur d'ADP/ATP plus proche du transporteur humain et bien exprimé chez la levure, le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, DdAncAp. Ce modèle a été validé après avoir vérifié que l'expression de DdAncAp restaurait efficacement la croissance d'une souche de levure dépourvue de transporteur endogène fonctionnel.

## **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Techniques de biochimie

### 1.1. Dosage des protéines

Les protéines totales d'un échantillon sont dosées par une technique colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique, ou BCA (Smith *et al.*, 1985). En milieu alcalin, une liaison peptidique provoque la réduction de l'ion cuivreux selon la réaction du Biuret. La réaction entre le sel de sodium de l'acide bicinchoninique (BCA) et l'ion cuivreux est sensible et très spécifique. Le complexe formé BCA-Cu<sup>+</sup> est soluble dans l'eau et montre une forte absorption à 562 nm. Les protéines à doser (100 µL de prise d'essai) sont laissées quelques minutes dans un bain-marie en présence de 900 µL de réactif préparé extemporanément en mélangeant 1 volume de solution de CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O à 4 % (p/v) avec 50 volumes de la solution de BCA commerciale (Sigma-Aldrich, BCA-Na<sub>2</sub> 1 % (p/v), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O 25 % (p/v), tartrate de sodium 0,16 % (p/v), NaOH 0,4 % (p/v), NaHCO<sub>3</sub> 0,95 % (p/v), pH 11,25). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée par comparaison avec une gamme d'albumine de sérum bovin (BSA), allant de 0 à 100 µg de protéines dosées dans les mêmes conditions.

### 1.2. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées en conditions dénaturantes par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Laemmli, 1970). La migration de protéines de masses moléculaires connues (pré-colorées dans le cas d'une révélation par Western-blot, voir ci-après) au sein du même gel permet d'estimer la masse des protéines. On ajoute aux protéines à analyser 1/3 de leur volume de tampon de dissociation (4X) composé de 250 mM Tris-HCl (2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol-HCl), glycérol 40 % (p/v), SDS 8 % (p/v), β-mercaptopéthanol 1 % (v/v), 0,01 % (p/v) bleu de bromophénol, pH 6,8. Entre 5 et 20 µL d'échantillon sont déposés sur le gel de polyacrylamide composé de deux parties. La première destinée à concentrer les protéines est composée d'un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide respectivement à 4 % (p/v) et à 0,1 % (p/v), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), persulfate d'ammonium (APS) 0,1 % (p/v), N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED) 0,1 % (v/v). La seconde partie, destinée à séparer les protéines selon leur masse moléculaire, est composée d'un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide respectivement à 12 % (p/v) et à 0,3 % (p/v), 500 mM

Nom	Dilution	Remarques	Référence
$\alpha$ -bAnc1p	1/3000°	Anticorps dirigés contre bAnc1p solubilisé en SDS	(Boulay <i>et al.</i> , 1986)
$\alpha$ -Nter	1/1000°	Anticorps dirigés contre un peptide synthétique correspondant aux 11 premiers résidus N-terminaux de bAnc1p couplé à l'ovalbumine	(Brandolin <i>et al.</i> , 1989)
$\alpha$ -Cter	1/1000°	Anticorps dirigés contre un peptide synthétique correspondant aux 10 derniers résidus C-terminaux de bAnc1p couplé à l'ovalbumine	(Brandolin <i>et al.</i> , 1989)
$\alpha$ -ScAnc2p	1/1000°	Anticorps dirigés contre ScAnc2p solubilisé en SDS	(Fiore <i>et al.</i> , 2000)

**Tableau 1 : Nature et dilution des anticorps primaires utilisés.** Les anticorps sont conservés dans 50 % (p/v) glycérol à -20°C. Les dilutions effectuées dans du PBST peuvent être conservées à 4°C en présence de 0,05 % (p/v) NaN<sub>3</sub> et utilisées plusieurs fois.

Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), APS 0,1 % (p/v), TEMED 0,1 % (v/v). Les protéines vont migrer dans le gel sous l'effet d'un courant électrique d'intensité constante (20 mA par gel) appliqué pendant une heure environ dans un tampon de migration composé de 750 mM glycine, 0,1 % (p/v) SDS, 50 mM Tris pH 8,4.

#### 1.2.1. Coloration au bleu de Coomassie des protéines séparées par SDS-PAGE

Une fois l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalisée, les protéines peuvent être révélées par coloration au bleu de Coomassie. Pour cela, le gel d'acrylamide est immergé dans un bain contenant une solution de bleu de Coomassie R250 à 0,25 % (p/v) dans 40 % (v/v) éthanol et 10 % (v/v) acide acétique (Diezel *et al.*, 1972). L'excès de colorant est éliminé par incubation du gel dans 5 % (v/v) éthanol et 7 % (v/v) acide acétique.

#### 1.2.2. Immunorévélation des protéines séparées par SDS-PAGE

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide peuvent être transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidene (PVDF) ou de nitrocellulose afin d'être révélées par des anticorps (Towbin *et al.*, 1979). Pour cela, le gel est placé entre deux feuilles de papier Whatmann au contact de la membrane (préincubée quelques minutes dans de l'éthanol pour la membrane de PVDF), et maintenu en place entre des mousses au sein d'une cassette. Le sandwich réalisé est placé dans une cuve remplie de tampon de transfert composé de 375 mM glycine, 0,05 % (p/v) SDS, 25 mM Tris pH 8,4, 20 % (v/v) éthanol et mis sous ampérage constant (200 mA) pendant 1 heure.

Une fois l'électrotransfert réalisé, la membrane est maintenue sous agitation pendant une heure dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) supplémenté par 3 % (p/v) de lait écrémé. Après 3 lavages de 5 min avec du PBST (PBS complété avec 0,05 % (p/v) de Tween 20) la membrane est traitée pendant 1 heure par des anticorps dirigés contre la protéine à révéler (tableau 1). Les anticorps utilisés au cours de cette étude sont des anticorps polyclonaux produits chez le lapin, dirigés contre différentes parties de bAnc1p ou ScAnc2p. La membrane est ensuite lavée 5 fois avec du PBST puis mise à incuber dans une solution de protéine A (*Staphylococcus aureus*) couplée à la peroxydase de raifort (HRP) (*Protein A-HRP Conjugate*, BioRad diluée 3000 fois). Après 3 lavages avec du PBST, les protéines sont révélées par détection de l'activité peroxydase grâce à un kit ECL (*Enhanced Chemi Luminescence*,

*Amersham*). La peroxydase va oxyder le luminol contenu dans la solution du kit ECL en présence d' $H_2O_2$  et libérer un photon qui va impressionner un film photographique (Biomax Light, Kodak).

### 1.3. Préparation des mitochondries

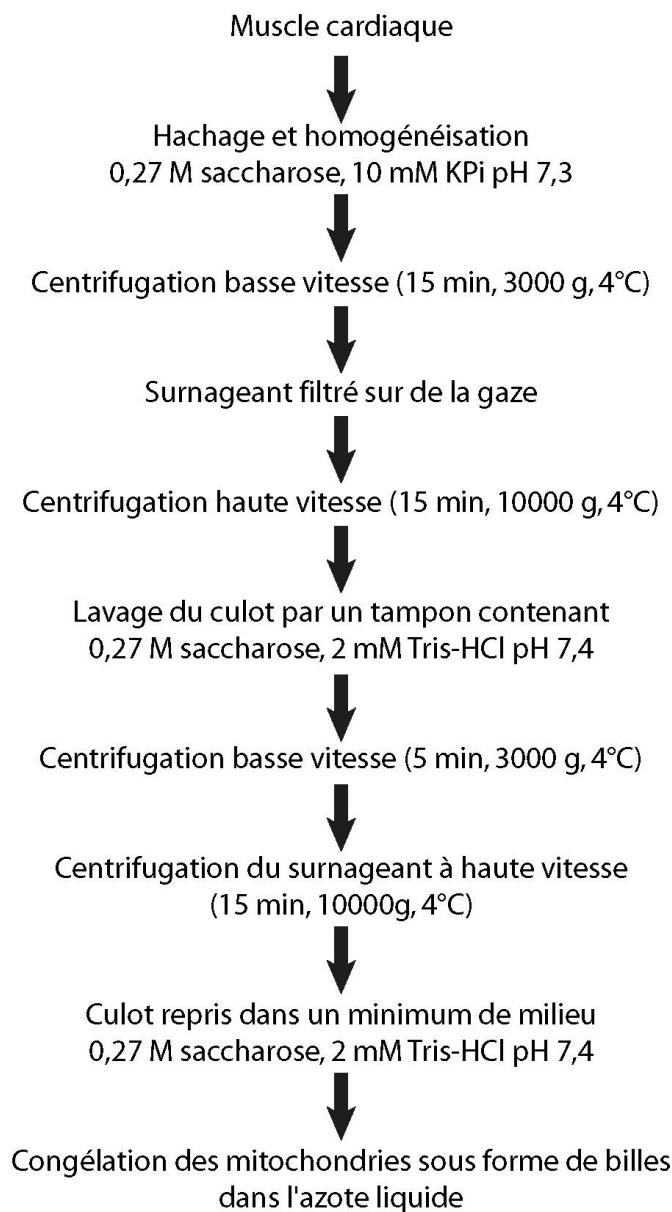
#### 1.3.1. Extraction des mitochondries de cœur de bœuf

La préparation d'une fraction subcellulaire enrichie en mitochondries de cœur de bœuf est réalisée par centrifugation différentielle après lyse mécanique des cellules de muscle cardiaque de bœuf à 4°C (figure 15; Smith, 1967).

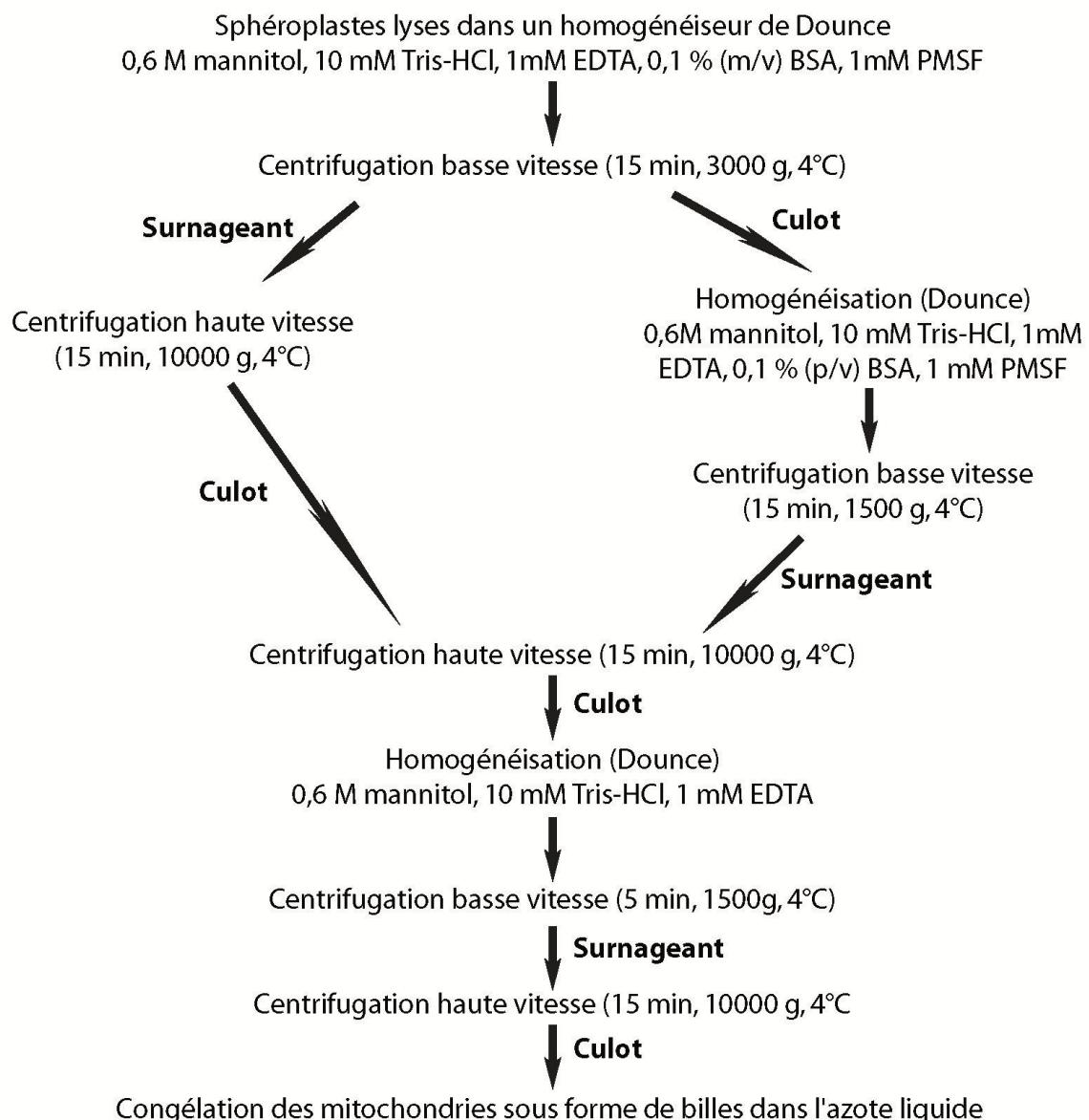
#### 1.3.2. Extraction des mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*

L'isolement des mitochondries de levure s'effectue en deux étapes : la première est destinée à digérer la paroi des levures, la seconde à lyser mécaniquement les cellules pour en extraire les mitochondries (Daum *et al.*, 1982). Ainsi, pour préparer une fraction enrichie en mitochondries de levure, une culture de *S. cerevisiae* est arrêtée en phase exponentielle de croissance (entre 5 et 6 de densité optique) par centrifugation à 1500 g pendant 15 min à 20°C. Après un lavage à l'eau et une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions, le culot cellulaire est traité pendant 30 minutes à 30°C par un milieu réducteur contenant 100 mM Tris-HCl, 10 mM dithiothréitol, pH 9,4 à raison de 0,5 g de cellules/mL de milieu, ceci afin de fragiliser la paroi cellulaire. Après centrifugation (10 minutes, 1500 g, 20°C), les cellules sont lavées dans 1,2 M sorbitol puis centrifugées dans les mêmes conditions. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un milieu contenant 1,2 M sorbitol, 20 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,3 à raison de 0,3 g de cellules/mL de milieu. Les parois des cellules sont digérées à 37°C par l'action de la Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation) ajoutée dans le milieu à raison 5 mg/g de cellules humides. La cinétique de digestion est suivie en mesurant la densité optique (D.O.) à 600 nm d'une prise d'essai de 20  $\mu$ L diluée dans 2 mL d'eau distillée et pendant 2 minutes. Lorsque la valeur de la D.O. atteint 20 % de la valeur initiale, la lyse est arrêtée par centrifugation (1500 g, 15 min, 20°C). Les sphéroplastes obtenus après digestion de la paroi cellulaire par la Zymolyase sont lavés deux fois dans un milieu sorbitol 1,2 M et centrifugés (1500 g, 10 minutes, 20°C), afin de supprimer le maximum de phosphate et de Zymolyase.

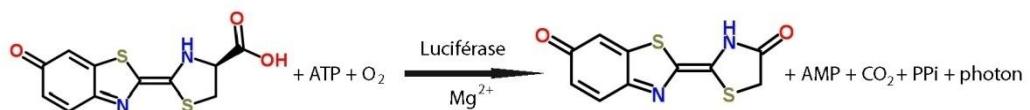
Les sphéroplastes sont resuspendus dans un autre milieu contenant 0,6 M mannitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), 0,1 % (p/v) BSA, 1 mM fluorure de



**Figure 15: Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries de cœur de bœuf (Smith, 1967).**



**Figure 16:** Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries de levure (Daum *et al.*, 1982).



**Figure 17:** Principe du dosage de l'ATP par le système luciférine-luciférase. En présence d'O<sub>2</sub> et de Mg<sup>2+</sup>, la luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction libère du pyrophosphate (PPi), du CO<sub>2</sub>, et un photon.

phényl méthanesulfonyle (PMSF) et rompus mécaniquement par dix aller-retours de piston dans un homogénéisateur de Dounce. La suite de l'extraction est réalisée par une série de centrifugations différentielles dont l'enchaînement est résumé figure 16.

#### 1.4. Titration des sites de fixation de l' $[^3\text{H}]$ ATR dans une préparation de mitochondries

L'ATR tritié a été obtenu selon le protocole décrit par Brandolin *et al.*, 1974. Les expériences de fixation d' $[^3\text{H}]$ ATR ont été réalisées dans les conditions décrites par Block *et al.*, 1981. Les mitochondries de cœur de bœuf sont diluées dans un milieu isotonique composé de 120 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM, Tris-HCl, pH 7,4 pour atteindre une concentration finale en protéines totales de 10 mg/mL. Deux séries de titrations sont réalisées en parallèle sur des mitochondries préalablement inhibées ou non avec du CATR afin de pouvoir mesurer la fixation non spécifique de l'inhibiteur radioactif. Les mitochondries des différentes séries sont mises en présence de concentrations croissantes d' $[^3\text{H}]$ ATR allant de 0,022  $\mu\text{M}$  à 3,3  $\mu\text{M}$  et laissées à agiter sur une roue à 4°C pendant 1 heure. Après centrifugation des mitochondries radiomarquées pendant 10 minutes à 16000 g et à 4°C, le surnageant est retiré et les parois du tubes sont rincées rapidement avec de l'eau distillée. Le culot de mitochondries est lysé par 500  $\mu\text{L}$  d'un milieu contenant 500 mM NaCl, 4 % (v/v) Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 puis transféré dans un flacon à scintillation. Le tube ayant contenu les mitochondries est rincé une fois avec 500  $\mu\text{L}$  de milieu de lyse qui sont ajoutés par la suite dans le tube à scintillation. La radioactivité présente au niveau des mitochondries est comptée pendant 10 minutes par scintillation liquide. La fixation spécifique de l' $[^3\text{H}]$ ATR est donnée par la différence entre la radioactivité incorporée dans la série sans et avec CATR, puis analysée par une représentation de Scatchard.

#### 1.5. Mesure de l'activité de transport ADP/ATP des préparations de mitochondries

Les préparations de mitochondries peuvent être caractérisées en mesurant la capacité à exporter l'ATP produit par phosphorylation oxydative de l'ADP contenu dans l'espace matriciel des mitochondries. L'ATP exporté est dosé par l'action d'une protéine, la luciférase, qui catalyse l'oxydation d'un composé chimique, la luciférine, en oxyluciférine en hydrolysant l'ATP en AMP et pyrophosphate en présence de dioxygène et d'ions magnésium et en émettant un photon (figure 17; Dassa *et al.*, 2005). L'émission de lumière est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Une préparation fraîche de mitochondries de *S. cerevisiae* est diluée dans milieu composé de 0,6 M

mannitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 jusqu'à une concentration en protéines totales de 5 mg/mL. 10 µL de cette suspension sont ajoutés à 2 mL de tampon contenant 0,6 M mannitol, 10 mM phosphate de potassium, 10 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 1 mM α-cétoglutarate, 4 µM diadénosine pentaphosphate (Ap5A), 0,1 % (p/v) luciférine (Roche), 0,1 % (p/v) luciférase (Roche), pH 7,4. Après 3 minutes d'incubation à 25 °C, le transport est déclenché par l'ajout dans le milieu réactionnel d'ADP à la concentration finale comprise entre 1 et 500 µM. La cinétique de libération de l'ATP est exprimée en nanomoles par minute et par mg de protéines totales pour chaque concentration d'ADP ajoutée dans le milieu. La représentation de Michaelis-Menten permet de calculer la vitesse maximum d'échange apparente ( $V_{max}$ ) et le  $K_M$  apparent du transporteur pour l'ADP externe dont la concentration libre est calculée grâce au logiciel MaxChelator (<http://maxchelator.stanford.edu>).

### 1.6. Purification des complexes bAnc1p-inhibiteurs

Le transporteur d'ADP/ATP bovin est inhibé au sein des membranes mitochondrielles par incubation des mitochondries de cœur de bœuf 10 minutes à 4°C dans un milieu salin composé de 10 mM MOPS, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,8 supplémenté par 25 µM CATR ou 25 µM BA, 0,1 mM ADP. Les mitochondries sont ensuite lysées par ajout de 1 % (v/v) final de Triton X-100 ou d'autres détergents comme le LAPAO à une concentration finale de 1 % (p/v) (Brandolin *et al.*, 1980). Le lysat mitochondrial est déposé sur une colonne d'hydroxyapatite (HTP, Bio-Rad) préalablement équilibrée dans un milieu contenant 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100 (ou LAPAO), 10 mM Tris-HCl pH 6,8. L'élution du transporteur, non retenu sur la colonne d'HTP, est contrôlée en suivant en continu l'absorption UV à 280 nm. Dans le cas d'une lyse au Triton X-100, le pic observé est dû presque totalement au détergent qui présente un pic d'absorption dans l'UV à 276 nm et un épaulement vers 284 nm. La protéine étant élueée en même temps que le détergent, le pic observé contient aussi la protéine et sera collectée. Cette fraction collectée en sortie de colonne HTP est concentrée sur Amicon ULTRA-15 (30 kDa de seuil de coupure) jusqu'à la concentration voulue. Pour une expérience de marquage au deutérium, une concentration de 5 à 10 mg/mL de transporteur bovin est classiquement utilisée.

## 1.7. Purification du rhizopuspepsinogène

### 1.7.1. Expression de la protéine recombinante

Le protocole de purification du rhizopuspepsinogène (Rpg) recombinant exprimé dans *Escherichia coli* (*E. coli*) est adapté de celui mis au point par Lowther et modifié par Flintke (Lowther *et al.*, 1995; Flintke *et al.*, 1999). Une souche BL21-DE3 (Novagen) contenant le plasmide pET3a-*rpg* est cultivée à 37°C dans un milieu riche (Luria broth medium, LB) supplémenté avec 0,1 g/L d'ampicilline. L'induction de l'expression de la protéase est déclenchée par ajout de 1 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) final quand la D.O. à 600 nm de la culture atteint 0,6 (début de phase exponentielle). Après 4 heures d'induction, les cellules sont centrifugées à 5000 g pendant 10 min, lavées avec du Tris-HCl 70 mM pH 8,2, puis recentrifugées dans les mêmes conditions. Les cellules sont conservées à 4°C ou congelées à -20°C.

### 1.7.2. Isolement des corps d'inclusion

Le culot bactérien est repris dans 20 mL de milieu contenant 70 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % (p/v) saccharose pH 8,2 et les cellules sont lysées par deux passages successifs à la presse de French. Le lysat cellulaire est déposé sur un coussin de sucre à 27 % (v/v) et centrifugé à 30000 g pendant 30 minutes dans un rotor à godets oscillants. Le culot est repris dans un milieu contenant 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,4 et homogénéisé dans un homogénéiseur de Dounce avant d'être centrifugé sur coussin de sucre dans les mêmes conditions qu'auparavant. Le culot obtenu après la deuxième centrifugation contient les corps d'inclusion et peut être conservé à -80°C pendant plusieurs mois.

### 1.7.3. Renaturation de la protéase

Le protocole de renaturation est basé sur une dénaturation complète des protéines contenues dans les corps d'inclusion par de l'urée en condition réductrice puis sur le repliement des protéines en éliminant progressivement les agents réducteurs et chaotropiques par des dialyses successives. Les protéines sont d'abord dénaturées dans un tampon contenant 8 M urée, 1 mM EDTA, 1 mM glycine, 500 mM NaCl, 300 mM β-mercaptopropanol, pH 10,5 et placées sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. La solution de protéines est ensuite dialysée pendant une heure

contre de 5 volumes de tampon (au minimum) contenant 50 mM Tris-base pH 11. Cette étape est répétée une fois, puis la dialyse est poursuivie sous agitation pendant 24 heures dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Une dernière dialyse est réalisée sur la nuit contre de 5 volumes (au minimum) d'un milieu contenant 50 mM MOPS-NaOH, 300 mM NaCl, pH 7,0. La fraction est centrifugée à 24 000 g pendant 30 min afin de retirer les protéines agrégées et précipitées, et le surnageant est concentré par centrifugation sur Amicon ULTRA-15 jusqu'à la concentration voulue, soit 1,7 mg/mL pour une utilisation en solution, soit 60 mg/mL dans l'optique d'une immobilisation sur résine.

#### 1.7.4. Activation de la protéase

Une fois purifié, le zymogène doit être traité en milieu acide afin de générer une protéase active (Chen *et al.*, 1991). Pour cela, il est dilué dans un tampon glycine 0,1 M pH 2,5 pendant 10 minutes à température ambiante. La protéase active peut alors être utilisée dans des expériences de digestion ou conservée congelée à -20 °C.

### 1.8. Digestion en solution du transporteur d'ADP/ATP par des protéases acides

La mise au point de la protéolyse du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin a été réalisée dans les conditions dictées par la technique d'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse. La fraction contenant le transporteur isolé à 1 mg/mL est diluée 4 fois dans un milieu composé de 30 mM NaCl, 4 mM citrate, pH 4. Elle est traitée pendant 2 min à 0°C par 0,25 volume de la protéase solubilisée dans de l'acide phosphorique 110 mM à une concentration 5 fois plus grande que celle souhaitée dans le test de digestion. La pepsine, la protéase de type XIII et la protéase de type XVIII ont été utilisées respectivement dans un rapport protéine/protéase de 1/1, 1/13, 1/16 (p/p). La réaction est arrêtée par ajout de tampon de dissociation, puis une aliquote est analysée par SDS-PAGE puis révélée par coloration au bleu de Coomassie et immunomarquage afin de mettre en évidence l'efficacité de protéolyse et de localiser les fragments éventuels à l'aide d'anticorps spécifique des régions N-terminale ou C-terminale.

## 1.9. Deutération du transporteur

### 1.9.1. Deutération de la protéine en solution

Le complexe bAnc1p-CATR purifié est concentré jusqu'à environ 5 mg/mL. La concentration est vérifiée par dosage des protéines au BCA (voir paragraphe 1.1). Au temps  $T_0$ , la fraction est diluée 10 fois dans un milieu composé de 10 mM MOPS-NaOH, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,8 préparé dans du D<sub>2</sub>O. Des aliquotes de 80 µL de la solution deutérée sont prélevées à différents intervalles de temps puis diluées dans 20 µL de 1 M glycine pH 2,5 et immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur analyse en spectrométrie de masse.

### 1.9.2. Deutération de bAnc1p dans l'état membranaire

La technique de deutération *in situ* a été mise au point au cours de ce travail et sera discutée en détail dans la partie « Résultats ».

## 2. Matériels biologiques

### 2.1. Souches de levures et de bactéries utilisées.

La souche de levure utilisée dans ce travail est JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> (*Mata leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 trp1-1 ura3-1 can1-100 anc1::LEU2 Δanc2::HIS3 Δ[269-975]anc3*) (De Marcos Lousa *et al.*, 2002).

Trois souches de bactéries ont été utilisées dans ce travail :

BL21(DE3) : *F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])* (Studier et Moffatt, 1986).

BL21(DE3) pLysS : *F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysS (cm<sup>R</sup>)*.

Top10 (Invitrogen) : *F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ<sup>-</sup>*

## 2.2. Conditions de culture et milieux utilisés

Les cellules de levures sont cultivées sous agitation (200 tours/minute) à 28°C dans des milieux riches ou sélectifs, fermentescibles ou non, solides ou liquides, préalablement stérilisés dans un autoclave durant 20 minutes à 120°C sous un bar de pression. Les milieux riches sont composés de 2 % (p/v) bactopeptone (Difco), 1 % (p/v) extraits de levure (Difco) et de 2 % (p/v) glucose (Sigma Aldrich) pour les milieux fermentescibles ou 2 % (p/v) lactate (Fluka), 1 % (p/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich), pH 5,5 ajusté à la potasse pour les milieux non-fermentescibles. Les milieux sélectifs sont composés de 6,7 g/L de « Yeast Nitrogen Base » (YNB, MP Bio), de glucose ou de lactate/KPi comme indiqué pour les milieux riches et de 0,74 g/L d'un mélange d'acides aminés dépourvu de tryptophane (CSM-W, BIO101).

Les bactéries sont cultivées sous agitation (200 tours/minute) à 37°C dans un milieu Luria Bertani (LB) 25 g/L stérilisé de la même manière que les milieux utilisés pour la croissance des levures et supplémenté ou non avec des antibiotiques (ampicilline 100 mg/L ou chloramphenicol 100 mg/L) avant utilisation.

Dans le cas de culture sur milieux solides, tous les milieux décrits ci-dessus sont supplémentés avec 2 % (p/v) de bacto-agar (Difco).

## 2.3. Détermination des courbes de croissance des levures

Une pré-culture de 10 mL de la souche à analyser est ensemencée avec des clones prélevés sur milieu solide et laissée à 28°C sous agitation jusqu'à la phase stationnaire. 50 mL de culture sont ensemencés à une D.O.<sub>600nm</sub> initiale de 0,1 dans les conditions de cultures décrites précédemment et des aliquotes de 1 mL sont prélevées régulièrement afin de suivre la D.O.<sub>600nm</sub>. Chaque prélèvement est centrifugé 5 minutes à 16000 g et le culot de levure est resuspendu dans 1 mL d'eau distillée avant lecture de la D.O.

### 3. Techniques de biologie moléculaire

#### 3.1. Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés dans cette étude sont soit des plasmides de bactérie (pLysS, Novagen ; pET3A, Stratagène), soit un plasmide dit « navette » (pRS314) capable de se répliquer dans les bactéries et dans les levures (Sikorski et Hieter, 1989). Ce dernier comporte les régions promotrices du gène de levure *ScANC2* (Le Saux *et al.*, 1996). Un gène peut être inséré entre le promoteur et le terminateur grâce aux enzymes de restriction *BamHI* et *EcoRI*. C'est ainsi que sera réalisé le clonage des gènes mutés ou non du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

#### 3.2. Amplification d'un fragment d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR permet d'amplifier *in vitro* à l'aide d'ADN polymérases thermostables un fragment d'ADN (matrice) situé entre deux oligonucléotides (amorces) complémentaires de l'extrémité 3' des deux brins de la matrice à amplifier (Mullis *et al.*, 1986). Dans ce travail, deux types d'ADN polymérases ont été utilisés : la Taq polymérase a été employée pour la mise au point des conditions de la PCR ou pour les PCR de contrôle, et la polymérase Vent (BioLabs) a été utilisée dans le cas du clonage des gènes d'intérêt. Les différentes amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 2.

Une petite quantité du fragment d'ADN à amplifier est mis en présence de 20 pmoles d'amorces, 0,8 mM du mélange des 4 dNTPs et de 0,5 µL d'ADN polymérase dans un tampon adéquat. Le mélange est dénaturé pendant 10 minutes à 95°C puis soumis à une répétition de 30 cycles contenant 3 étapes d'une minute chacune. La première étape du cycle est une dénaturation à 95°C. Elle est suivie d'une étape d'hybridation des amorces sur les brins d'ADN matrices réalisée à une température 5°C inférieure au Tm des amorces. La dernière étape du cycle est l'étape d'amplification réalisée à 72°C. A la fin des 30 cycles, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 minutes afin de compléter les fragments incomplets. La température du mélange réactionnel est ensuite abaissée à 4°C.

### 3.3. Digestion d'un brin d'ADN par des enzymes de restriction

L'extraction d'un gène contenu dans un plasmide ou la linéarisation d'un plasmide circulaire s'effectuent par digestion à l'aide d'enzymes de restriction. Les digestions de plasmides ou d'inserts issus d'une amplification par PCR sont réalisées à 37°C pendant 1 heure dans les conditions recommandées par le fournisseur des enzymes de restriction (Fermentas). Classiquement, 2 µL de plasmide issu d'une « miniprep » (réalisée avec le kit Qiagen) sont digérés par 0,5 µL de *Bam*HI et 0,5 µL d'*Eco*RI dans le tampon tango™ (Fermentas) concentré 2 fois dans un volume final de 10 µL.

### 3.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les brins d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose immergé. Le gel est composé d'agarose 1 % (p/v) dissous à chaud dans un tampon TAE contenant 20 mM Tris, 10 mM acide acétique, 0,5 mM EDTA, pH 8,5. Les échantillons à analyser sont dilués dans un tampon de charge contenant 0,25 % (p/v) bleu de bromophénol, 0,25 % (p/v) xylène cyanol, 40 % (p/v) glucose puis déposés dans le gel et soumis à une tension de 100 V pendant environ 30 minutes. Après l'électrophorèse, le gel est placé pendant 10 minutes dans une solution de bromure d'éthydium à environ 0,5 µg/mL et observé sous rayonnement ultra-violet (UV). Le nombre de paires de bases contenues dans les brins d'ADN présent dans les échantillons est estimé par comparaison avec des brins d'ADN standards (1 Kb DNA ladder, Fermentas) soumis à la même électrophorèse. Cette technique permet aussi de purifier un produit PCR. Pour cela, une bande d'agarose contenant un fragment d'ADN d'intérêt est excisée au scalpel et le fragment est purifié à l'aide du kit de purification High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

### 3.5. Préparation du plasmide (« miniprep »)

L'extraction et la purification d'un plasmide bactérien (miniprep) sont basées sur une lyse alcaline des bactéries et s'effectuent selon le protocole du kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Qiagen).

### 3.6. Ligature

L'insert et le vecteur coupés par les mêmes enzymes de restriction et purifiés sont soumis à une étape de ligation pour obtenir un plasmide circulaire contenant l'insert. Pour ce faire, environ 50 ng

de plasmide et 25 ng d'insert sont mélangés en présence d'1 µL de ligase (T4 DNA ligase, Roche) dans un tampon adéquat. Le mélange est laissé toute la nuit à 6°C ou 2 heures à température ambiante.

### 3.7. Transformation

Le plasmide obtenu doit pénétrer la cellule pour être répliqué. Cette étape nécessite une préparation spécifique des levures ou des bactéries.

#### 3.7.1. Levures

Le protocole suivi est celui proposé avec le kit de transformation de levure utilisé (BIO101). Une colonie de levures est mise en culture dans un milieu riche glucose (YPD) entre 12 et 24 heures. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 g pendant 5 minutes et le milieu de culture est éliminé. Le culot de cellules est repris dans 9 mL de tampon TE pH 7,5 et centrifugé une nouvelle fois. Le culot cellulaire est repris délicatement dans 5 mL de solution « lithium/acétate de césium » (fournie dans le kit commercial) et agité légèrement pendant 30 minutes à 30°C. Les cellules sont à nouveau centrifugées et le culot est repris dans 1 mL de TE pH 7,5. La transformation de 100 µL de cellules ainsi préparées s'effectue à température ambiante en ajoutant 5 µL d'une solution d'ADN « guide », 5 µL d'une solution d'histamine et entre 0,01 et 1 µg de plasmide d'intérêt. Après 15 minutes d'incubation, 1 mL d'une solution contenant 0,8 mL de PEG et 0,2 mL du mélange « TE/Cation MIXX » (fourni dans le kit commercial) est ajouté aux cellules de levures. Le mélange est laissé à 30°C pendant 10 minutes. Après un choc thermique à 42°C pendant 10 min, les cellules sont centrifugées et le culot est repris dans 200 µL de milieu SOS (fourni dans le kit commercial) puis étalé sur un milieu solide sélectif.

#### 3.7.2. Bactéries

Les bactéries sont obtenues déjà compétentes (TOP10, Invitrogen), ou sont rendues compétentes par le traitement suivant : une culture de 100 mL de bactéries en milieu LB est ensemencée à 0,1 D.O.<sub>600 nm</sub> à partir d'une préculture à saturation et placée dans un incubateur sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une D.O. <sub>600 nm</sub> de 0,6. Les cellules sont alors refroidies puis centrifugées à 6000 g et à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est repris dans 100 mL de tampon froid composé de 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0 puis centrifugé dans les mêmes conditions. Il est ensuite repris dans

Nom	Séquence	Tm (°C)
ANC-A(A95D)-1	ctcaagctttaacttgactcaaagataaatacaa	54
ANC-A(A95D)-2	ttgtatttatcttgaagtcaaagttaagagcttgag	54
ANC-A(A126D)-1	tattatctgggtggctgatggtgcacccattact	60
ANC-A(A126D)-2	agtaatgagggtgcaccatcagcaccaccataata	60
ANC-A(V291M)-1	ggtgtgtcttttagtttaatgatttatgtgaaatccaa	55
ANC-A(V291M)-2	ttggatttcatcataaatcattaaaactaaaggcaccacc	55
Anc2prom	aatacatctacaaggtaaaggag	45
Anc2term	caaaacaaatcggtcactcatt	45
AncA-1	gcaaataagaattcatgtctaaccaaaagaaaaacg	54
AncA-2	ttagattggatcatttcagaaccaacaccac	56

**Tableau 2: Liste des amores utilisées.** La température de fusion des amores (Tm) est fournie par le fabricant. Elle est calculée à partir du pourcentage de bases CG présentes.

50 mL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 30 mM et placé pendant 10 minutes à 4°C. Après, les cellules sont centrifugées à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C puis le culot est resuspendu dans du glycérol 15 % (v/v). Les cellules sont fractionnées en aliquotes de 200 µL et congelées rapidement dans l'azote liquide pour être conservées ensuite à -80°C jusqu'à utilisation. Un mélange de 5 µL d'une « miniprep » du plasmide d'intérêt et de 50 µL de bactéries compétentes est incubé entre 15 et 20 minutes dans la glace. Les cellules subissent un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. 100 µL de milieu LB sont ajoutés et les cellules sont cultivées à 37°C pendant 1 heure. Elles sont centrifugées à 1500 g pendant 5 minutes et le culot est repris dans 100 µL de milieu LB puis étalé en deux fractions de 10 et 90 µL sur des boîtes LB-antibiotique qui sont mises à l'étuve à 37°C sur la nuit.

### 3.8. Séquençage

Les polymérasées utilisées dans les PCR peuvent faire des erreurs lors de l'amplification et créer des mutations non souhaitées au sein du gène d'intérêt. Afin de vérifier leur qualité, les gènes ainsi produits ont été séquencés par la société Cogenics (Meylan) à partir des amorces SP6 et T7prom fournies par le prestataire de service pour le plasmide pET3A et des amorces Anc2Prom et Anc2Term pour le plasmide pRS314 situées à chaque extrémité des gènes étudiés dans ce travail (tableau 2).

## 4. Techniques de spectrométrie de masse

### 4.1. Solvants et matériels utilisés lors des chromatographies liquides et des analyses en spectrométrie de masse.

Trois systèmes de solvants ont été utilisés pour la chromatographie en phase liquide. Le solvant A est composé de 95 % (v/v) eau (chromasolv plus pour HPLC, Sigma Aldrich), 4,9 % (v/v) acétonitrile (chromasolv pour HPLC gradient grade, Sigma Aldrich) et 0,1 % (v/v) acide formique (puriss. p.a. pour spectrométrie de masse, Fluka). L'éluant B correspond à un mélange de 95 % acétonitrile, 4,9 % (v/v) eau, 0,1 % (v/v) acide formique. Enfin nous avons utilisé du dichlorométhane (puriss, stabilized with amylene, Riedel de Haën).

Les matrices utilisées pour l'analyse des échantillons en spectrométrie MALDI sont l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (puriss. p.a., Sigma Aldrich) et l'acide 4-hydroxycinnamique

(Sigma Aldrich) appelées plus communément acide sinapinique et  $\alpha$ -cyano, respectivement. Elles sont préparées à 10 mg/mL dans un mélange eau/acétonitrile/acide trichloroacétique (50/50/0,1, v/v/v)

Les pièges à protéines (Protein Macro Trap<sup>TM</sup>, Michrom) et à peptides (Peptids Macro Trap<sup>TM</sup> et Peptids Micro Trap<sup>TM</sup>, Michrom) sont utilisés dans la ligne de chromatographie pour dessaler les échantillons. La séparation des peptides s'effectue sur une colonne Jupiter C18 (Phenomenex) dont les particules ont un diamètre de 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2. Préparation des échantillons pour le MALDI

Les échantillons à analyser sont déposés sur une plaque de MALDI et mélangés avec 1 volume de matrice acide. Les échantillons de haut poids moléculaire ( $>10$  kDa) sont mélangés à de l'acide sinapinique tandis que la matrice utilisée pour les peptides est de l' $\alpha$ -cyano. Les spectres de masse ont été enregistrés sur deux spectromètres MALDI-ToF, un Voyager et un Autoflex Bruker Daltonics puis analysés avec les logiciels Data Explorer (Applied Biosystems) pour le spectromètre Voyager et Flex Analysis (Bruker Daltonics) pour l'Autoflex.

#### 4.3. Montage de la ligne de la chromatographie en phase liquide

La ligne utilisée pour la LC est composée de tuyaux de polyétheréthercétone (PEEK), de vannes 6 et 10 pores Rheodyne et VICI (Valco Instruments Co. Inc.) ainsi que d'un injecteur Rheodyne. Le montage est repris dans les Résultats, partie I paragraphe 4.3.1, figure 27.

#### 4.4. Expérience de LC-MSMS

Le séquençage des peptides issus de la protéolyse du transporteur d'ADP/ATP a été réalisé sur une ESI-trap Esquire 3000+ (Bruker Daltonics), après dessalage et extraction du détergent sur phase solide (Macro-Trap<sup>TM</sup>) selon la méthode décrite dans cette étude (voir Résultats, partie I, paragraphe 4.3.1). Les peptides sont élués de la Macro-Trap<sup>TM</sup> par un gradient d'acétonitrile allant de 85/15 (v/v) A/B à 60/40 (v/v) A/B en 60 minutes puis séparés sur une colonne Jupiter C18. Les données sont enregistrées entre les valeurs de masses sur charge (m/z) 150 et 1600.

## 4.5. Analyse par LC-MS

### 4.5.1. Protéine entière

L'analyse de la masse des peptides contenues dans un échantillon a été réalisée sur un spectromètre de masse ESI-ToF (Time-of-flight LC/MS 6210, Agilent Technologies) après dessalage (cartouche Protein Macro Trap<sup>TM</sup>) et élution par le mélange 30/70 (v/v) A/B. Le spectre a été enregistré entre 400 et 1600 m/z via le logiciel Data Acquisition (Agilent) et les données déconvolées par le programme Qualitative Analysis (Agilent) entre 10000 et 50000 Da.

### 4.5.2. Protéine digérée

L'analyse de la masse des peptides a été réalisée sur un spectromètre de masse ESI-ToF (Time-of-flight LC/MS 6210, Agilent Technologies) après dessalage et extraction du détergent sur phase solide (Peptid Micro-Trap<sup>TM</sup>) selon la méthode décrite dans cette étude (voir Résultats, partie I, paragraphe 4.3.1). Les peptides issus de la digestion de la protéine à analyser sont élués de la Micro-Trap<sup>TM</sup> par un gradient d'acetonitrile allant de 85/15 (v/v) A/B à 60/40 (v/v) A/B en 25 minutes et séparés sur une colonne Jupiter C18 (Phenomenex).

## 4.6. Analyse de la deutération des peptides

La moyenne des spectres de masse correspondant à un peptide donné est calculée via le logiciel de traitement de spectre du constructeur : Qualitative Analysis (Agilent) puis extraite sous forme d'un fichier de données binaires. Après reformatage des données, le spectre est déconvolé par le logiciel Magtran<sup>©</sup> 1.03 b2 (Amgen Inc.) et la masse moyenne de l'enveloppe isotopique est calculée pour le peptide d'intérêt.

# **RESULTATS**

# PARTIE 1 : MISE AU POINT DE LA METHODE

## 1. Préambule et rappel des contraintes expérimentales liées à la problématique

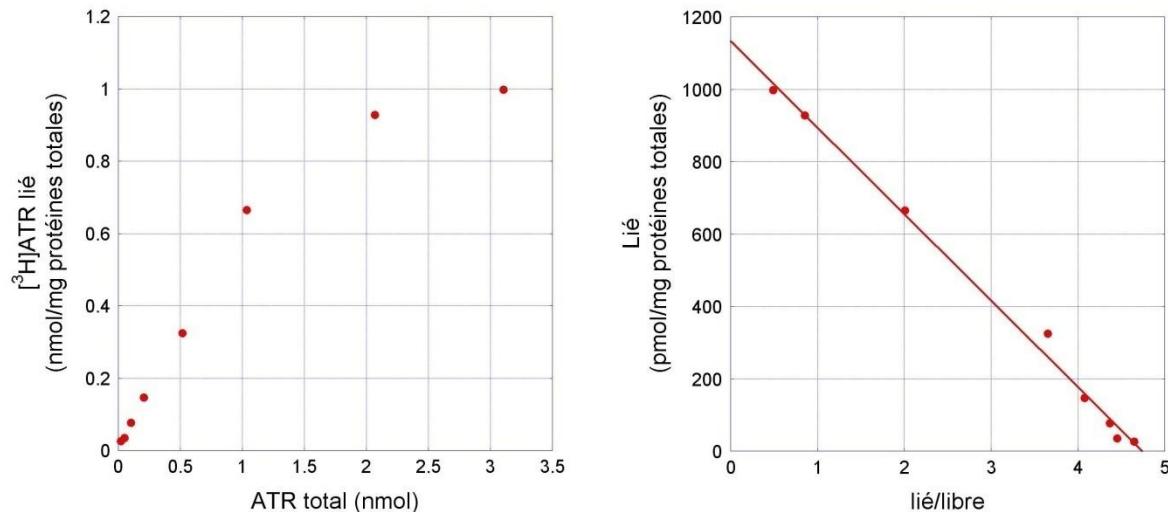
L'étude de l'isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP bovin (bAnc1p) par DXMS a été abordée en plusieurs étapes.

- La qualité des préparations mitochondrielles et la pureté de bAnc1p ont été vérifiées à l'aide des outils biochimiques disponibles au laboratoire.
- La production d'une protéase de type XVIII recombinante a été réalisée au laboratoire afin d'améliorer les outils de protéolyse à notre disposition. L'utilisation de protéases immobilisées couplées à l'action d'agents chaotropiques a permis d'obtenir une protéolyse de bAnc1p suffisamment efficace pour répondre aux critères de la technique de DXMS (pH~2,5, T°~0°C).
- Afin de résoudre le problème lié à la présence de détergent dans nos analyses en MS, un protocole d'extraction efficace du détergent sur phase solide par le dichlorométhane (DCM) a été mis au point dans ce travail.
- La mise au point d'une ligne HPLC combinant les étapes de protéolyse, d'extraction du détergent et de séparation des peptides avant leur analyse en MS a permis d'une part d'optimiser la durée de chaque étape, et ainsi de limiter la perte d'information induite par le contre-échange, et d'autre part d'améliorer la reproductibilité de nos résultats.

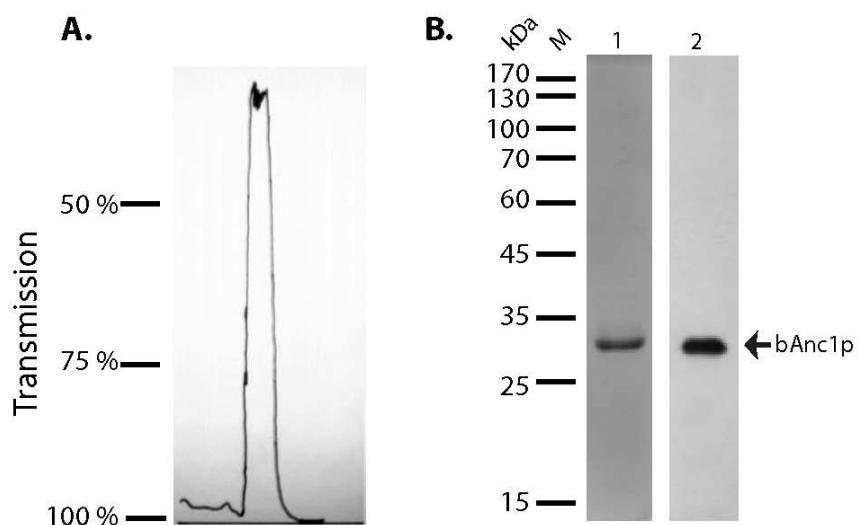
## 2. Isolement du transporteur bAnc1p : optimisation pour l'analyse en spectrométrie de masse.

### 2.1. Dosage du transporteur bAnc1p

La qualité d'une préparation de mitochondries isolées à partir de cœur de bœuf peut être estimée d'après les paramètres de fixation spécifique d' $[^3\text{H}]$ ATR. Cette expérience met aussi



**Figure 18 : Titration des sites de fixation de l'<sup>3</sup>H]ATR sur des mitochondries de cœur de bœuf. A.** [<sup>3</sup>H]ATR lié de manière spécifique au transporteur d'ADP/ATP (ronds rouges) en fonction de l'<sup>3</sup>H]ATR total ajouté dans le milieu. **B.** Représentation de Scatchard des données de fixation spécifique de l'<sup>3</sup>H]ATR (lié en fonction du lié/libre).



**Figure 19 : Purification de bAnc1p. A.** Mesure continue de la transmission en sortie de colonne HTP après dépôt d'un lysat de mitochondries de cœur de bœuf. **B.** Analyse de la fraction non retenue sur la colonne d'HTP par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (piste 1) et immunorévélée par des anticorps anti bAnc1p (piste 2).

en jeu l'état conformationnel de la protéine lors de la reconnaissance de l'inhibiteur. Une préparation de mitochondries de cœur de bœuf peut fixer spécifiquement environ 1 à 1,5 nmole d'ATR par mg de protéines totales et la constante de dissociation du complexe bAnc1p-ATR est située entre 100 et 300 nM (Block *et al.*, 1981).

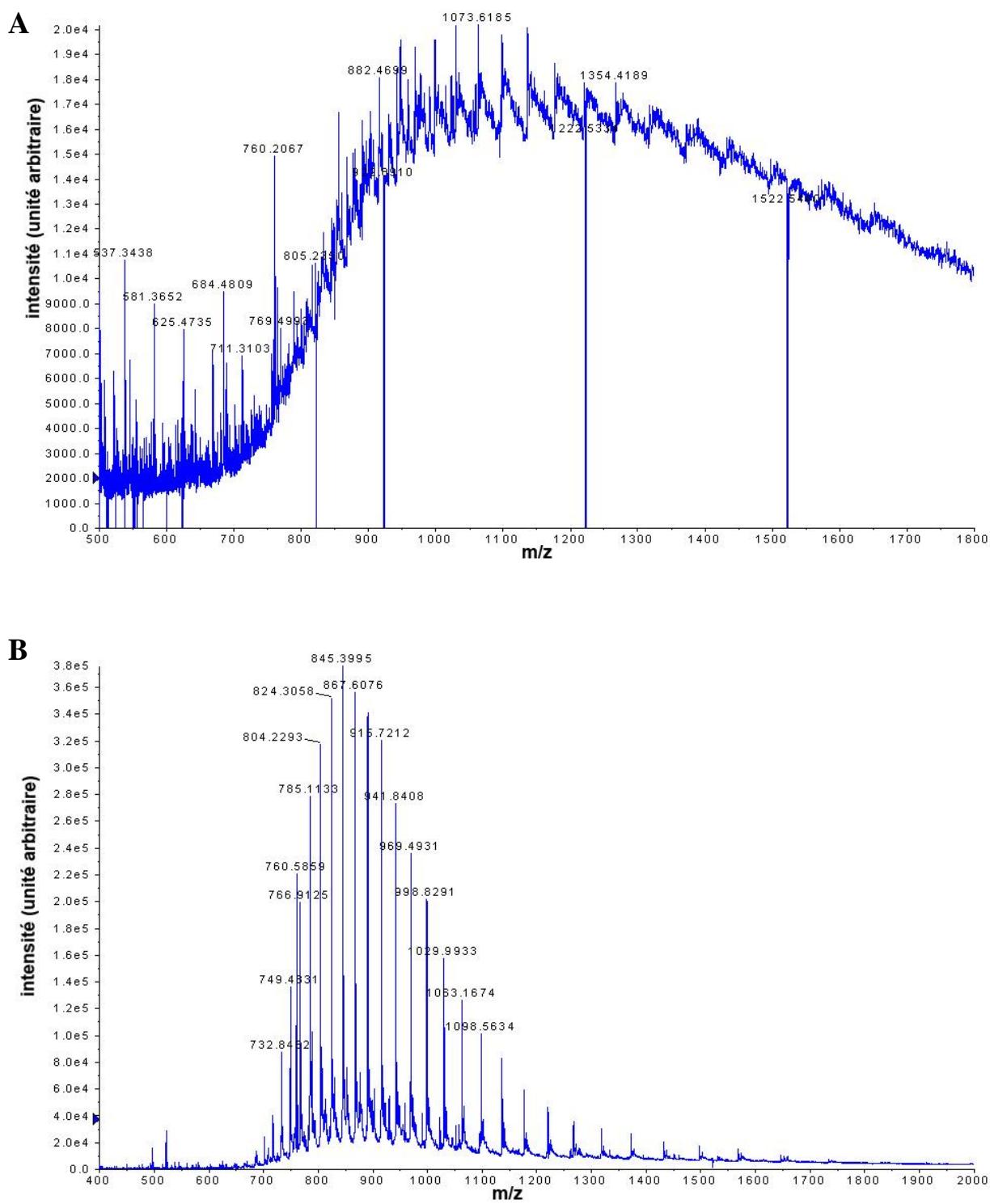
La titration des sites de fixation de l'ATR sur les mitochondries que nous avons utilisées montre la présence d'environ 1,1 nmole de sites de fixation de l'inhibiteur par mg de protéines totales (figure 18A). La représentation de Scatchard permet d'évaluer plus facilement par une méthode graphique la constante de dissociation du complexe bAnc1p-ATR qui vaut pour cette préparation 239 nM (figure 18B). Ces valeurs sont en accord avec les données trouvées dans la littérature et permettent de valider la qualité des mitochondries préparées (Block *et al.*, 1981).

## 2.2. Extraction et purification de la protéine bAnc1p

La purification du transporteur a été réalisée en présence de Triton X-100 (figure 19). Les protéines, une fois solubilisées, sont déposées sur une colonne d'HTP et l'élution est suivie par mesure de la transmission à 280 nm. Le pic observé est collecté et contient entre autres le transporteur d'ADP/ATP (figure 19A). L'analyse du pic d'élution en SDS-PAGE montre après coloration au bleu de Coomassie une protéine pure de 32 kDa, concentrée à 0,3 mg/mL d'après le dosage BCA (figure 19B, piste 1) et reconnue par les anticorps  $\alpha$ -bAnc1p (figure 19B, piste 2). La concentration en détergent dans la fraction protéique a été estimée à 0,5 % (p/v) par spectroscopie UV à 280 nm.

## 2.3. Mesure de la masse moléculaire de bAnc1p.

Cette étape avait pour but de vérifier que la masse moléculaire de la protéine correspondait bien à celle déduite de sa séquence primaire, avec en particulier l'acétylation de la sérine N-terminale et la triméthylation de la lysine 51 (Aquila *et al.*, 1982). Cette étape aurait aussi permis de mettre en évidence des différences globales de la deutération des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA. Dans l'optique de pouvoir analyser la protéine entière, des essais d'extraction du Triton X-100 sur une préparation de transporteur ont été réalisés après précipitation des protéines en présence de TCA. Le culot a été délipidé par des lavages successifs à l'acétone et par un mélange chloroforme/méthanol (2/1), éthanol/éther (1/1). Le précipité a été repris dans 10  $\mu$ L d'acide formique puis dilué dans un mélange acetonitrile/eau (1/1). Une analyse en MS-ESI-ToF de cette fraction s'est révélée difficilement exploitable (figure 20A).



**Figure 20 : Spectres de masse du transporteur d'ADP/ATP analysé en MS-ESI-ToF avant (A) et après (B) alkylation par du iodoacétamide.**

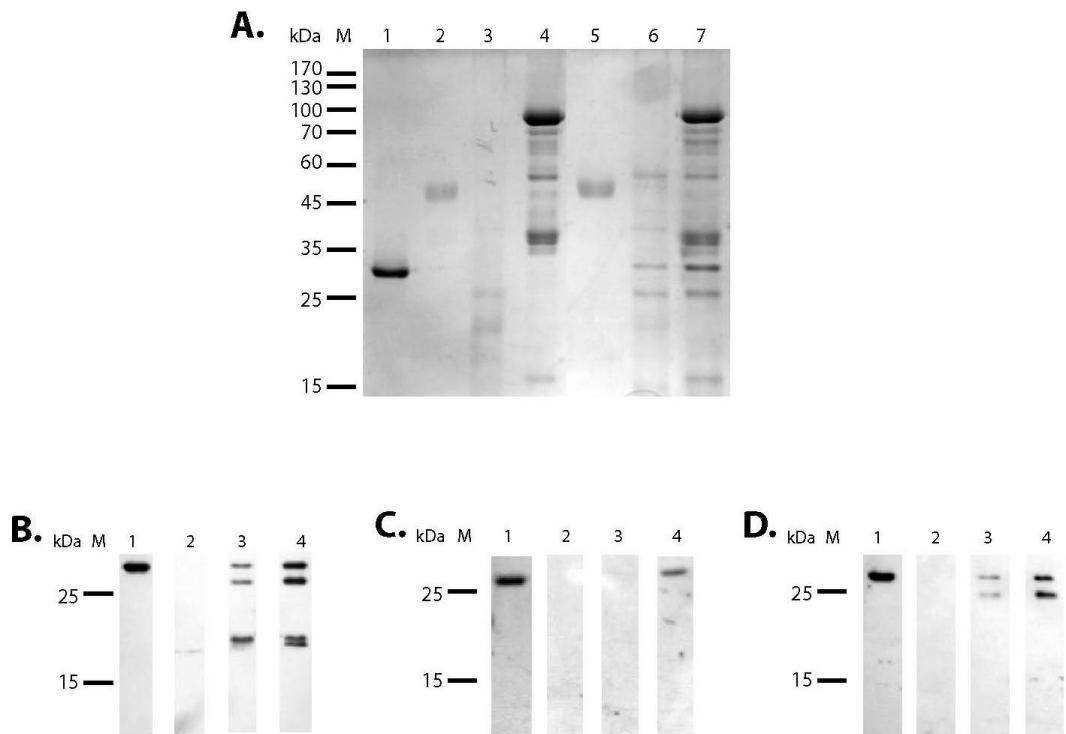
Une deuxième analyse a été réalisée en alkylant la protéine par de l'iodoacétamide après réduction des cystéines par du tris-2-carboxyethyl-phosphine. Les étapes de précipitation et de lavages ont été réalisées dans les mêmes conditions et ont permis d'obtenir un spectre d'apparence normale (figure 20B). Cependant, la masse mesurée pour le transporteur est de  $32930 \pm 2$  Da et ne correspond pas à la masse moléculaire attendue pour la protéine (contenant la N-acétylation de la sérine 1 et la triméthylation de la lysine 51) qui est de 32920 Da. La différence de masse est de 9,15 Da et ne peut pas être expliquée par la présence d'acétylations, d'alkylations ou de formylations qui auraient pu apparaître durant les différents traitements. Au vu des difficultés rencontrées pour analyser la protéine entière, l'essentiel de l'étude a été consacrée à l'analyse de la deutération de différentes régions peptidiques des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA.

### 3. Mise au point des conditions de protéolyse du transporteur bAnc1p

#### 3.1. Criblage de protéases acides

Comme mentionné (partie Introduction, paragraphe 5.4), l'utilisation de plusieurs protéases peut améliorer la protéolyse des protéines dans une étude par DXMS. Cependant, seulement 3 protéases, compatibles avec les conditions imposées par cette technique, sont disponibles dans le commerce et ont été utilisées dans cette approche : il s'agit de la pepsine porcine et de deux protéases fongiques : la protéase de type XIII et la protéase de type XVIII.

La sensibilité du transporteur vis-à-vis de ces 3 protéases a dans un premier temps été testée. L'efficacité de ces digestions a été évaluée par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie (figure 21A) ou par Western blot, à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine dénaturée (figure 21B), l'extrémité N-terminale (figure 21C), ou l'extrémité C-terminale (figure 21D), afin de localiser les fragments libérés. L'analyse montre que seule la pepsine est capable de digérer totalement bAnc1p en générant des fragments suffisamment courts pour ne plus être détectés (figure 21, piste 2). Les résultats montrent aussi et de manière non équivoque que le transporteur bAnc1p est peu sensible à l'action des protéases XIII et XVIII. Le transporteur n'est en effet que partiellement digéré par ces deux protéases, ce qui s'accompagne de l'apparition d'un fragment de 25 kDa (figure 21A, pistes 6 et 7). Cette analyse montre aussi que la protéase de type XVIII est commercialisée sous forme d'un extrait impur présentant une dizaine de bandes protéiques (figure 21A, pistes 4 et 7) contrairement aux deux autres protéases (figure 21A, pistes 2 et 3). L'immunodétection des fragments obtenus en présence de protéases XIII ou XVIII, à l'aide



**Figure 21 : Digestions de bAnc1p par la pepsine et les protéases de type XIII et XVIII analysées par SDS-PAGE.** **A.** Révélation au bleu de Coomassie. **1.** bAnc1p purifié. **2.** pepsine 2 min à pH 2.5. **3.** Protéase de type XIII 2 min à pH 2.5. **4.** Protéase de type XVIII 2 min à pH 2.5. **5.** bAnc1p traité 2 min par de la pepsine (1/1, p/p). **6.** bAnc1p traité 2 min par de la protéase de type XIII (1/13, p/p). **7.** bAnc1p traité 2 min par de la protéase de type XVIII (1/16, p/p). **B,C,D.** Immunorévélation avec des anticorps  $\alpha$ -bAnc1p (B),  $\alpha$ -Nter (C) et  $\alpha$ -Cter (D) de bAnc1p purifié (**1**), de bAnc1p traité 2 min par de la pepsine (1/1, p/p) (**2**), par de la protéase de type XIII (1/13, p/p) (**3**), par de la protéase de type XVIII (1/16, p/p) (**4**).

d'anticorps anti-bAnc1p dénaturé a confirmé ces résultats (figure 21B). Deux autres fragments d'environ 19 kDa, très peu visibles après coloration au bleu de Coomassie, sont également révélés à l'aide des ces anticorps. Ils sont probablement issus de la protéolyse du fragment de 25 kDa. Ces fragments minoritaires dans le lysat ne contiennent pas les extrémités N- et C-terminales puisqu'ils ne sont pas révélés par les anticorps dirigés contre ces régions (figures 21B, 21C et 21D, pistes 3 et 4). De plus, l'immunodétection de bAnc1p à l'aide d'anticorps dirigés contre son extrémité C-terminale montre une protection de cette région (figures 21D, pistes 3 et 4) contrairement à l'extrémité N-terminale qui semble plus sensible à l'action de ces protéases (figure 21C, pistes 3 et 4). On observe également que la bande à 30 kDa est peu ou pas révélée par les anticorps dirigées contre la partie N-terminale (figure 21C, lignes 3 et 4). Cette bande protéique correspond donc à un fragment du transporteur, de taille très proche de celle de la protéine entière, ayant perdu l'épitope présent sur la partie N-terminale. L'ensemble de ces résultats montre que la pepsine correspond à la protéase la plus efficace pour digérer bAnc1p et que les protéases XIII et XVIII commerciales dégradent principalement la partie N-terminale du transporteur. Pour ces raisons, ces deux dernières ne seront pas utilisées dans la suite de notre étude.

### 3.2. Production d'une protéase recombinante, la rhizopuspepsine. (Résumé de Rey *et al.*, 2009)

L'hétérogénéité de la préparation commerciale de protéase XVIII (ou rhizopuspepsine), nous a conduit à entreprendre la production hétérologue et la purification de cette enzyme afin d'améliorer son efficacité. Dans cet objectif, le gène codant pour la pré-protéine rhizopuspepsinogène (Rpg) a été cloné dans le plasmide pET3A, donnant le plasmide pET3A-rpg et des bactéries BL21(DE3) ont été transformées avec ce plasmide, donnant la souche BL21-(DE3)-rpg. Le Rpg a été produit sous forme de corps d'inclusion, comme décrit dans le paragraphe 1.7.2 de la partie Matériel et Méthodes. Une fois purifié, le rpg a été traité en milieu acide pendant 10 minutes afin de générer une protéase active, la rhizopuspepsine (Rp) par autoprotéolyse de sa partie N-terminale. La qualité de la préprotéase et de la protéase produites a été vérifiée à l'aide de plusieurs techniques. Tout d'abord une analyse par SDS-PAGE a permis de vérifier la pureté de la protéase pendant la renaturation et après l'activation. L'extrémité N-terminale des protéases (Rpg et Rp) a été analysée par dégradation d'EDMAN. Les résultats obtenus ont montré que le Rpg était produit tronqué de ses 3 premiers acides aminés et que la Rp était générée après auto-protéolyse des 42 premiers acides aminés du Rpg. Ces données ont été vérifiées par spectrométrie de masse et confirment les résultats publiés dans la littérature (Chen *et al.*, 1991).

L'efficacité de cette protéase a été vérifiée sur une protéine témoin, l'apo-myoglobine de cachalot, qui a fait l'objet récemment d'une étude par DXMS dans laquelle la pepsine et la protéase XIII ont été utilisées. Tout d'abord, une carte peptidique similaire à celle résultant de l'action de la protéase d'origine commerciale, mais utilisant un rapport protéine/protéase de 1/1 pour la première contre 1/16 pour la seconde, a été obtenue. Même si les peptides générés par l'une et l'autre des protéases sont similaires, ce résultat permet de limiter les peptides contaminants et facilite l'analyse des spectres obtenus en MSMS.

Afin d'augmenter l'efficacité de protéolyse, nous avons greffé la Rp sur un support solide et réalisé la protéolyse de l'apo-myoglobine en ligne en présence d'agents chaotropiques à fortes concentrations (1 M chlorure de guanidine), étape qui était impossible avec la protéase commerciale à cause des nombreux contaminants. Une étude comparative de l'action de la pepsine et de la Rp toutes deux immobilisées a ensuite été réalisée. Cette approche a permis de générer plus de peptides, et de plus petites tailles avec l'une et l'autre des protéases (14, 26, 20 et 34 peptides générés respectivement pour la Rp en solution, la Rp immobilisée, la pepsine en solution et la pepsine immobilisée). Ces résultats qui ont fait l'objet d'une publication montrent clairement d'une part l'intérêt d'employer un éventail de protéases dans l'étude d'une protéine par DXMS, et d'autre part l'avantage de travailler avec des protéases immobilisées.

### 3.3. Réalisation des cartes peptidiques du transporteur

Les expériences de DXMS menées sur les complexes bAnc1p-CATR et -BA ont été analysées par ESI-ToF-MS. Cette méthode permet uniquement d'obtenir des masses d'ions et ne suffit pas à elle seule pour identifier formellement les peptides contenus dans le mélange après action des protéases. L'identification des peptides provenant de bAnc1p ne peut être réalisée que si les valeurs des masses observées en ESI-ToF-MS coïncident parfaitement avec la masse de fragments de bAnc1p théoriques et identifiés préalablement par MSMS. Cette dernière technique permet en effet le séquençage de peptides par analyse des fragments générés par l'appareil, principalement au niveau de la liaison peptidique. L'identification de la séquence des peptides contenus dans le mélange et leur localisation dans la séquence de bAnc1p est effectuée en comparant les spectres de masse des fragments obtenus lors de l'analyse avec les spectres de fragmentation théorique générés par les logiciels GPMAW ou MASCOT. L'utilisation de cette technique a permis l'identification des ions observés en ESI-ToF-MS et la réalisation d'une carte peptidique de bAnc1p contenant l'ensemble des peptides de bAnc1p observables lors des expériences de DXMS.

**A.**

1   **SDQALSF****LK DFLAGGVAAA ISKTAVAPIE RVKLLLQVQH ASKQISAEKQY**  
51   **KGIIDCVVR IPKEQGFLSF WRGNLANVIR YFPTQALNFA FKDKYKQIFLG**  
101   **GVDRHKQFW RYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVGKGAAQ**  
151   **REFTGLGNC ITKIFKSDGL RGLYQGFNVS VQGIIIIYRAA YFGVYDTAKGM**  
201   **LPDPKNVHI IVSWMIAQTV TAVAGLVSYP FDTVRRRMM QSGRKGADIMY**  
251   **TGTVDCWRK IAKDEGPKA~~F~~ FKGAWSNVLR GMGGAFVVL YDEIKKFV**

**B.**

1   **SDQALSF****LK DFLAGGVAAA ISKTAVAPIE RVKLLLQVQH ASKQISAEKQY**  
51   **KGIIDCVVR IPKEQGFLSF WRGNLANVIR YFPTQALNFA FKDKYKQIFLG**  
101   **GVDRHKQFW RYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVGKGAAQ**  
151   **REFTGLGNC ITKIFKSDGL RGLYQGFNVS VQGIIIIYRAA YFGVYDTAKGM**  
201   **LPDPKNVHI IVSWMIAQTV TAVAGLVSYP FDTVRRRMM QSGRKGADIMY**  
251   **TGTVDCWRK IAKDEGPKA~~F~~ FKGAWSNVLR GMGGAFVVL YDEIKKFV**

**C.**

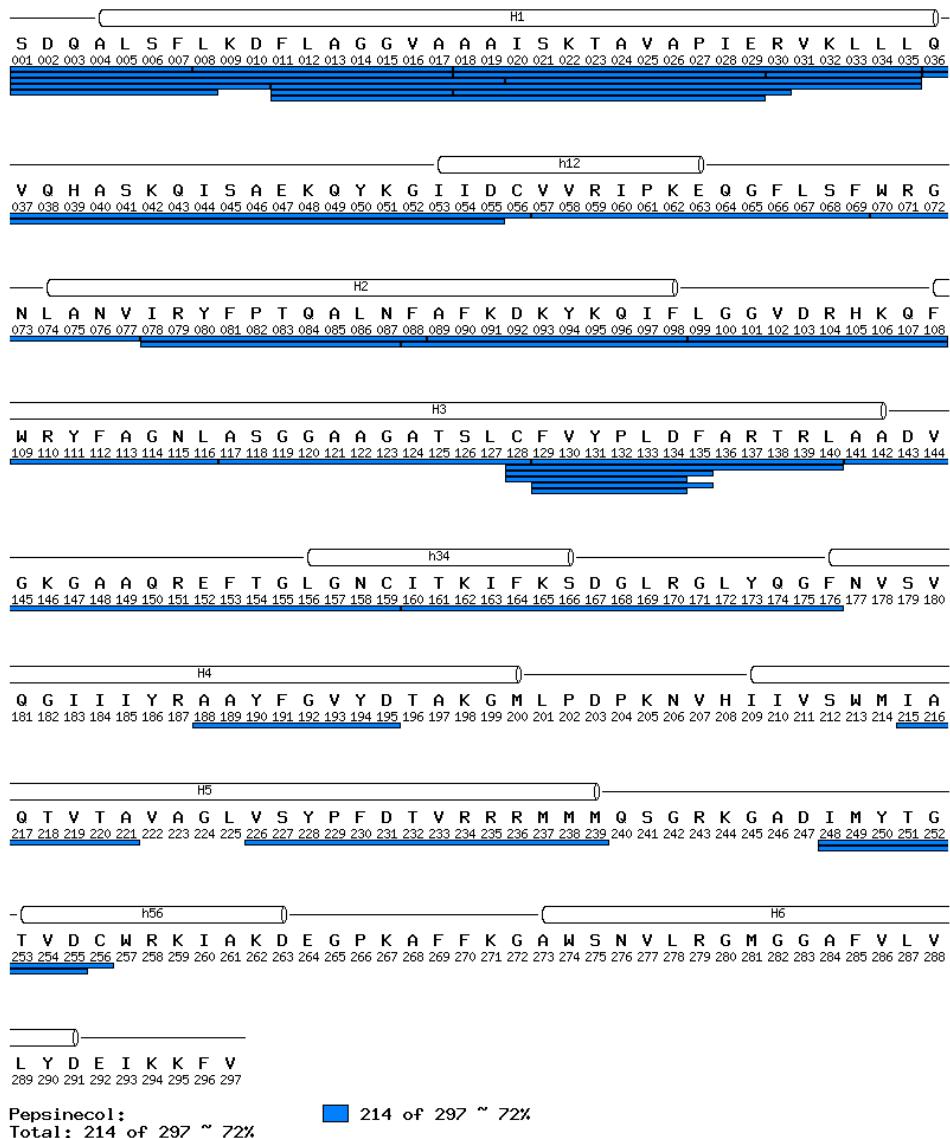
1   **SDQALSF****LK DFLAGGVAAA ISKTAVAPIE RVKLLLQVQH ASKQISAEKQY**  
51   **KGIIDCVVR IPKEQGFLSF WRGNLANVIR YFPTQALNFA FKDKYKQIFLG**  
101   **GVDRHKQFW RYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVGKGAAQ**  
151   **REFTGLGNC ITKIFKSDGL RGLYQGFNVS VQGIIIIYRAA YFGVYDTAKGM**  
201   **LPDPKNVHI IVSWMIAQTV TAVAGLVSYP FDTVRRRMM QSGRKGADIMY**  
251   **TGTVDCWRK IAKDEGPKA~~F~~ FKGAWSNVLR GMGGAFVVL YDEIKKFV**

**Figure 22 : Recouvrement de bAnc1p obtenu par analyse en MSMS des peptides générés par protéolyse acide.** Les zones couvertes par des peptides identifiés en MSMS sont représentées en gras et en rouge. **A.** digestion par la protéase XIII. **B.** Digestion par la Rp recombinante immobilisée. **C.** Digestion par la pepsine immobilisée.

Les peptides libérés par la protéolyse de bAnc1p par la pepsine, la protéase de type XIII et la rhizopuspepsine recombinante ont été identifiés par MSMS et leur masse vérifiée par ESI-ToF-MS. D'après les résultats obtenus en MSMS, la protéase de type XIII et la rhizopuspepsine recombinante produisent une protéolyse très incomplète du transporteur de nucléotides qui est localisée uniquement sur la partie N-terminale entre les acides aminés 1 et 45 (figures 22A et 22B) confirmant les données obtenues précédemment (voir Résultats, partie 1, paragraphe 3.1). Le transporteur est donc peu sensible à l'action de ces 2 protéases malgré l'optimisation, pour l'une d'entre elles, des conditions de protéolyse (protéase XVIII recombinante, protéase immobilisée, agents chaotropiques...)

A l'inverse, l'utilisation de la pepsine immobilisée permet d'obtenir un bien meilleur recouvrement atteignant 85 % (figure 22C). D'autres expériences ont été réalisées en combinant la pepsine aux deux autres protéases, sans améliorer significativement le recouvrement peptidique (résultats non montrés). La pepsine immobilisée sera donc la seule protéase utilisable dans notre approche expérimentale. Les peptides libérés après protéolyse du transporteur par la pepsine immobilisée ont été analysés par ESI-ToF-MS et leurs masses comparées à celles des peptides identifiés par MSMS dans les mêmes conditions expérimentales de digestion. Ce recouplement a permis de réaliser une carte peptidique contenant l'ensemble des peptides de bAnc1p observables lors des expériences de DXMS (figure 23).

Parmi tous les peptides identifiés, seuls 37 présentaient une qualité suffisante pour être utilisés dans les expériences de DXMS. Ils couvrent 72 % de la séquence peptidique de bAnc1p. Ils sont principalement localisés dans la moitié N-terminale de la protéine, c'est-à-dire entre les acides aminés 1 et 176. Deux régions présentent la particularité d'avoir un nombre important de peptides chevauchants. La première région s'étend entre les acides aminés 1 et 35 correspondant à l'hélice transmembranaire H1. La seconde, plus courte, correspond au fragment 128-140. L'utilisation de ces peptides dit « chevauchants » permettra d'affiner les données d'accessibilité et d'obtenir des informations localisées à la leucine 8, aux cystéines 56, 128 et 256 ainsi que des phénylalanines 88 et 135. Ils permettront aussi d'obtenir les données d'accessibilité des régions 9-11, 18-19, 135-140. La majorité des peptides identifiés par MSMS ont été observés sur les spectres ESI-ToF, mais les peptides couvrant la partie C-terminale du transporteur, c'est-à-dire allant du tryptophane 257 à la valine 297 ne sont pas visibles dans l'analyse en ESI-ToF-MS (figure 23). Ceci ne peut être expliqué que par les propriétés des analyseurs utilisés, qui diffèrent sur les deux appareils : une trappe ionique ou bien un analyseur par temps de vol. Néanmoins, il apparaît que le transporteur d'ADP/ATP bovin est plus sensible à la protéolyse dans sa partie N-terminale que dans la partie C-terminale, quelle que soit la protéase utilisée.



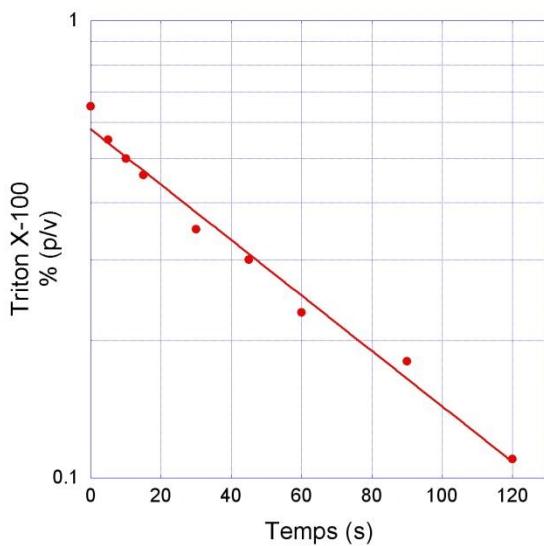
**Figure 23 : Carte peptidique de bAnc1p digérée par la pepsine immobilisée.** Les peptides identifiés en MSMS et observés ESI-ToF-MS sont représentés par les traits bleus disposés au dessous de la séquence peptidique de bAnc1p. Les hélices identifiées dans la structure 3D du transporteur sont représentées par des cylindres horizontaux disposés au dessus de la séquence primaire.

## 4. Mise au point des conditions d'extraction du détergent

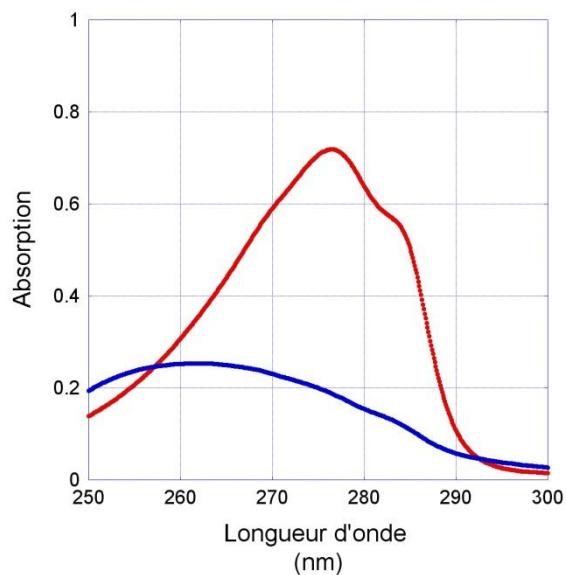
La forte sensibilité aux détergents des analyses en MS explique en grande partie pourquoi aucune protéine membranaire intégrale n'a encore été étudiée par DXMS dans des conditions physiologiques. L'adaptation de cette technique à l'étude du transporteur bAnc1p s'est donc révélée une étape-clé de notre approche. Pour répondre au problème d'élimination du détergent présent dans la préparation de transporteur purifié, différentes approches ont été envisagées afin de mettre au point des conditions optimales.

### 4.1. Extraction du détergent par adsorption sur BioBeads (BioRad) avant protéolyse acide

L'extraction du détergent par adsorption sur des billes de polystyrène (BioBeads, BioRad) est une technique fréquemment employée pour réduire la quantité de détergent présent dans une préparation de protéines membranaires (Holloway, 1973). Cette technique a déjà montré son efficacité sur ce transporteur, permettant sa cristallisation et l'obtention d'une structure 3D à haute résolution (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2003). Au bout de 2 heures en présence de 100 µg de BioBeads par mL, la fraction purifiée de bAnc1p ne contient plus que 0,1 % (p/v) de Triton X-100 (figure 24). La quantité de transporteur contenue dans la fraction au cours de la cinétique d'élimination du détergent a été suivie par dosage des protéines, et aucune perte de matériel n'a été mise en évidence. De plus la protéine a pu être concentrée suffisamment pour réaliser des expériences de deutération sans observer ici aussi de perte de protéine. Cependant plusieurs problèmes ont été rencontrés lors de l'analyse en spectrométrie de masse. D'une part, la présence d'une faible quantité de Triton X-100 résiduel reste suffisante pour rendre les spectres de masse inexploitables. D'autre part, il est nécessaire de rester à des concentrations de Triton X-100 supérieures à la CMC (environ 0,01 % p/v) afin de maintenir la protéine en solution pendant les expériences de deutération. Pour ces deux raisons, cette technique d'extraction ne s'est pas révélée adaptée au projet.



**Figure 24 : Cinétique d'adsorption par des BioBeads du Triton X-100 contenu dans une préparation de bAnc1p.** La concentration du détergent contenu dans la fraction non retenue sur colonne d'HTP a été suivie au cours du temps par spectroscopie UV à 275 nm après addition de 100 µg de BioBeads/mL de solution.



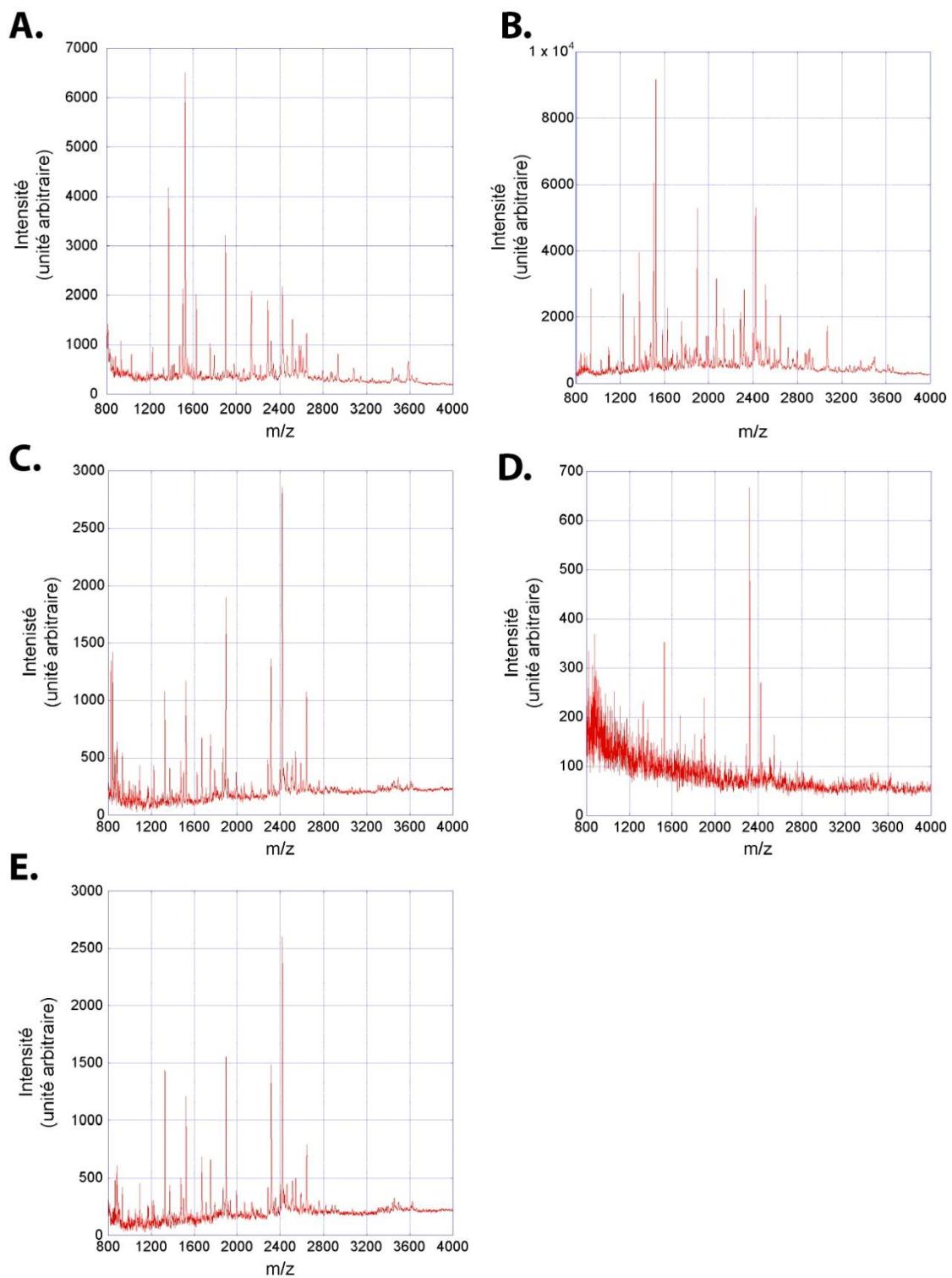
**Figure 25 : Extraction du Triton X-100 d'une préparation de bAnc1p par le dichlorométhane.** La préparation de transporteur a été analysée par spectroscopie UV entre 250 et 300 nm avant (rouge) et après (bleu) extraction par 3 volumes de DCM. L'échantillon avant extraction est dilué 20 fois avant analyse.

## 4.2. Extraction du détergent par des solvants organiques après protéolyse

La deuxième approche repose sur l'élimination du détergent après protéolyse de bAnc1p en milieu acide, en tirant parti de la solubilité des peptides dans un milieu aqueux sans détergent. En effet les peptides issus de la protéolyse des protéines membranaires peuvent être solubilisés sans détergent dans un mélange eau/acetonitrile et séparés selon leur hydrophobicité par chromatographie liquide (LC) en phase inverse. Dans l'étude des protéines solubles, les peptides produits par la digestion de la protéine d'intérêt sont fixés sur une micro colonne hydrophobe (Peptid-Trap, Michrom) et la préparation est ensuite dessalée par lavage à l'eau en milieu acide. Les peptides sont alors élusés et séparés par chromatographie en phase inverse avant leur analyse en MS (LC-MS). Dans le cas de l'étude de bAnc1p, la présence de détergent est nécessaire jusqu'à l'étape de protéolyse afin de maintenir la protéine en solution. Cependant, le détergent doit être éliminé avant l'analyse en MS afin de ne pas altérer la qualité des spectres enregistrés. Cette technique impose donc une élimination du détergent après l'étape de digestion et avant la séparation des peptides par LC, et s'effectuera juste après l'étape de dessalage. Il faut donc disposer d'un solvant capable d'extraire spécifiquement le détergent sans solubiliser les peptides. Pour cela, plusieurs solvants et plusieurs détergents comme le Triton X-100 et le LAPAO, capables d'extraire bAnc1p, ont été testés (Brandolin *et al.*, 1980; Hackenberg et Klingenberg, 1980).

### 4.2.1. Extraction du détergent à l'aide de solvants organiques

Certains solvants organiques comme le dichlorométhane (DCM) ou le chloroforme (TCM), peu miscibles à l'eau, sont capables d'extraire les détergents. Leur efficacité a été vérifiée en dosant après extraction le détergent contenu dans une préparation de transporteur d'ADP/ATP. Un volume de la fraction purifiée de bAnc1p (contenant 0,63 % (p/v) de Triton X-100) a été mélangé à 3 volumes de DCM. Les deux phases sont ensuite séparées par centrifugation et le détergent contenu dans la phase aqueuse a été dosé par spectroscopie UV à 275 nm (figure 25). Les résultats obtenus montrent que la concentration en détergent après une seule extraction est inférieure à 0,008 % (p/v). Cette très faible concentration en Triton X-100 valide l'efficacité de cette méthode. Des résultats similaires ont été obtenus avec du TCM. Un autre détergent, le LAPAO, utilisé lors de la cristallisation du transporteur, a également été testé. Celui-ci, bien que très soluble dans le DCM à pH 7, est totalement insoluble à pH 2,5, c'est-à-dire dans les conditions de contre-échange minimum adoptées pour les expériences de deutération. En effet, à ce pH, l'oxygène de la fonction amine-oxyde est protoné. L'amine est donc chargée positivement, ce qui exclut toute solubilité du LAPAO.

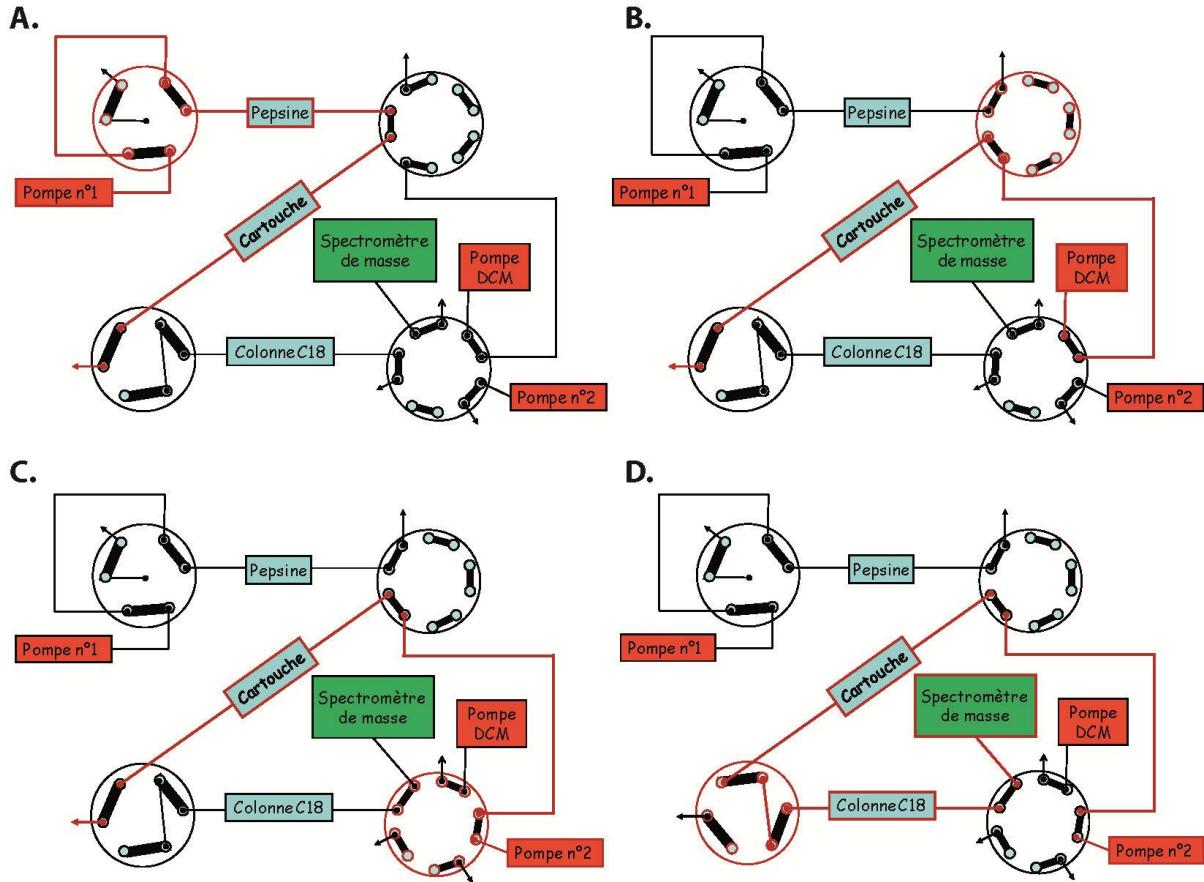


**Figure 26 : Analyse en MALDI-MS de la digestion de bAnc1p par la pepsine.** 500 pmoles de bAnc1p sont digérées par la pepsine en milieu acide. Après 2 minutes de digestion à 4°C les échantillons sont chargés sur une Micro-Trap et lavés par 200 µL d'eau, 500 µL de solvant (A : TCM, B : DCM, C : Acétone, D : méthanol, E : THF), puis 500 µL d'eau. Les peptides sont ensuite élués par 100 µL d'un mélange eau /acétonitrile/TFA (50/50/0,03 v/v) et la fraction est analysée en MALDI-MS entre 800 et 4000 m/z.

dans le DCM. Ce détergent est donc incompatible avec la méthode, et seul le Triton X-100 sera utilisé dans la suite de ce travail.

#### 4.2.2. Extraction du détergent sur phase solide

La mise au point de l'extraction du détergent sur phase solide par des solvants passe par le contrôle de la spécificité d'extraction du détergent, c'est-à-dire la capacité à éliminer le détergent sans solubiliser les peptides, et par l'analyse de la perte de deutération que peut causer cette étape. Afin de choisir le solvant organique offrant le meilleur compromis entre l'efficacité d'extraction du Triton X-100 et la conservation du plus grand nombre de peptides, 500 pmol de bAnc1p ont été digérées par la pepsine et fixées sur une Peptide-Micro-Trap<sup>TM</sup>. Cette dernière est ensuite traitée par 3 lavages successifs. Le premier lavage est destiné à éliminer les sels contenus dans la Peptide-Micro-Trap<sup>TM</sup>. Pour cela elle est lavée par 200 µL de l'éluant A (contenant 0,03 % (v/v) TFA dans de l'eau). Le second lavage est réalisé par 500 µL d'un des solvants organiques à tester (DCM, TCM, méthanol, acétone ou tétrahydrofurane) afin d'extraire le Triton X-100. Enfin, le solvant organique contenu dans le volume mort du montage est chassé par un troisième lavage de 500 µL de l'éluant A. Les peptides sont ensuite élués par 100 µL d'éluant B (composé d'eau/ACN/TFA, 50/50/0,03, v/v/v) et analysés par MALDI-ToF-MS (figure 26). Le détergent résiduel et la quantité de peptides présents dans la fraction éluée de la Peptide-Micro-Trap<sup>TM</sup> ont été détectés de manière qualitative à partir des spectres MALDI. Les spectres obtenus montrent que tous les solvants testés éliminent complètement le détergent présent dans l'échantillon (figure 26) et que les spectres des fractions peptidiques obtenues après lavages au TCM ou au DCM (figure 26A, 26B, respectivement) présentent des pics 2 à 3 fois plus intenses que ceux obtenus après lavages à l'acétone, au méthanol ou au THF (figure 26C, 26D et 26E, respectivement). Ceci peut être dû à une mauvaise spécificité d'extraction de ces trois solvants, du fait de leur plus forte miscibilité dans l'eau que le DCM ou le TCM. Cependant, la présence d'un hydrogène labile sur la molécule de TCM pouvant engendrer du contre-échange lors de l'étape de lavage a conduit à choisir le DCM pour la poursuite de l'étude.



**Figure 27: Montage de la ligne de chromatographie liquide pour son utilisation en DXMS.**

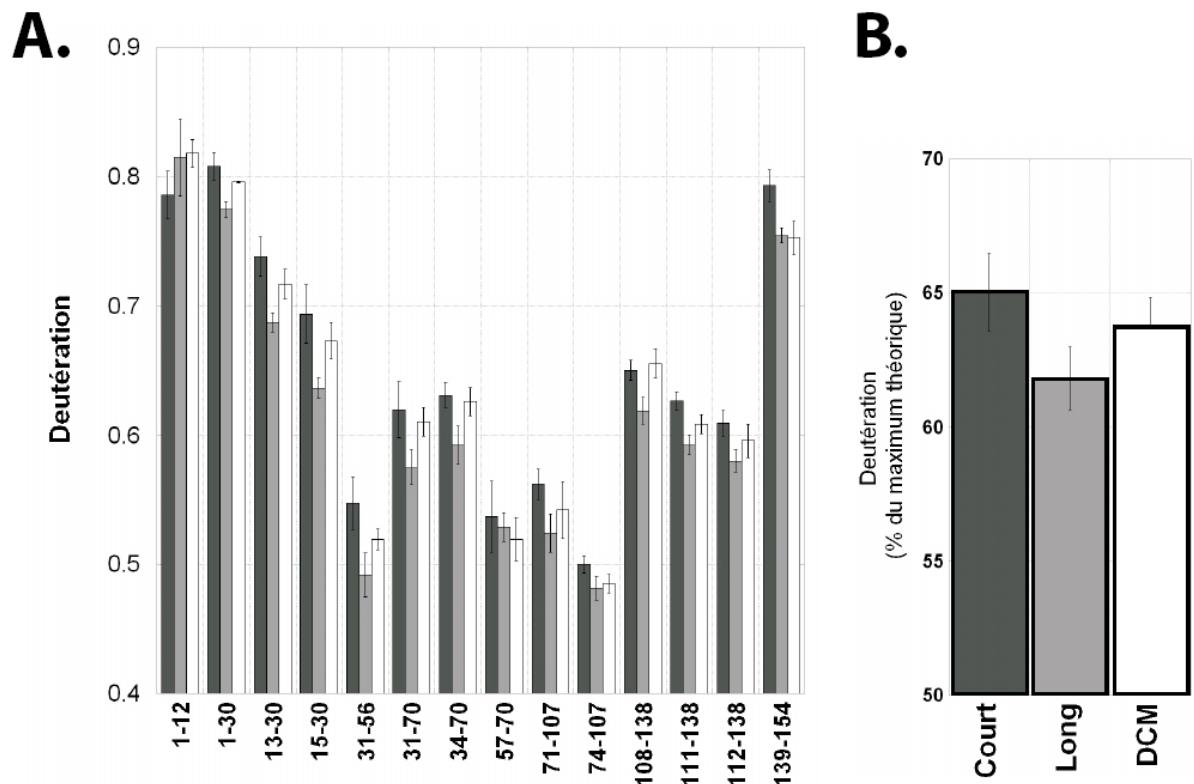
Les tuyaux en PEEK (traits noir) relient les différentes pompes (pompe DCM, pompe 1 ou 2) aux différentes colonnes (colonne de séparation (C18), piège à peptides (cartouche) et colonne de protéase (Pepsine) en les connectant à des ports (cercles bleus) à travers des vannes (cercles noirs). Le flux important est représenté en rouge ainsi que la vanne actionnée pour passer à une nouvelle étape. **A.** Etape de protéolyse. **B.** Etape d'extraction du détergent par le DCM. **C.** Etape de chasse du solvant résiduel. **D.** Etape de chromatographie d'analyse des peptides.

#### 4.3. Mise au point des conditions d'extraction du détergent avant l'analyse en spectrométrie de masse.

##### 4.3.1. Montage d'une ligne LC.

L'ajout d'une étape de lavage à l'aide d'un solvant organique engendre des complications au niveau de la reproductibilité des expériences et allonge considérablement le temps de manipulation nécessaire à la préparation de l'échantillon avant son analyse en MS. De plus, l'optimisation nécessaire de l'étape de protéolyse du transporteur bAnc1p nous a contraint à mettre au point un protocole spécifique utilisant une colonne de pepsine immobilisée (voir Résultats, partie I, 3). Afin de palier le problème de protéolyse et de limiter le temps nécessaire aux étapes de lavages qui pourraient entraîner une perte d'information par contre-échange, une ligne LC compatible avec l'utilisation de DCM et intégrant une colonne de protéase immobilisée a été conçue selon le schéma présenté dans la figure 27.

Le montage comprend 4 vannes Rheodyne ou Valco, dont une est destinée à l'injection. Le système a été conçu de telle sorte qu'il protège la colonne de protéase des solvants organiques et évite la re-contamination de la cartouche, servant à piéger les peptides, par du détergent une fois celle-ci lavée par le DCM. L'automatisation et la reproductibilité des lavages ont permis de réduire leurs durées. Les temps et les débits minimums nécessaires à l'obtention d'un lavage compatible avec l'analyse en MS ont pu être définis et correspondent à ceux utilisés dans les expériences présentées par la suite. La séquence utilisée est la suivante : la colonne de protéase et la cartouche sont équilibrées dans de l'éluant A, tandis que la colonne de séparation C18 est équilibrée à 15 % (v/v) dans l'éluant B. Une fois la boucle d'injection chargée, le contenu est injecté sur la colonne de protéase et les peptides générés sont piégés sur la cartouche sous un flux de A à 200 µL/min maintenu par la pompe n°1 pendant 1 minute (figure 27A). La cartouche est alors déconnectée de la colonne de protéase et lavée par un flux de DCM à 200 µL/min pendant 1 min 30 sec (figure 27B). La pompe n°2 prend ensuite le relai pour chasser le solvant de la cartouche en délivrant 300 µL/min de A pendant 1 min 30 sec. Pendant toutes ces étapes de digestion et de lavages, le flux sortant de la cartouche est éliminé. L'élution des peptides et leur séparation avant analyse en ESI-MS est réalisée par un gradient linéaire d'un mélange des éluants A et B allant de 15 % à 40 % (v/v) de l'éluant B en 25 minutes suivi par 5 minutes à 40 % (v/v) de l'éluant B à 50 µL/min (figure 27D).

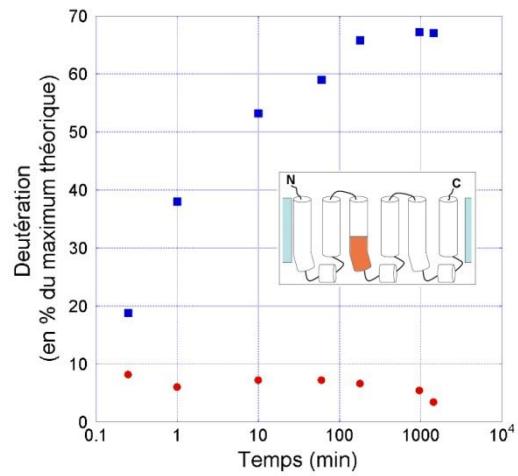


**Figure 28 : Deutération moyenne des peptides issus de la digestion de l'aMb par la pepsine par rapport à la deutération maximale théorique.** Les digestions ont été traitées par un lavage court (barres foncées), long (barres grises) ou par la séquence A/DCM/A (barres blanches). **A** Les analyses ont été réalisées en triplicat et la moyenne ainsi que l'écart type de la deutération obtenue pour chaque peptide ont été calculés et rapportés à la deutération maximale théorique. **B** Deutération moyenne obtenue pour chaque traitement calculée et rapportée à la deutération maximale théorique.

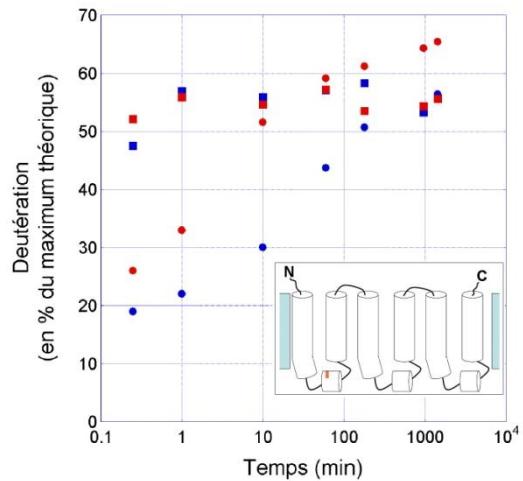
#### 4.3.2. Analyse de la perte de deutération induite par la séquence de lavage

Pour évaluer la perte de marquage, elle-même liée à la durée de la séquence de lavage et à l'utilisation de solvant organique, une protéine totalement deutérée et facilement hydrolysable en solution, l'apo-myoglobine (aMb), a été utilisée comme système témoin (Man *et al.*, 2007). Afin de rester dans des conditions expérimentales proches de celle employées par Man *et al.*, où la protéolyse de l'aMb s'effectuait en solution, la colonne de protéase a été remplacée par un simple tube dans cette expérience. Des digestions par la pepsine de 200 pmoles d'aMb totalement deutérée ont été réalisées pendant 2 min à 0°C puis injectées sur la ligne d'analyse immergée dans un bain de glace fondante afin de réduire le plus possible le contre-échange. Les échantillons ont subi soit la séquence de lavages décrite précédemment (1 min A, 1,5 min DCM, 1,5 min A), soit un lavage court d'une minute par du solvant A (correspondant au dessalage réalisé dans l'étude des protéines solubles), soit un lavage de 4 min avec du solvant A, correspondant à la durée de la séquence de lavage A/DCM/A (afin de mettre en évidence un éventuel effet du DCM). Pour chaque expérience, la quantité de deutérium incorporée dans les peptides les plus abondants a été analysée (figure 28A). Les résultats montrent une deutération moyenne comprise entre 62 et 65 % de la deutération maximale suivant le type de lavage utilisé, ainsi qu'un écart-type inférieur à 1,5 % (figure 28B). De plus, ces expériences montrent une bonne reproductibilité et un taux de deutération satisfaisant. Les peptides qui ont subi le lavage long avec du solvant A montrent une perte de deutération supplémentaire peu importante, d'environ 3 % par rapport à la perte de deutération observée avec seulement un dessalage (figure 28B). La séquence de lavage au DCM induit une perte de deutération plus faible que celle engendrée par un lavage de même durée avec du solvant A et comprise dans l'erreur expérimentale. Ce résultat peut être expliqué par l'absence d'atome d'hydrogène échangeable sur la molécule de DCM.

La mise en place d'une ligne LC pour réaliser la séquence de lavages destinée à éliminer le détergent a permis d'éviter une perte significative de deutération des peptides. Nous pouvons noter que ces conditions de lavage, pleinement compatibles avec celles dictées par la technique de DXMS, devraient pouvoir être étendues facilement à d'autres protéines membranaires solubilisées dans du Triton X-100.



**Figure 29 : Cinétiques de deutération du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial.** Cinétique de marquage du peptide 129-140 dans les complexes transporteur-CATR (ronds rouges) et transporteur-BA (carrés bleus) réalisée à 0°C. L'encart représente la localisation de la région analysée dans la structure éclatée de bAnc1p.



**Figure 30 : Cinétiques de deutération du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial.** Cinétique de marquage du peptide 36-56 dans les complexes bAnc1p-CATR (rond) et bAnc1p-BA (carrés), à 0°C (bleu) et à température ambiante (rouge). La région analysée est localisée dans la structure éclatée de bAnc1p présente dans l'encart.

## 5. Mises au point des conditions d'échange

Une cinétique préliminaire de deutération des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA isolés en présence de Triton X-100 a été suivie pendant 24 heures à 4°C et à température ambiante afin de définir la gamme de temps nécessaire au marquage de la protéine et de mettre en évidence des différences de deutération entre les complexes protéine-inhibiteur. C'est le cas par exemple pour la région 129-140 (figure 29). En effet, cette zone est fortement deutérée en présence de BA (60 % du maximum théorique après 1 heure 40 min de deutération) et très peu deutérée en présence de CATR (< 10 % du maximum théorique). Ces résultats montrent tout d'abord que des différences dans l'état conformationnel adopté par bAnc1p en fonction des différents inhibiteurs sont observables à l'aide de cette méthode. De plus, plusieurs heures de deutération peuvent être nécessaires pour obtenir la deutération maximale d'une région donnée, comme la région 129-140 dans le complexe bAnc1p-BA.

La deutération du peptide 36-56 présente elle-aussi une cinétique de deutération différente en fonction des complexes analysés (figure 30). Cette différence, qui devient rapidement nulle (au bout de 10 minutes) à température ambiante, reste nettement visible (jusqu'à 1 heure) quand l'expérience est effectuée à 4°C. Pour cette raison et pour éviter une éventuelle dénaturation de la protéine au cours de la cinétique de deutération, les expériences s'effectueront à 4°C et la cinétique sera menée sur 3 heures au maximum.

## 6. Conclusion

L'analyse du transporteur d'ADP/ATP en DXMS a nécessité plusieurs mises au point. Tout d'abord, il a fallu développer les outils biochimiques indispensables à la protéolyse de bAnc1p.

- Dans un premier temps nous avons amélioré la qualité d'une des 3 protéases utilisables dans des conditions acides et de basses températures : la protéase XVIII que nous avons produit de manière hétérologue. Deuxièmement, nous avons amélioré l'efficacité de la pepsine et de la protéase XVIII recombinante en les fixant à une résine afin de réaliser la protéolyse en phase hétérogène. Même si la protéase XVIII recombinante s'est révélée efficace pour digérer des protéines solubles telle que l'aMb, elle n'a malheureusement pas permis d'améliorer la protéolyse du transporteur bAnc1p. Ainsi, seule la pepsine, utilisée en colonne en présence d'un agent chaotropique comme le chlorure de guanidine, a permis d'obtenir des peptides recouvrant environ 70 % de la séquence primaire en acides aminés du transporteur d'ADP/ATP bovin.

- Une fois les outils de protéolyse mis au point, nous avons cherché à éliminer spécifiquement le détergent de la préparation. Les différentes approches que nous avons explorées nous ont amenés à mettre au point une séquence de lavage à l'aide de solvants organiques (DCM ou TCM) permettant d'extraire efficacement le détergent de la préparation tout en conservant un plus grand nombre et une plus grande quantité de peptides d'intérêt.

En résumé, tous les développements apportés à la technique de DXMS ont permis l'obtention de la première carte peptidique d'une protéine membranaire intrinsèque, le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin, rendant donc possible l'analyse comparative des complexes transporteur-inhibiteur. La méthode mise au point pour éliminer le détergent n'est pas spécifique au transporteur et devrait pouvoir être applicable à d'autres protéines membranaires répondant à plusieurs critères : une protéolyse possible dans les conditions dictées par la méthode de DXMS et un détergent soluble dans le DCM ou le TCM en milieu acide.

## PARTIE 2 : RESULTAT DES CINETIQUES D'ECHANGE H/D

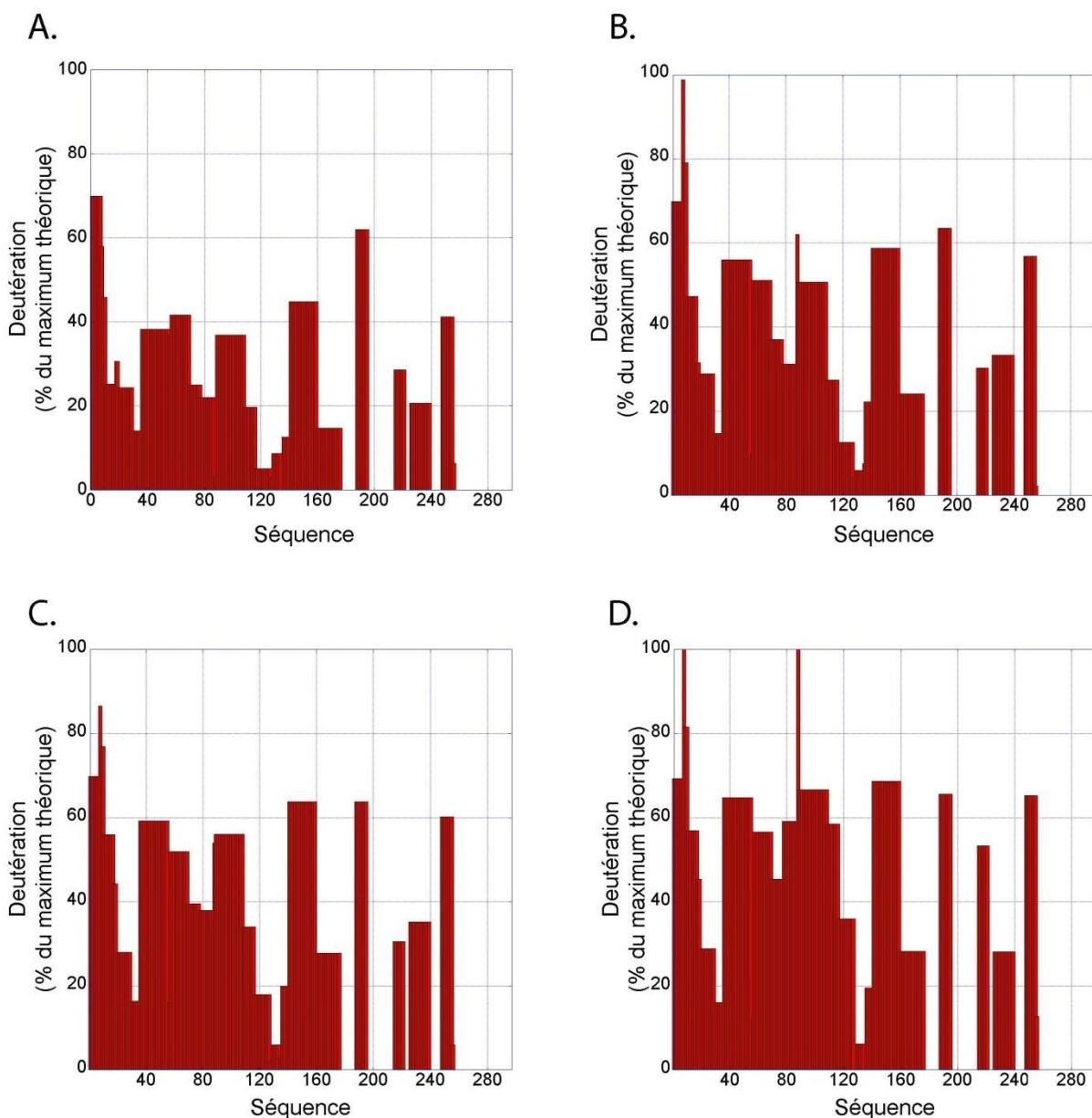
Après inhibition du transporteur par le CATR ou le BA, les complexes protéine-inhibiteurs ont été extraits par 1 % (v/v) Triton X-100, puis purifiés par chromatographie sur colonne d'HTP en absence de phosphate. La fraction non-retenue a été collectée et concentrée jusqu'à 9 mg/mL. Les complexes ont été dilués dans un tampon contenant du D<sub>2</sub>O afin d'être marqués au deutérium et des aliquotes ont été prélevées à des intervalles de temps définis, diluées dans un milieu acide puis congelées rapidement dans l'azote liquide afin de fixer le marquage. Les échantillons ont été analysés ultérieurement en ESI-ToF-MS après protéolyse sur une colonne de pepsine immobilisée et élimination du détergent par le DCM. Pour chaque point de la cinétique de marquage, les spectres de masse correspondant à chacun des peptides du transporteur ont été extraits et la masse moyenne de l'enveloppe isotopique a été calculée à l'aide du logiciel MagTran pour suivre l'incorporation du deutérium.

## 1. Validation de l'approche à l'aide des données biochimiques et structurales du transporteur

Afin de valider notre approche, nous avons suivi la deutération du complexe transporteur-CATR. Les résultats obtenus pour la partie de la protéine la mieux définie spatialement ont été comparés d'une part aux données de structure 3D du transporteur et d'autre part aux données biochimiques disponibles sur ce complexe.

### 1.1. Deutération du complexe transporteur-CATR

Nous avons analysé les niveaux de deutération des peptides obtenus après protéolyse du complexe transporteur-CATR en fonction des données de structure 3D disponibles. Pour la première moitié de la protéine, zone la mieux couverte par les peptides identifiés, les résultats montrent clairement une plus faible deutération des zones comprises entre les acides aminés 10 et 35, 70 et 90, 110 et 140, correspondant respectivement dans la structure 3D de bAnc1p-CATR aux hélices transmembranaires H1, H2 et H3 (figure 31). Les autres parties de la protéine, qui correspondent soit aux parties situées dans l'espace intermembranaire soit aux boucles et aux hélices situées du côté matriciel, présentent une deutération plus rapide et plus importante. Il s'agit de l'extrémité N-terminale et de la première boucle située dans l'espace intermembranaire (c1), comprise entre les acides aminés 99 et 108, ainsi que des boucles matricielles m1 (résidus 36 à 73), m2 (résidus 141 à 176) et m3 (résidus 240 à 272) qui sont deutérées de 50 à 70 % au bout de seulement 5 minutes



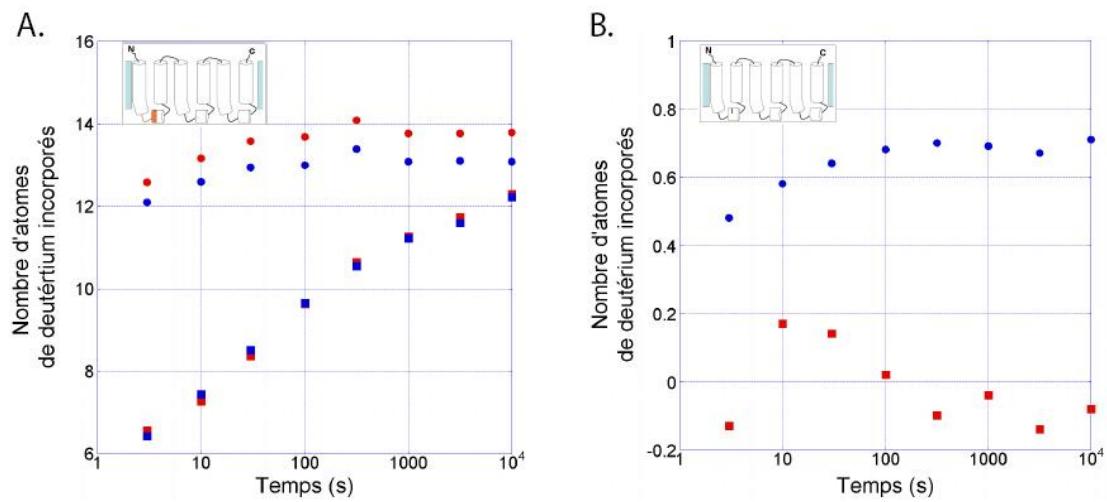
**Figure 31 : Cinétiques de deutération du complexe bAnc1p-CATR.** Le pourcentage de deutération de chaque peptide par rapport à la deutération maximale théorique a été représenté pour 4 temps différents : 10, 300, 1000 et 10000 secondes, respectivement **A, B, C, D.**

(figure 31B). Les résultats obtenus montrent que l'hélice H2 (résidus 74 et 98) se deutèrare plus vite que les hélices voisines H1 (résidus 4 à 35) et H3 (résidus 108 à 142) (figure 31) ce qui suggère une plus grande accessibilité de cette hélice au deutérium au sein du complexe bAnc1p-CATR.

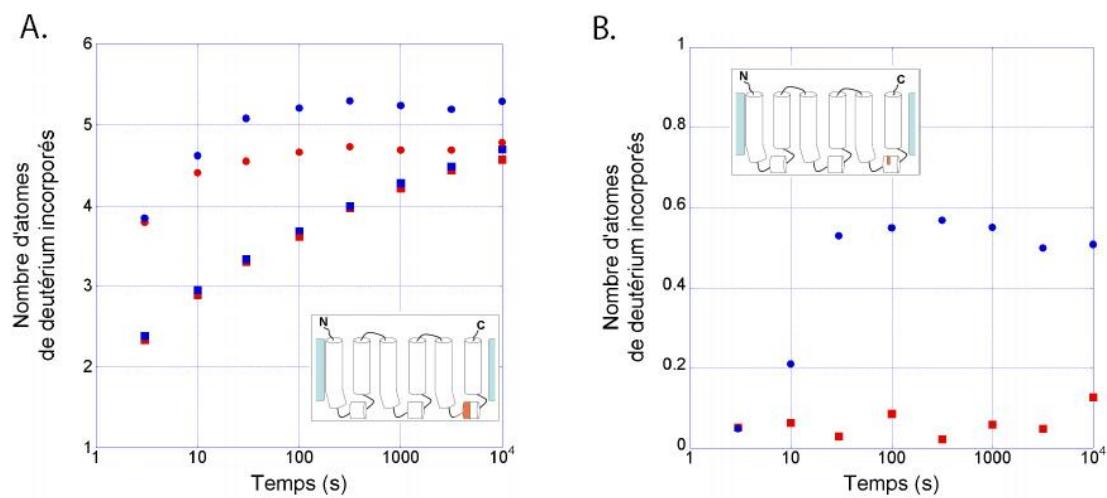
Malgré l'utilisation d'un niveau de deutération maximal calculé sur un échange total de toutes les liaisons amides, et donc sans prendre en compte les variations de deutération dues à un contre-échange variant d'un peptide à un autre, le ralentissement de la deutération observé pour certains peptides est attribuable sans équivoque à une diminution de l'accessibilité de la chaîne peptidique au sein de la micelle mixte de détergents et de lipides. On observe de manière assez précise cette diminution pour les hélices transmembranaire H1 et H3 (respectivement des résidus 4 à 35 et 108 à 142) lorsque l'on progresse vers les régions hydrophobes de l'hélice et donc vers le cœur de la membrane. En effet, après 5 minutes de deutération, les régions 2-7, 8, 9-10, 12-17, 18-19, 21-29, et 31-35 de l'hélice H1, calculées soit directement grâce aux peptides obtenus soit par retranchement de peptides chevauchants, présentent respectivement 79 %, 99 %, 55 %, 50 %, 30 %, 25 % et 15 % de deutération (figure 31B). Cette baisse de deutération est aussi visible pour l'hélice H3. En effet, la boucle située dans l'espace intermembranaire, reliée à l'extrémité N-terminale de l'hélice H3, présente une deutération moyenne de 50 %, alors que celle de l'extrémité N-terminale de cette même hélice, plus enfoncée dans la membrane, n'est que de 27 % (figure 31B). La deutération des régions suivantes continue de décroître jusqu'à 7 % au fur et à mesure que l'on progresse vers les régions hydrophobes. Enfin, la partie C-terminale de cette hélice, connectée à la boucle matricielle m2, présente une deutération un peu plus élevée, d'environ 20 %, en accord avec l'accessibilité plus élevée observée pour cette région (figure 31B).

## 1.2. Deutération des cystéines 56, 128 et 256

Plusieurs études menées sur le transporteur d'ADP/ATP bovin à l'aide de différents réactifs chimiques ont mis en évidence des différences dans le marquage chimique des cystéines associées aux changements de conformation induits par la fixation des inhibiteurs. De manière intéressante, la digestion du transporteur par la pepsine libère plusieurs peptides chevauchants dont l'une des extrémités est une cystéine. C'est le cas pour les résidus 56, 128 et 256. L'analyse de la deutération des peptides chevauchants permet de calculer la quantité de deutérium incorporé dans chacune des différentes cystéines en fonction du complexe étudié. Ainsi les données d'accessibilité au deutérium, obtenues pour les 3 cystéines, ont été comparées à celles obtenues dans les études du marquage chimique de ces mêmes résidus (Boulay et Vignais, 1984; Majima *et al.*, 1993; Majima *et al.*, 1994).



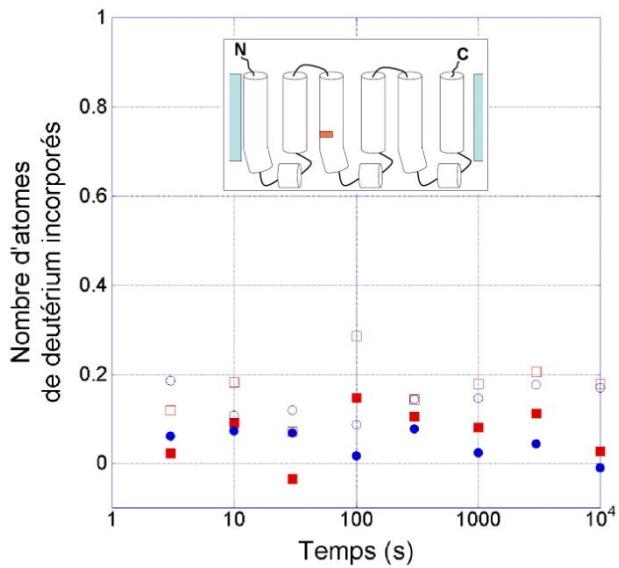
**Figure 32 : Cinétiques de deutération des peptides 36-55 et 36-56.** **A.** Nombre moyen d'atomes de deutérium incorporés dans les peptides 36-55 (symboles bleus) et 36-56 (symboles rouges) dans le complexe-CATR (carrés) et le complexe transporteur-BA (ronds). **B.** Nombre moyen d'atomes de deutérium incorporés au niveau de la cystéine 56 dans le complexe transporteur-CATR (carrés rouges) et le complexe transporteur-BA (ronds bleus). Les encarts montrent la localisation des régions analysées (en orange) dans la structure éclatée de bAnc1p.



**Figure 33 : Cinétiques de deutération des peptides 248-255 et 248-256.** **A.** Nombre moyen d'atomes deutérium incorporés dans les peptides 248-255 (symboles rouges) et 248-256 (symboles bleus) dans le complexe-CATR (carrés) et le complexe transporteur-BA (ronds). **B.** Nombre moyen d'atomes de deutérium incorporés au niveau de la cystéine 256 dans le complexe transporteur-CATR (carrés rouges) et le complexe transporteur-BA (ronds bleus). Le peptide 248-256 ainsi que la cystéine 256 sont localisés en orange dans la structure éclatée de bAnc1p au niveau de l'encart.

Les cinétiques de deutération des cystéines 56 et 256 localisées dans les hélices matricielles sont présentées sur les figures 32 et 33. Les peptides 36-55 et 36-56 présentent des cinétiques de deutération similaires au sein d'un même complexe (figure 32A) mais nettement différentes en fonction de l'inhibiteur utilisé. En effet l'incorporation du deutérium est nettement plus lente dans le complexe transporteur-CATR que dans le complexe transporteur-BA. Dans ce dernier, 13 atomes de deutérium ont été incorporés au bout de 30 secondes alors que 8 seulement l'ont été dans le complexe transporteur-CATR. Ces résultats montrent une accessibilité au solvant plus importante pour cette région du transporteur, une fois complexé au BA. Au sein du complexe transporteur-CATR, le même nombre d'atomes de deutérium a été incorporé dans les peptides 36-55 et 36-56 (figure 32A), ce qui signifie que la deutération de la liaison amide située du côté N-terminal de la cystéine 56 est nulle. Un résultat similaire peut être obtenu après retranchement de la deutération du peptide 36-55 à celle du peptide 36-56 (figure 32B). Dans le complexe transporteur-BA, ces peptides présentent un nombre de deutériums incorporés différent d'environ 0,7 au bout de 30 secondes et qui reste stable dans la gamme de temps testée pour cette cinétique (figure 32B). Ce résultat montre que cette cystéine est nettement plus accessible dans le complexe transporteur-BA que dans le complexe transporteur-CATR. L'inaccessibilité de la cystéine 56 dans le complexe transporteur-CATR et son démasquage dans le complexe transporteur-BA sont en accord avec l'alkylation de la chaîne latérale de cette cystéine par le NEM et l'EMA préférentiellement en présence de BA (Boulay et Vignais, 1984; Majima *et al.*, 1994). Ces résultats sont aussi en accord avec la structure 3D obtenue pour le complexe transporteur-CATR qui montre que cette liaison peptidique est masquée du solvant par d'autres acides aminés (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).

Des observations similaires ont été faites au niveau de la cystéine 256 analysée grâce aux peptides 248-255 et 248-256 (figure 33). Ils présentent en effet une incorporation de deutérium plus lente en présence de CATR qu'en présence de BA, montrant ainsi un démasquage de cette zone induit par la fixation de ce dernier (figure 33A). Comme observé précédemment pour la cystéine 56, le peptide 248-256 présente un nombre d'atomes de deutérium incorporés identique à celui du peptide 248-255 dans le complexe transporteur CATR, et supérieur d'environ 0,5 dans le complexe transporteur-BA (figure 33B). Ces résultats diffèrent cependant de ceux obtenus après marquage à l'EMA de la cystéine 256 dans les complexes bAnc1p-inhibiteurs, qui présentent cette cystéine comme très peu accessible dans les deux complexes (Majima *et al.*, 1994). Cette différence dans les résultats pourrait avoir deux explications. Premièrement, les marqueurs utilisés dans ces deux expériences sont de taille et de nature chimique différente. La molécule de D<sub>2</sub>O est plus petite que l'EMA et diffuse mieux à travers les environnements hydrophobes. Ainsi le marquage réalisé dans les expériences de DXMS est moins sensible à l'environnement électronique et stérique local de la



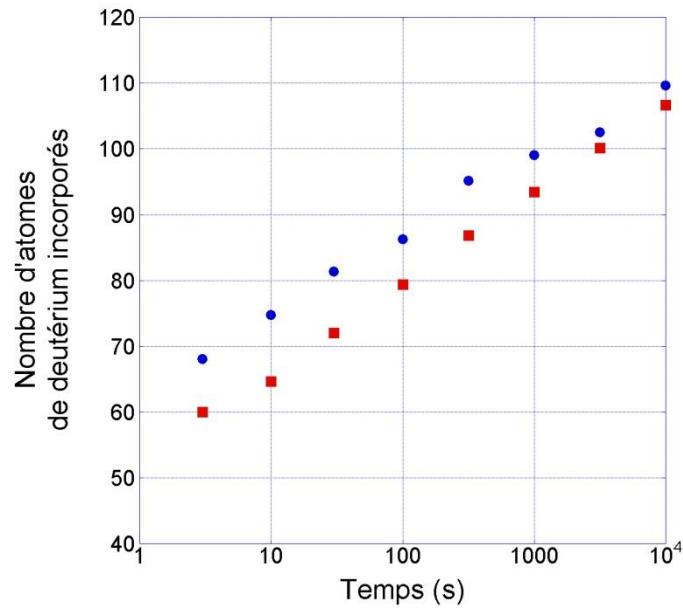
**Figure 34 : Cinétiques de marquage au deutérium de la cystéine 128 située dans l'hélice H3 d'après la structure 3D de bAnc1p (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).** Le nombre moyen d'atomes de deutérium incorporé par la cystéine 128 a été déduit des peptides 128-134 et 129-134 (symboles pleins) ou des peptides 128-135, 129-135 (symboles vides) issus de la protéolyse des complexes transporteur-CATR (carrés rouges) et transporteur-BA (ronds bleus). Les encarts représentent en orange la localisation de cet acide aminé dans la structure éclatée de bAnc1p.

région marquée. Deuxièmement, les marquages par l'EMA et par le D<sub>2</sub>O ont été réalisés respectivement sur des membranes mitochondriales et dans des micelles de détergent et donc dans des conditions expérimentales différentes. Ce résultat pourrait ainsi illustrer simplement une exposition différente de cette zone de la protéine dans la membrane et dans la micelle.

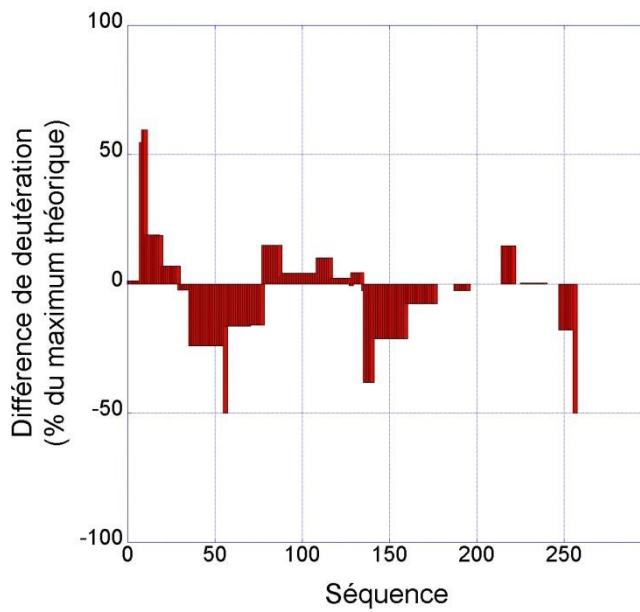
La cystéine 128, analysable de manière précise à l'aide de peptides chevauchants, n'est pas située dans une hélice matricielle mais dans un segment transmembranaire (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Les données obtenues sur cet acide aminé en comparant la deutération des couples de peptides 128-134, 129-134 et 129-135, 128-135 montrent un très faible taux de deutération de la liaison peptidique C128-F129 dans les deux complexes (figure 34). Ces données sont corrélées à la faible exposition du résidu cystéine 128 observée par marquage chimique quel que soit l'inhibiteur testé (Boulay et Vignais, 1984; Majima *et al.*, 1993; Majima *et al.*, 1994).

### 1.3. Conclusion

Les données obtenues au cours de l'étude du complexe bAnc1p-CATR montrent une très bonne corrélation avec les données biochimiques et structurales disponibles dans la littérature. En particulier, les éléments de topographie de la protéine déduits du niveau de deutération des peptides sont en accord avec les données structurales. De plus les niveaux d'accessibilité au deutérium des cystéines présentes dans le transporteur sont corrélés aux résultats décrits dans la littérature, à l'exception de la cystéine 256. L'ensemble de ces données valide notre approche expérimentale et nous permet l'étude par DXMS du complexe bAnc1p-BA *via* une analyse comparative des deux complexes.



**Figure 35 : Deutération globale du transporteur d'ADP/ATP en complexe avec le CATR ou le BA.** Le nombre moyen d'atomes de deutérium incorporés dans le transporteur en complexe avec le CATR (carrés rouges) ou le BA (ronds bleus) a été calculé en sommant les quantités de deutérium présent dans chaque peptide à un temps donné.



**Figure 36 : Différence de deutération entre les complexes transporteur-inhibiteurs.** La différence de deutération de chaque région [deutération bAnc1p-CATR – deutération bAnc1p-BA] a été calculée en retranchant le pourcentage de deutération obtenu pour chaque région du complexe transporteur-BA à celui de la même région pour le complexe transporteur-CATR après 30 secondes.

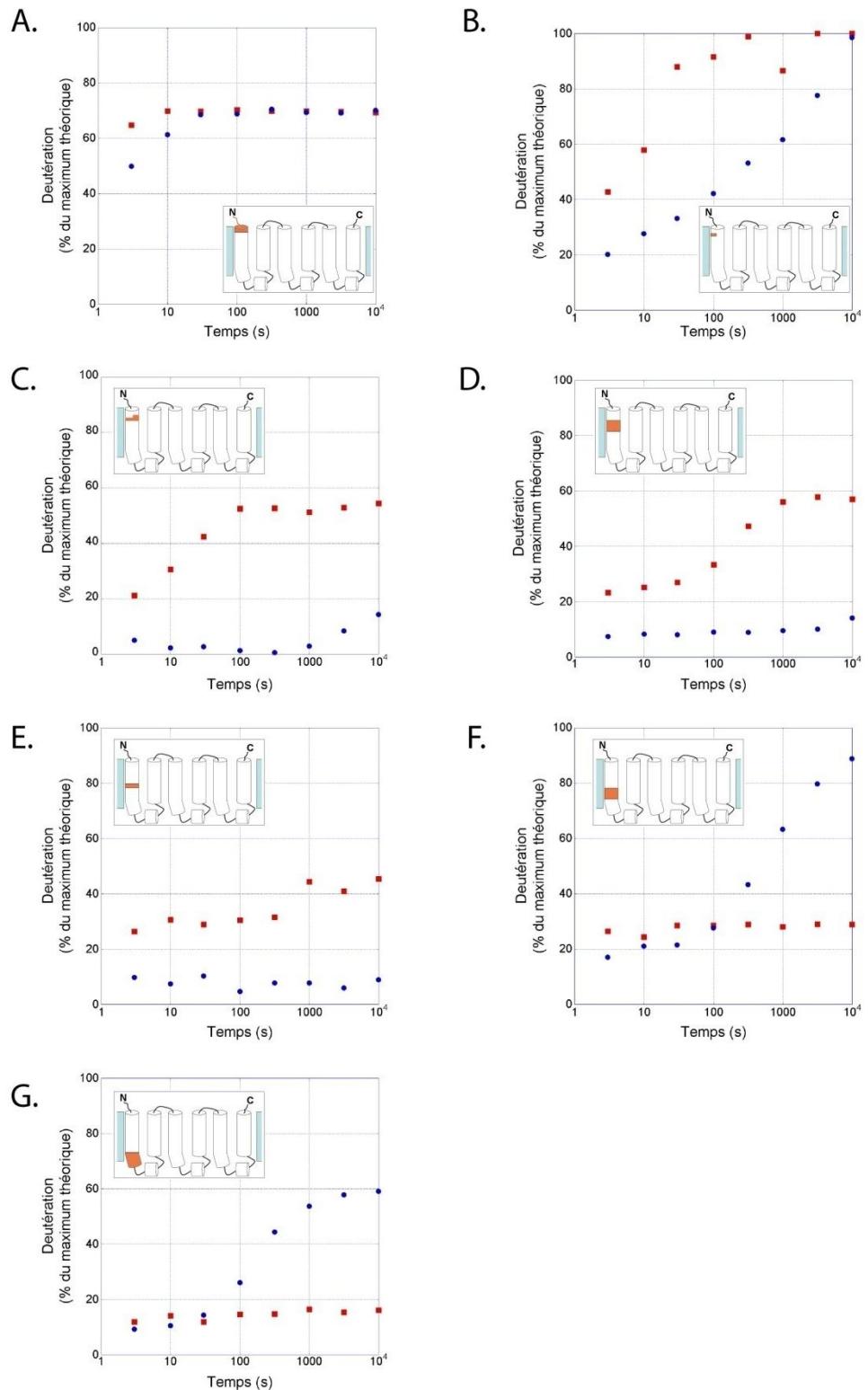
## 2. Analyse des cinétiques d'échange H/D pour les différents complexes protéine-inhibiteurs

### 2.1. Analyse globale de la deutération des différents complexes

Même si le transporteur n'a pas pu être analysé avant l'étape de protéolyse, l'accessibilité globale au solvant de chaque complexe transporteur-inhibiteur peut être évaluée à partir de la deutération des peptides analysés (figure 35). Le nombre d'atomes de deutérium incorporés au niveau du transporteur (dans les zones couvertes par les peptides identifiés) augmente au cours du temps, passant de 60 au bout de 3 secondes à plus de 100 après 2 heures 30 minutes de deutération pour le complexe bAnc1p-CATR. Le complexe transporteur-BA montre une accessibilité au deutérium plus importante, présentant jusqu'à 10 atomes de deutérium supplémentaires aux temps 10 s, 30 s, 300 s (figure 35). Ce démasquage est en accord avec les données biochimiques qui mettent en évidence une plus grande accessibilité du complexe bAnc1p-BA dans la membrane à des protéases (Brandolin *et al.*, 1989; Marty *et al.*, 1992).

### 2.2. Deutération différentielle des complexes transporteur-CATR et transporteur-BA

Afin d'observer les variations de deutération induites par la fixation de l'un ou l'autre des inhibiteurs, la différence [deutération bAnc1p-CATR – deutération bAnc1p-BA] a été calculée pour chaque peptide (figure 36). Dans une première observation on peut voir que les régions du transporteur situées entre les acides aminés 1 et 35, 78 et 140, 215 et 221, correspondant respectivement dans la structure 3D aux hélices H1, H2, H3, et à une partie de l'hélice H5, sont plus deutérées dans le complexe transporteur-CATR que dans le complexe transporteur-BA (figure 36). A l'inverse, les régions situées du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale sont plus accessibles au deutérium dans le complexe transporteur-BA. Il s'agit des régions de la protéine situées entre les acides aminés 36 et 77, 141 et 176, 248 et 256, correspondant aux trois boucles matricielles (figure 36). Ces résultats suggèrent que dans le complexe transporteur-BA, les régions situées du côté de l'espace intermembranaire sont moins accessibles au solvant que dans le complexe transporteur-CATR, et inversement pour les régions situées du côté matriciel. Les données d'accessibilité obtenues sur les différents complexes sont détaillées dans la suite de ce manuscrit, en commençant par les hélices transmembranaires (impaires puis paires), puis en exposant celles des boucles matricielles m1, m2 et m3.



**Figure**

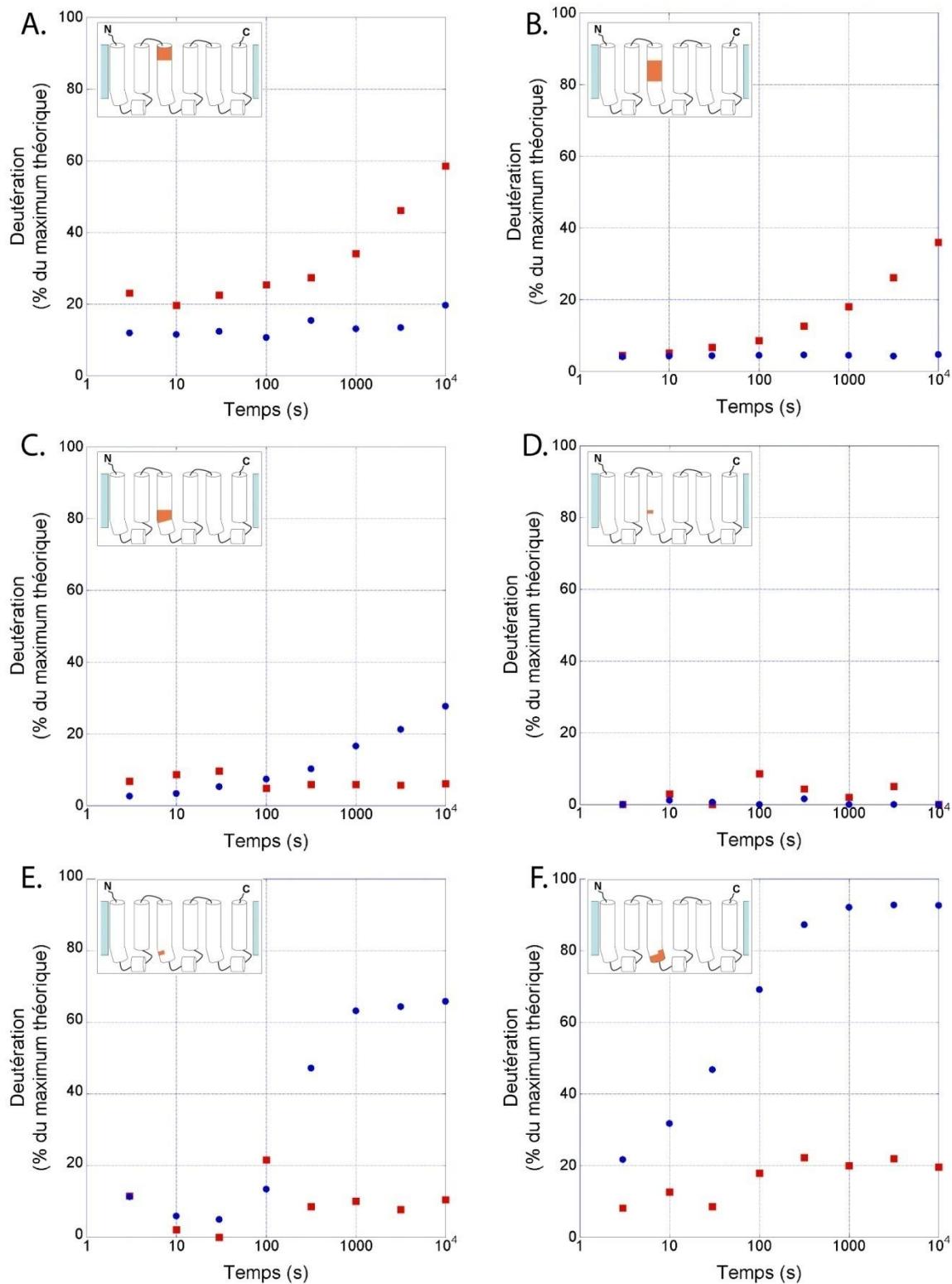
**37 :**

**Cinétiques de deutération de l'hélice H1.** La deutération des régions 2-7 (**A**), 8 (**B**), 9-11 (**C**), 12-17 (**D**), 18-19 (**E**), 21-29 (**F**) et 31-35 (**G**) recouvrant l'hélice H1 a été suivie dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (rond bleus). Ces régions sont localisées en orange dans la structure éclatée de bAnc1p représentée au niveau de l'encart.

## 2.3. Analyse des hélices transmembranaires impaires

### 2.3.1. Hélice H1 (résidus 1 à 35)

L'analyse détaillée de la deutération de la première hélice transmembranaire (figure 37) permet de mettre en évidence des accessibilités au deutérium différentes selon les complexes bAnc1p-inhibiteur analysés. La partie N-terminale, tout d'abord, montre une très forte et très rapide deutération, atteignant 75 % du maximum théorique au bout de 30 secondes dans les deux complexes, et restant constante pour des temps plus longs (figure 37A). Malgré tout, on note un léger retard dans la deutération de cette région dans le complexe transporteur-BA, visible seulement dans les tous premiers temps de l'expérience (3 et 10 secondes). Ce ralentissement de la deutération devient de plus en plus important au fur et à mesure que l'on progresse le long de la chaîne peptidique. En effet, la deutération de la leucine 8 est nettement plus lente dans le complexe transporteur-BA (atteignant seulement 40 % du maximum théorique au bout 100 secondes de deutération) que dans le complexe transporteur-CATR où cet acide aminé est complètement deutéré après 100 secondes de marquage (figure 37B). La différence entre les complexes transporteur-inhibiteurs est encore plus marquée au niveau de la région 9-11 (figure 37E). En effet, cette région ne se deutère pas dans le complexe bAnc1p-BA, alors que dans le complexe bAnc1p-CATR elle atteint son maximum (55 % du maximum théorique) au bout de seulement 100 secondes (figure 37C). Les régions qui suivent voient une diminution progressive de leur accessibilité dans le complexe bAnc1p-CATR. En effet, la deutération maximale du complexe transporteur-CATR décroît progressivement, passant de 60 % à 40 %, puis à 30 %, et finalement à 20 % respectivement pour les régions 12-17, 18-19, 21-29 et 31-35, après 16 minutes de deutération (1000 secondes). Ce résultat montre une protection de plus en plus importante des régions matricielles de l'hélice H1 en présence de CATR (figures 37C à 37G). A l'inverse la deutération du complexe-transporteur-BA reste faible ou nulle pour la région comprise entre les acides aminés 9 et 19 (figures 37C et 37D). Contrairement aux résultats obtenus avec le complexe bAnc1p-CATR, la partie C-terminale de l'hélice H1 est nettement deutérée dans le complexe transporteur-BA et les régions 21-29 et 31-35 présentent respectivement un marquage atteignant 80 % et 55 % après 16 minutes de marquage (figures 37F et 37G). Ces résultats montrent que les régions ayant des niveaux de deutération comparables sont décalées dans l'espace de 7 ou 8 résidus dans les deux complexes examinés. En effet, la deutération de la région 18-19 en présence de CATR correspond approximativement à la deutération de la région 9-10 dans le complexe transporteur-BA (figures 37C et 37E). On peut faire le même parallèle avec la région 20-29 du complexe transporteur-CATR et 11-19 dans le complexe



**Figure 38 : Cinétiques de deutération de l'hélice H3.** Le niveau de deutération de cette hélice a été suivi dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (rond bleus) par analyse de la deutération des régions 110-116 (A), 118-127 (B), 128 (C), 129-134 (D), 135 (E), 135-140 (F). Leurs positions dans la séquence sont représentées en orange sur la structure éclatée de bAnc1p présentée dans l'encart.

transporteur-BA (figure 37D et 37F). Cette observation pourrait être expliquée par un déplacement de l'hélice H1 dans la membrane vers l'espace matriciel en présence de BA et inversement vers l'espace intermembranaire en présence de CATR.

### 2.3.2. Hélice H3 (résidus 110 à 140)

L'hypothèse proposée dans le cas des changements conformationnels de l'hélice H1 entre les complexes bAnc1p-CATR et -BA l'est aussi pour l'hélice H3. En effet, la région 110-128, correspondant à la moitié N-terminale de l'hélice H3, orientée vers l'espace intermembranaire d'après la structure 3D du complexe transporteur-CATR, présente un niveau de deutération supérieur dans le complexe transporteur-BA que dans le complexe CATR (figures 38A et 38B).

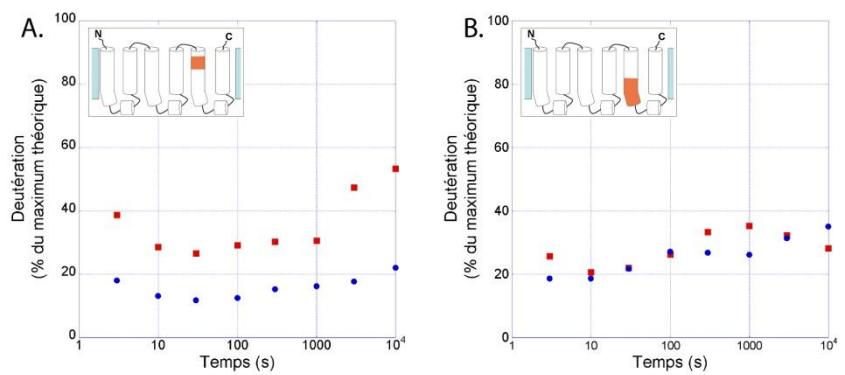
A l'inverse, la région de l'hélice H3, située entre les acides aminés 130 et 140 et représentant la moitié C-terminale de l'hélice située du côté matriciel est plus deutérée dans le complexe bAnc1p-BA que dans le complexe bAnc1p-CATR (figures 38C à 38F).

Ces résultats mettent de nouveau en évidence une perte d'accessibilité de la protéine au deutérium du côté de l'espace intermembranaire et un gain du côté matriciel dans le cas du complexe bAnc1p-BA, et inversement pour le complexe bAnc1p-CATR.

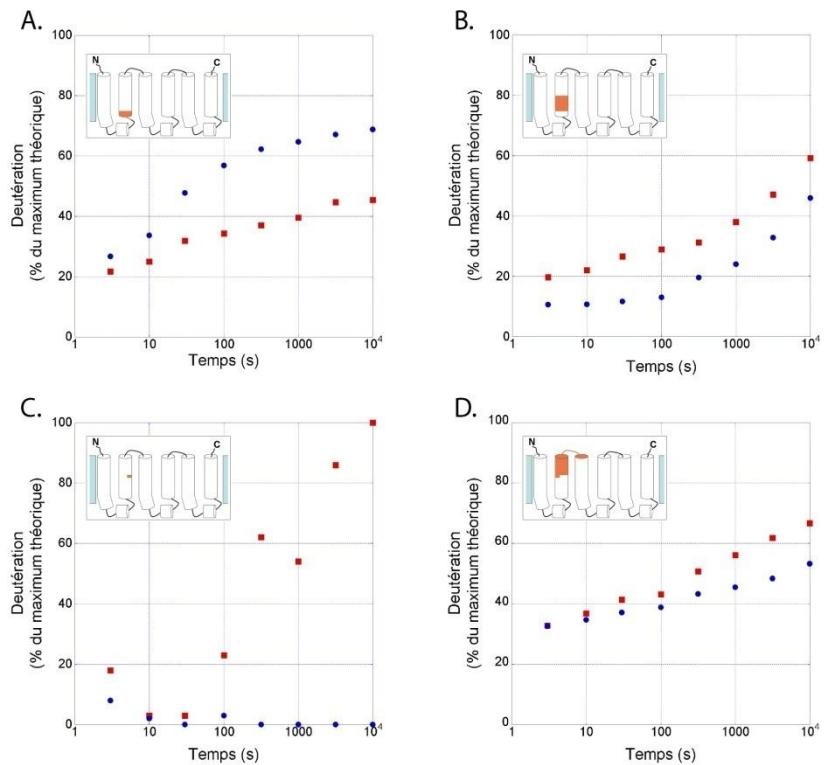
### 2.3.3. Hélice H5 (résidus 209 à 239)

Cette partie de la protéine se trouve dans une région mal résolue dans la carte peptidique, et seulement deux peptides de 7 et 14 acides aminés de long ont été analysés. Les résultats obtenus permettent difficilement d'appréhender les différences conformationnelles de cette région. De plus, ces peptides, peu abondants, n'ont pas pu être analysés dans toutes les expériences réalisées. Les résultats obtenus sont donc à considérer avec prudence. Néanmoins on peut noter une différence de deutération entre les deux complexes, visible pour la région 216-221 exposée à l'espace intermembranaire avec un niveau supérieur de deutération pour le complexe bAnc1p-CATR (figure 39A).

La région comprise entre les acides aminés 226 et 239, qui contient la signature des transporteurs d'ADP/ATP mitochondriaux RRRMM, ne présente aucune différence significative de deutération entre les complexes étudiés et semble donc conserver un environnement semblable dans les deux complexes (figure 39B). Comparée aux régions des hélices H1 et H3 qui lui correspondent par pseudo-symétrie d'ordre 3, c'est-à-dire aux régions 12-17 (H1) et 108-128 (H3), la différence de deutération de l'hélice H5 en fonction des inhibiteurs liés est beaucoup moins importante. De plus,



**Figure 39 : Cinétiques de deutération de l'hélice H5.** Les cinétiques de deutération des régions 216-221 (A) et 227-239 (B) recouvrant des parties de l'hélice H5 ont été suivie dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). Les encarts représentent en orange la localisation de ces régions dans la structure éclatée de bAnc1p.



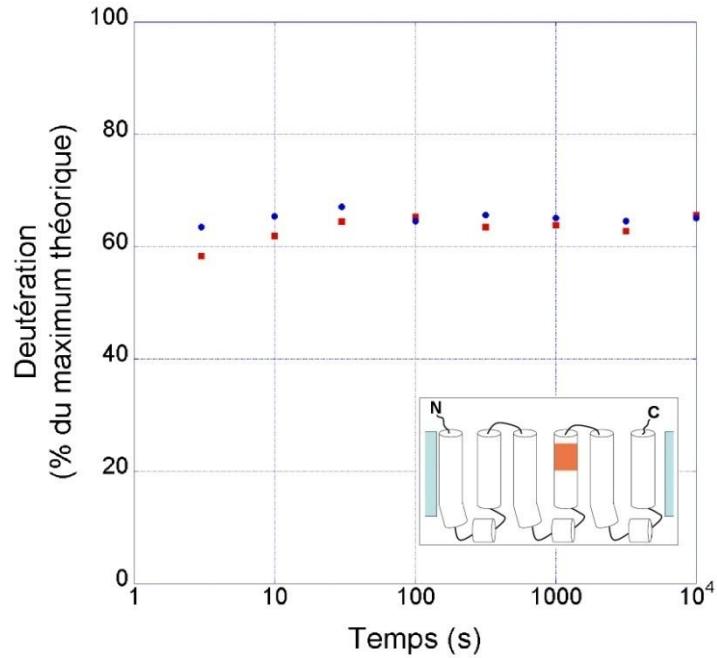
**Figure 40 : Cinétiques de deutération de l'hélice H2.** Les cinétiques de deutération des régions 71-77 (A), 79-87 (B), 88 (C) et 89-109 (D) recouvrant l'hélice H2 ont été calculées par analyse de la digestion des complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus) après marquage au deutérium. Le positionnement des régions observées au sein de la structure éclatée de bAnc1p est indiqué en orange dans l'encart.

la faible deutération de cette région dans le complexe transporteur-BA n'est pas accompagnée d'une augmentation de la deutération de la partie de l'hélice située du côté matriciel. Ces résultats suggèrent donc que l'hélice H5 serait peu mobile transversalement dans la membrane. La différence d'accessibilité observée pour la partie située du côté intermembranaire pourrait ainsi résulter du mouvement des autres hélices transmembranaires du transporteur, et non d'un mouvement propre de cette hélice.

## 2.4. Les hélices transmembranaires paires et les boucles de l'espace intermembranaire (c1 et c2)

### 2.4.1. L'hélice H2 et le coude c1

Les hélices transmembranaires paires ont leur extrémité N-terminale orientée du côté matriciel de la membrane, et inversement leur extrémité C-terminale face à l'espace intermembranaire. Elles sont reliées à l'hélice impaire précédente par une boucle matricielle comprenant une courte hélice et à la suivante par une boucle non structurée, d'une dizaine d'acides aminés, située dans l'espace intermembranaire. Les deutérations de l'hélice H2 et du coude c1 ont été déterminées au travers de 3 régions, 71-77, 79-87, 89-108 et par l'analyse de la deutération de la liaison amide de la phénylalanine 88 (figure 40). L'extrémité N-terminale de l'hélice H2 (71-77) se deutère assez rapidement, atteignant entre 40 et 60 % de deutération en fonction du complexe analysé après 5 minutes de marquage (figure 40A). Elle est cependant plus importante dans le complexe transporteur-BA que dans le complexe transporteur-CATR. A l'inverse, le reste de l'hélice ainsi que le coude c1 montrent une deutération supérieure dans le complexe CATR (figure 40). En effet, la région 79-87 présente un niveau de deutération supérieur d'environ 15 % dans le complexe bAnc1p-CATR, atteignant 60 % et 45 % au bout de  $10^4$  secondes de marquage (2 heures et 45 minutes) respectivement pour les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA (figure 40B). Ce résultat est encore plus net en analysant uniquement la phénylalanine 88 qui présente une deutération nulle dans le complexe bAnc1p-BA et qui atteint près de 90 % dans le complexe bAnc1p-CATR après 55 minutes de marquage (figure 40C). De plus, la région recouvrant le coude c1 (89-108) présente également une deutération plus importante pour le complexe bAnc1p-CATR que pour le complexe bAnc1p-BA, atteignant respectivement 68 % et 55 % de deutération au bout de 2 heures et 45 minutes de marquage (figure 40D). Ces résultats montrent clairement un décalage similaire à celui observé pour les hélices H1 et H3, c'est-à-dire une meilleure exposition au solvant



**Figure 41 : Cinétiques de deutération de l'hélice H4.** La cinétique de deutération de cette hélice a été suivie au travers de l'unique région identifiée (189-195) après marquage au deutérium des complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). Sa localisation dans la structure de bAnc1p est présentée en orange dans l'encart.

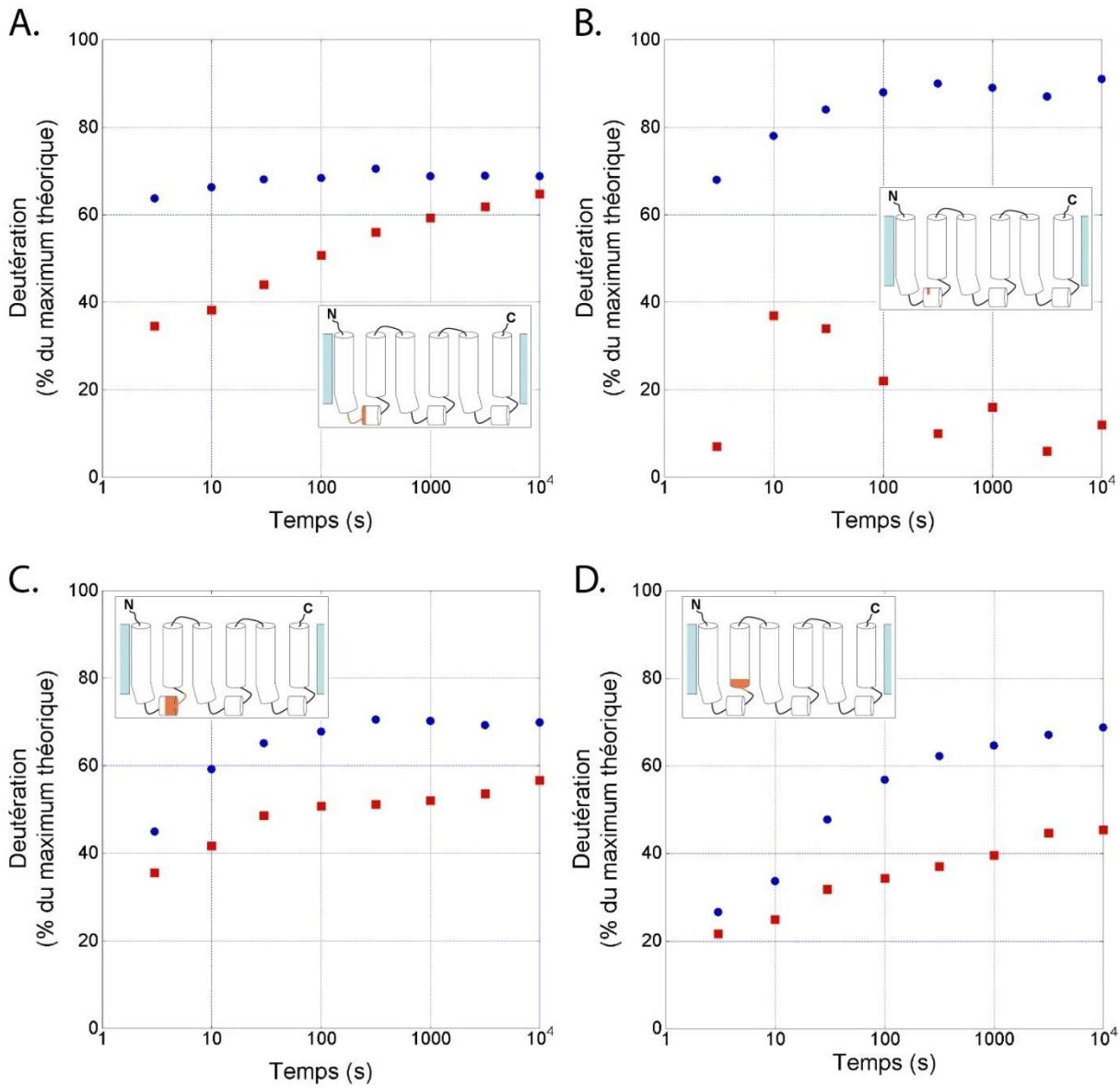
de l'extrémité matricielle et au contraire une deutération moindre de l'extrémité située face à l'espace intermembranaire, pour le complexe transporteur-BA (figure 40).

#### 2.4.2. L'hélice H4

Le seul peptide obtenu provenant de l'hélice H4 est compris entre les acides aminés 188 et 195. Pour les mêmes raisons que pour l'hélice H5, le manque de peptides recouvrant cette zone rend difficile l'interprétation des données obtenues pour cette région. Sa deutération au cours des expériences est très importante et très rapide puisqu'elle atteint plus de 60 % au bout de quelques secondes dans les deux complexes (figure 41). Ce résultat montre que la moitié de l'hélice H4 située du côté de l'espace intermembranaire est fortement exposée au solvant et ce de manière équivalente dans les deux complexes transporteur-inhibiteur. Les différences de deutération observées précédemment avec les hélices H1, H2 et H3 ne sont pas présentes au niveau de cette région de l'hélice H4. Il semble donc que son environnement dans l'état micellaire ne soit pas influencé par la fixation de l'un ou de l'autre des inhibiteurs. En admettant que le détergent se substitue à des lipides membranaires pour recouvrir les régions peptidiques hydrophobes du transporteur, mimant ainsi la membrane, on pourrait envisager que les hélices H1, H2 et H3 puissent s'enfoncer dans la micelle de détergent dans le complexe bAnc1p-BA exposant davantage au solvant leurs extrémités matricielles. Les hélices suivantes H4 et H5 resteraient relativement peu mobiles dans cet environnement micellaire, quel que soit le complexe analysé.

### 2.5. Les boucles matricielles m1, m2, m3 (résidus 36 à 74, 143 à 175, 240 à 272)

De nombreuses données biochimiques ont été obtenues sur les boucles matricielles du transporteur bovin, soit par protéolyse ménagée soit par marquage chimique des cystéines et des lysines des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA (Boulay et Vignais, 1984; Bogner *et al.*, 1986; Brandolin *et al.*, 1989; Marty *et al.*, 1992; Majima *et al.*, 1994). Globalement, les résultats publiés dans la littérature montrent une accessibilité plus importante aux protéases et aux réactifs chimiques des régions exposées à l'espace matriciel dans le complexe transporteur-BA, et inversement un masquage dans le complexe transporteur-CATR.



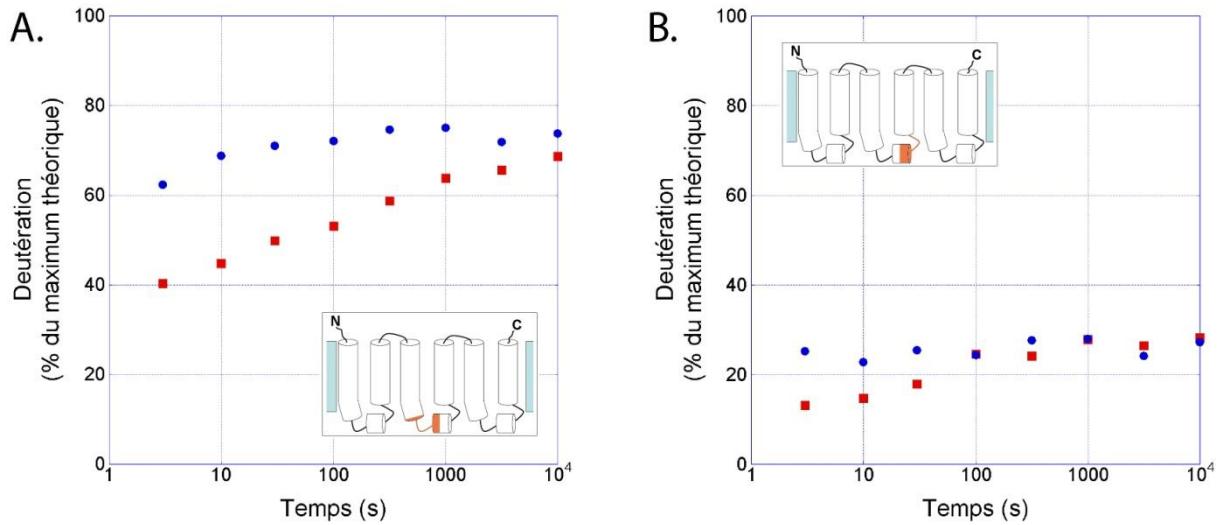
**Figure 42 : Cinétiques de deutération de la boucle matricielle m1.** Les cinétiques de deutération des régions 37-55 (A), 56 (B), 58-69 (C), 71-77 (D) ont été analysées dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). La localisation des régions analysées est indiquée en orange dans la structure éclatée de bAnc1p.

### 2.5.1. La boucle m1 (résidus 36 à 73)

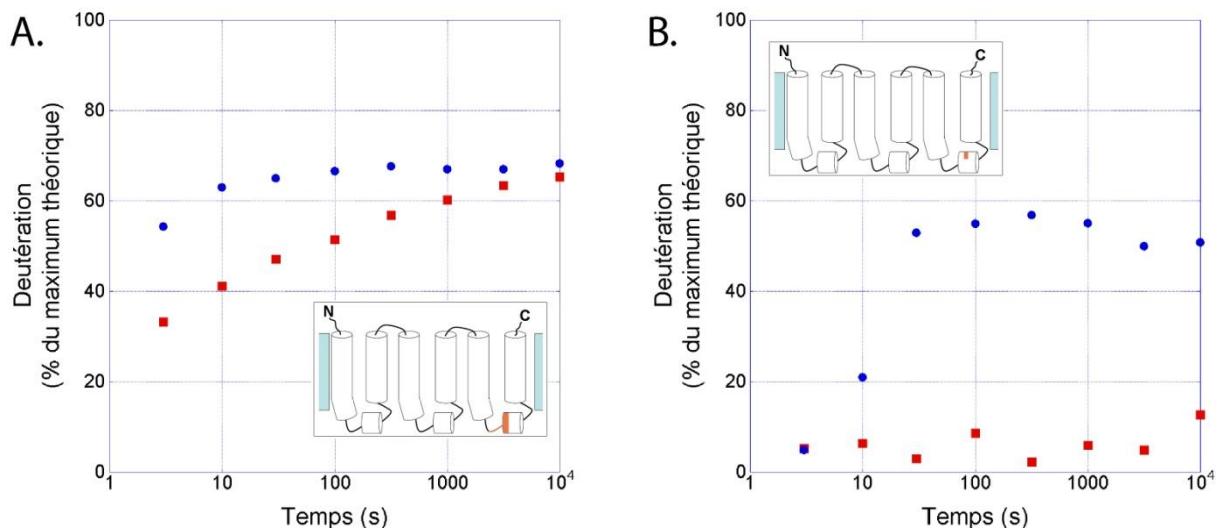
Dans cette étude, la protéolyse de la boucle m1 reliant les hélices transmembranaires H1 et H2, a permis d'obtenir la deutération des régions 37-55, 56, 57-69, 71-77. Dans les deux complexes, ces régions présentent un niveau de deutération assez élevé (entre 40 % et 70 % du maximum théorique) en accord avec leur exposition matricielle (figures 42A, 42C et 42D). Néanmoins, toutes les régions de la boucle m1 montrent une deutération plus importante dans le cas du complexe transporteur-BA, ce qui est en accord avec la majorité des données de la littérature (figure 42). Cette plus grande exposition de la boucle m1 dans le complexe transporteur-BA pourrait refléter un repositionnement de l'hélice h1-2 lui-même associé au mouvement des hélices transmembranaires H1 et H2. Comme exposé dans la partie II des Résultats, paragraphe 3.1.4., la cystéine 56 est alkylée différemment dans les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA. L'analyse comparative du nombre d'atomes de deutérium incorporé dans les peptides 36-55 et 36-56 a permis d'obtenir le taux de deutération de la cystéine 56 et de comparer nos résultats aux données d'alkylation disponibles (figure 42B; voir Introduction, paragraphe 3.1.4). Les résultats obtenus par DXMS montrent une forte deutération de ce résidu dans le complexe bAnc1p-BA et inversement dans le complexe bAnc1p-CATR. Ce résultat, en accord avec la littérature, pourrait s'interpréter par une rotation de l'hélice matricielle h1-2 concomitante au repositionnement des hélices H1 et H2.

### 2.5.2. La boucle m2 (résidus 143 à 176)

Les données d'accessibilité au deutérium de la boucle m2, reliant les hélices H3 et H4, ont été obtenues pour les régions 142-159 et 161-176 (figure 43). L'analyse du niveau de deutération de la région N-terminale met en évidence une forte accessibilité (atteignant 50 à 70 % au bout de 100 secondes). Elle est cependant supérieure dans le complexe transporteur-BA (figure 43A). A l'inverse, la deutération de la région C-terminale de la boucle m2 reste très limitée (25 % après 2 heures et 45 minutes de deutération) et ne présente pas de différence significative entre les complexes transporteur-CATR et transporteur-BA (figure 43B). Cette région est liée à la partie N-terminale de l'hélice H4 qui ne présente pas non plus de différence de deutération entre les deux complexes étudiés. Ces résultats confirment que les différences de conformations entre les complexes transporteur-CATR et transporteur-BA impliqueraient essentiellement les hélices transmembranaires de la moitié N-terminale du transporteur, laissant l'environnement des hélices H4 et H5 inchangé.



**Figure 43 : Cinétiques de deutération de la boucle matricielle m2.** Les cinétiques de deutération des régions 142-159 (A), 161-176 (B) ont été analysées dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). Les encarts représentent en orange la localisation des régions analysées dans la structure éclatée de bAnc1p.



**Figure 44 : Cinétiques de deutération de la boucle matricielle m3.** Les cinétiques de deutération de la région 249-255 et de la cystéine 256 recouvrant la boucle m3 ont été suivies dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). Le rectangle orange symbolise la localisation de la région analysée dans la structure éclatée de bAnc1p.

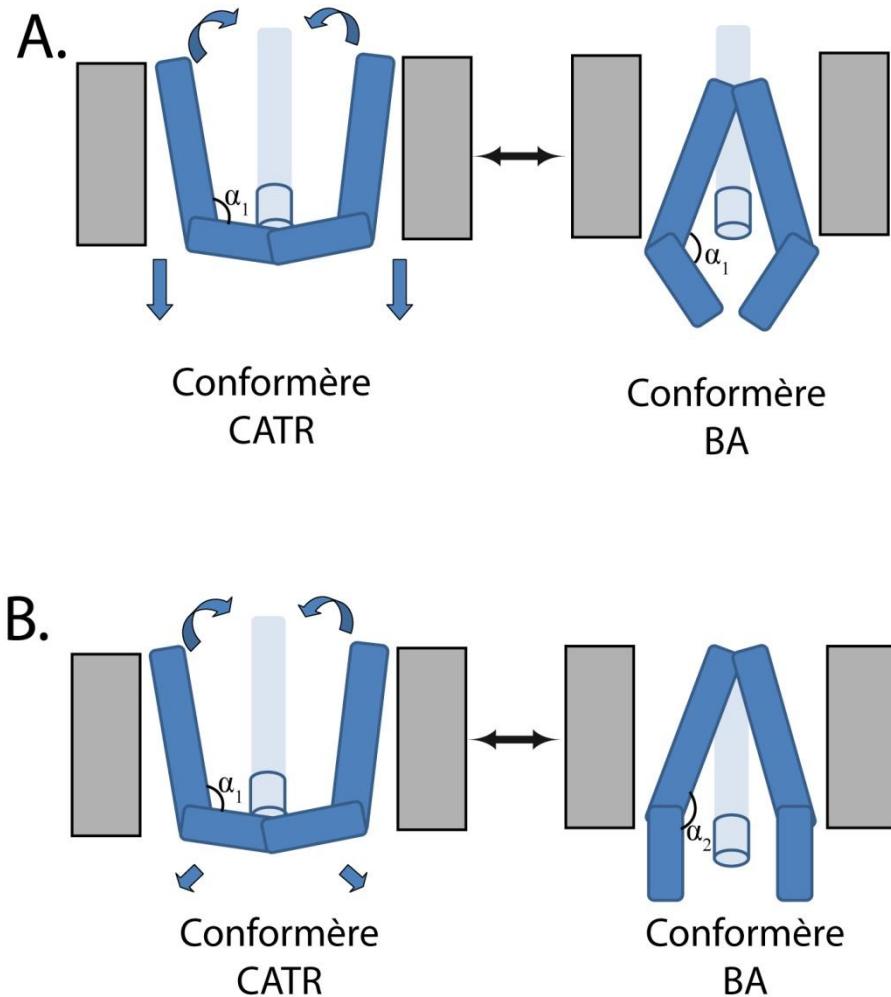
### 2.5.3. La boucle m3 (résidu 240 à 272)

La boucle m3 n'est représentée dans ce travail que par deux peptides comprenant la partie N-terminale de l'hélice matricielle h5-6 et ne différant que par la présence ou non de la cystéine 256. La région peptidique 249-255, présente une deutération élevée (atteignant 50 à 70 % au bout 100 secondes de deutération) mais néanmoins plus importante et plus rapide dans le complexe transporteur-BA que dans le complexe bAnc1p-CATR (figure 44A). L'obtention de deux peptides ne différant que par la cystéine 256 a permis d'obtenir la cinétique de marquage de ce résidu. Comme pour la cystéine 56, la cystéine 256 n'est accessible au deutérium que dans le complexe bAnc1p-BA (figure 44B). Ces différences de marquage entre les deux complexes sont identiques à celles observées pour les régions 37-55 (h1-2), 142-159 (h3-4) et pour la cystéine 56. Ceci suggère un mouvement identique de ces 3 régions s'exposant d'avantage au solvant dans la matrice mitochondriale dans le complexe bAnc1p-BA. En combinant les données d'accessibilité obtenues pour les cystéines 56 et 256, nous proposons que ce phénomène puisse traduire une rotation des hélices matricielles aboutissant à une exposition accrue de leurs régions N-terminales.

## 2.6. Modèle de transition conformationnel de bAnc1p en présence des inhibiteurs

Les cinétiques de deutération des peptides générés par protéolyse par la pepsine des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA ont permis de mettre en évidence des différences d'accessibilité de certaines régions peptidiques. Ainsi nous avons pu montrer que dans le complexe bAnc1p-BA, les hélices transmembranaires H1, H2 et H3, étaient plus exposées au solvant du côté matriciel, et inversement du côté de l'espace intermembranaire dans le complexe bAnc1p-CATR. Les hélices transmembranaires H4 et H5 présentent peu de différences de deutération et seront donc considérées comme immobiles dans nos modèles.

Toutes ces observations peuvent traduire plusieurs changements de conformations. Cependant, la mitochondrie ne doit pas être dépolarisée lors du mécanisme de transport. Ceci implique qu'au cours de celui-ci, l'espace intermembranaire doit être isolé de la matrice. C'est le cas du complexe bAnc1p-CATR, où un bouchon peptidique de 10 Å environ isole la cavité formée de la matrice. Ainsi, par comparaison avec le complexe bAnc1p-CATR, la perte d'accessibilité au solvant observée pour les extrémités intermembranaires des hélices H1, H2 et H3 dans le complexe bAnc1p-BA s'interpréterait de la même façon, c'est-à-dire par la formation d'une structure peptidique isolant la cavité de l'espace intermembranaire. La formation de cette structure ne peut



**Figure 45 : Modèles conformati**onnels du transporteur bAnc1p. bAnc1p est schématisé transversalement à la membrane interne mitochondriale (représentée par des rectangles gris), l'espace intermembranaire localisé vers le haut et la matrice vers le bas. Les hélices H1 et H3 sont représentées chacune en deux parties (en amont et en aval du coude induit par les prolines) par deux rectangles bleus foncés. Le rectangle gris ainsi que le cylindre schématisent en arrière plan l'hélice H5 segmentée de la même manière. Tous les modèles proposés présentent un basculement préalable des hélices H1 et H3. Ensuite, ces hélices s'enfoncent dans la membrane et l'angle du coude ( $\alpha_1$ ) est conservé (A). Les coudes peuvent aussi se déplier et modifier cet angle ( $\alpha_1 \neq \alpha_2$ ) (B). Ces deux mouvements ouvrent une cavité dans l'espace intermembranaire

toutefois pas être induite par une simple rotation des hélices transmembranaires par rapport à un axe perpendiculaire à la membrane. En effet, celle-ci engendrerait une ouverture rapide de la cavité vers la matrice mitochondriale, si les coudes au niveau des prolines étaient maintenus, et donc une dépolarisation de la membrane. Le seul moyen de fermer cette cavité serait donc un basculement des hélices transmembranaires qui rapprocherait leurs extrémités cytosoliques. Une fois, la cavité isolée des deux compartiments (espaces intermembranaire et matriciel), celle-ci pourrait donc s'ouvrir en direction de la matrice sans dépolariser la mitochondrie. Pour cela, plusieurs mouvements d'hélices différents, difficilement prédictibles par notre approche, peuvent être mis en jeu et varient donc selon les modèles. Le plus simple conceptuellement serait que les différences d'accessibilité observées pour les régions intermembranaires traduisent un mouvement de translation des 3 hélices transmembranaires H1, H2 et H3, orienté perpendiculairement à la membrane à travers la bicouche lipidique (figure 45A). Dans ce cas, le gain d'accessibilité observé pour les régions matricielles dans le complexe bAnc1p-BA serait dû à un repositionnement, plus avancé dans la matrice mitochondriale, des régions matricielles de la protéine tout en conservant le coude de l'hélice. Une autre possibilité serait que la cavité s'ouvre vers la matrice après une modification de l'angle des coudes des hélices transmembranaires impaires qui éloignerait par conséquent les boucles matricielles. Dans ce dernier cas, le gain d'accessibilité au solvant observé pour les régions matricielles serait dû à la présence d'une large cavité ouverte vers le compartiment matriciel (figure 45B).

Ce mouvement d'ouverture du transporteur vers le compartiment matriciel, qu'il soit dû à un enfouissement d'une partie de la protéine ou à une rotation de certaines hélices, pourrait être accompagné d'un dépliement du domaine N-terminal des boucles m1, m2 et m3 ainsi que d'une rotation d'au moins 2 des 3 hélices matricielles, h1-2 et h5-6, au sein desquelles les cystéines 56 et 256 sont plus accessibles au solvant dans le complexe transporteur-BA.

# PARTIE 3 : CINETIQUES D'ECHANGE H/D IN ORGANELLO

Il est maintenant reconnu que les étapes d'extraction et de concentration effectuées sur des protéines membranaires en présence de détergents peuvent affecter les états conformationnels ou oligomériques de ces dernières. Par exemple, la protéine VDAC, dont la structure 3D a été obtenue récemment par diffraction des rayons X, est présentée dans les cristaux comme un monomère, alors qu'il a clairement été démontré qu'elle formait des trimères au sein de la membrane externe mitochondriale. D'autre part, les données structurales s'opposent à certaines de données biochimiques (Colombini, 2009).

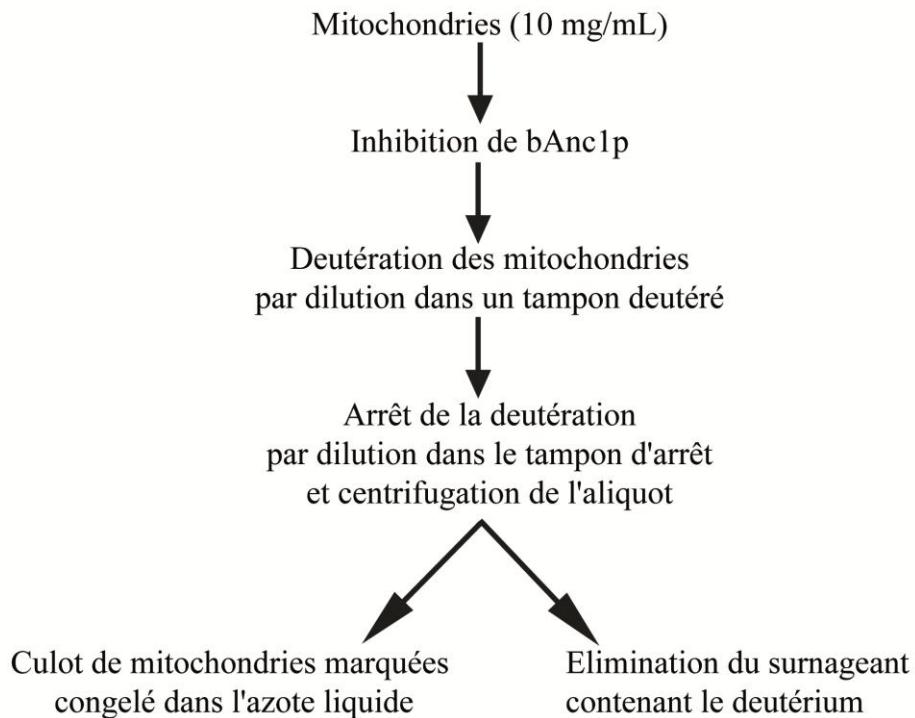
La structure oligomérique du transporteur bovin fait encore l'objet de controverse et, bien que de nombreuses données biochimiques aient montré l'évidence d'une structure dimérique, celles de diffraction présentent un monomère unique contenant une molécule de CATR au sein de la cavité. Il est clairement établi que certains lipides jouent des rôles primordiaux dans la fonction de cette protéine. Ils pourraient également médier son état oligomérique (Nury *et al.*, 2008). Ainsi la présence de forte concentration en détergent pendant l'étape de purification de bAnc1p pourrait avoir un effet direct sur son état conformationnel. Afin de palier ce problème, nous avons décidé d'étudier l'accessibilité de bAnc1p complexé aux inhibiteurs au sein même de la membrane interne mitochondriale.

Dans cet objectif, les conditions de deutération de la protéine au sein de la mitochondrie et sa purification dans les conditions de contre-échange minimum ont été mises au point pour permettre d'appréhender la topographie du transporteur dans son environnement lipidique naturel.

## 1. Mises au point expérimentales

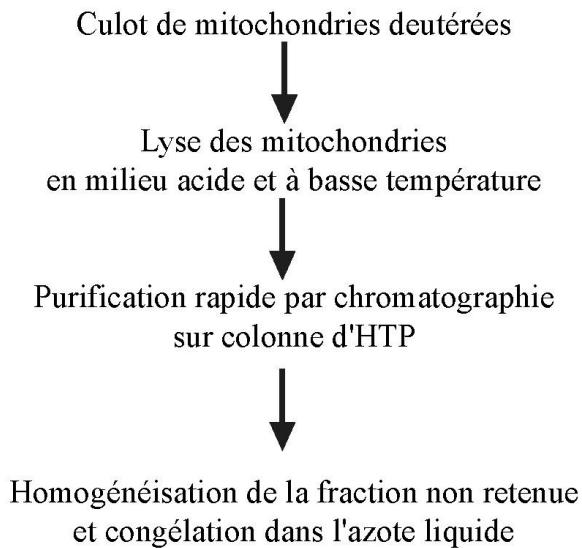
Les conditions de deutération *in organello* de bAnc1p ont été optimisées dans l'optique de préserver la structure de la protéine avant et pendant le marquage. La durée des étapes d'extraction et d'isolement a ensuite été considérablement réduite afin de limiter le contre-échange lors des étapes suivantes, et donc la perte d'informations. Une attention particulière a été portée aux étapes situées entre le marquage et l'extraction de la protéine par des détergents. En effet, l'eau deutérée utilisée doit être éliminée avant la lyse des membranes et l'extraction de la protéine, afin d'éviter de marquer des zones de la protéine masquées dans les membranes et démasquées dans les micelles de détergent. Ce protocole, détaillé ci-dessous, est abordé en deux étapes pour des raisons pratiques : le marquage et la purification (figures 46 et 47).

## Etape 1



**Figure 46 : Principe du marquage des mitochondries en présence de  $D_2O$  après inhibition par le CATR ou le BA.**

## Etape 2



**Figure 47 : Séquence opératoire pour l'extraction et la purification de bAnc1p après deutération dans les mitochondries**

## 1.1. Isolement des complexes bAnc1p-inhibiteurs après deutération *in organello*

### 1.1.1. Marquage des protéines *in organello*

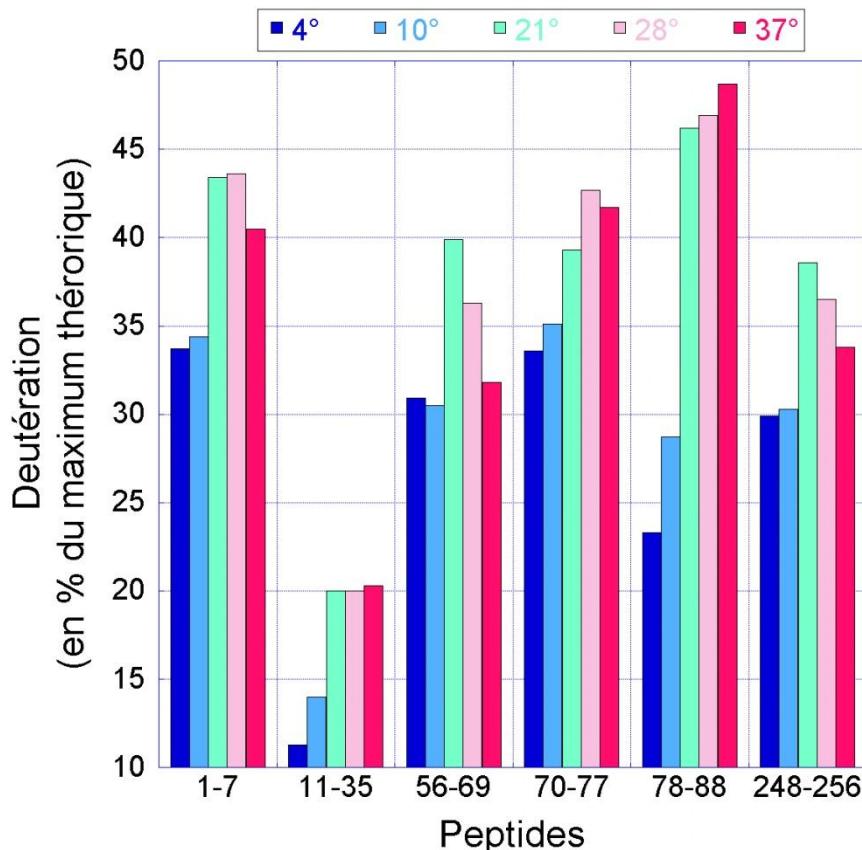
Les mitochondries isolées de cœur de bœuf sont décongelées puis inhibées dans des conditions utilisées en routine dans le laboratoire (voir Matériels et Méthodes 1.6). Les protéines mitochondrielles sont ensuite marquées au deutérium à température ambiante pour des raisons d'efficacité (voir Résultats, Partie III, 1.2). Ce marquage s'effectue en diluant 100 fois les mitochondries inhibées dans un milieu isotonique composé de 20 mM MOPS-NaOH pH 6,8, contenant 250 mM de saccharose, 1 mM d'EDTA et supplémenté par l'inhibiteur utilisé à une concentration égale à 10 fois son Kd. A un temps  $t$  donné, une aliquote contenant 1 mg de protéines mitochondrielles totales est mélangée à 1/10<sup>ème</sup> de son volume dans un tampon glycine 1 M pH 2,5 afin d'arrêter la deutération. Cet échantillon est ensuite centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 16 000 g. Le surnageant contenant le D<sub>2</sub>O est retiré et le culot contenant les protéines deutérées est congelé dans l'azote liquide.

### 1.1.2. Purification de bAnc1p après marquage au deutérium

Les protéines vont être extraites des membranes et purifiées selon le protocole mis au point dans cette étude (Partie III, 1.3). Les culots de membranes sont lysés en condition acide et à basse température afin de préserver au maximum le marquage, puis déposé sur une colonne d'HTP afin de purifier le transporteur. Le lysat est poussé à travers la colonne d'HTP par pression à l'aide d'un piston et la fraction non retenue est récupérée dans un tube contenant 50 µL de tampon 100 mM glycine pH 2,5 afin de préserver la deutération. Cette étape est nécessaire car le pH de la fraction non retenue se trouve augmenté lors de la chromatographie sur HTP. Le mélange est immédiatement agité et congelé dans l'azote liquide. Les protéines deutérées et purifiées seront analysées en MS dans les mêmes conditions que celles utilisées pour analyser les cinétiques de marquage en solution.

## 1.2. Mise au point des conditions de deutération des membranes mitochondrielles

Les conditions de deutération de bAnc1p étant inconnues, des expériences préalables ont été menées pour déterminer la durée du marquage et sa température adéquate. Pour cela, des mitochondries inhibées en présence de CATR ont été diluées dans un milieu deutéré, composé



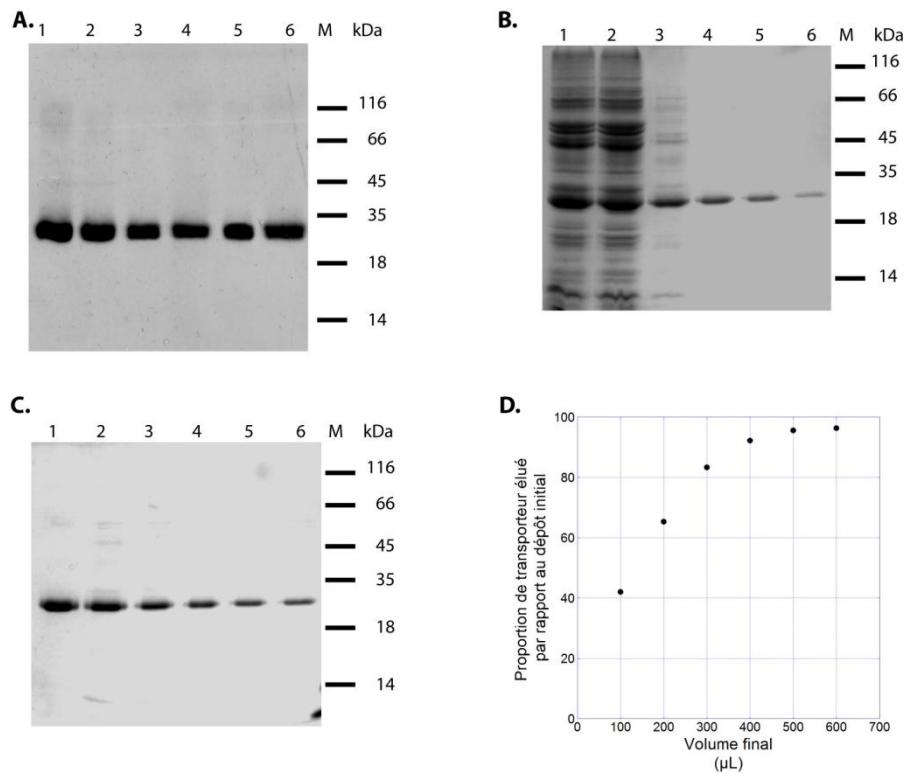
**Figure 48 : Niveau de deutération de bAnc1p dans la membrane mitochondriale en fonction de la température.** La deutération des peptides 1-7, 11-35, 56-69, 70-77, 78-88 et 248-256 a été analysée à 5 températures différentes : 4°C (bleu foncé), 10°C (bleu clair), 21°C (vert), 28°C (rose) et 37°C (rouge).

de 20 mM MOPS-NaOH pH 6,8, 250 mM saccharose, 1 mM EDTA, 200 nM CATR, à différentes températures pendant 2 heures et demie. Le marquage a été arrêté en amenant le pH à 2,5 par dilution dans un tampon glycine 1M pH 2,5. Les mitochondries ont été ensuite sédimentées et le milieu de marquage éliminé. Les culots ont été congelés dans l'azote liquide et analysés ultérieurement par MS. Le pourcentage de deutération de plusieurs peptides répartis tout au long de la séquence peptidique a été calculé (figure 48). Les résultats obtenus montrent que les peptides analysés présentent des deutérations plus faibles que lors des expériences de deutération en solution. Cette différence est très visible, en particulier pour la région 2-7 dont la deutération était de 70 % au bout de quelques secondes *in vitro*, alors qu'elle n'atteint pas 50 % après plus de 2 heures de deutération *in organello* (figure 48). Cette faible deutération peut être due à un contre-échange important lors de l'étape de purification ou à une accessibilité plus réduite de la protéine dans son environnement membranaire. On note aussi que la perméabilité des membranes biologiques à l'eau est suffisante pour permettre au D<sub>2</sub>O de marquer les régions matricielles m1 et m3, correspondant respectivement aux résidus 57 à 69 et 249 à 256.

La deutération des peptides présente des différences en fonction de la température. Comme attendu, les peptides sont moins marqués pour les températures les plus basses, mais aucune proportionnalité entre le marquage et les températures testées n'a été remarquée. En effet, les résultats montrent une deutération proche pour les 3 températures les plus élevées (21, 28 et 37°C) et pour les deux les plus basses (4°C et 10°C). Cette différence de marquage peut être attribuée à la fusion des lipides de la membrane mitochondriale qui se produit vers 15°C, et induit par conséquent une meilleure accessibilité de la protéine au deutérium pour des températures supérieures. Pour obtenir le marquage le plus intense possible, et rester dans des conditions proches des conditions naturelles de fluidité membranaire, les expériences de marquage *in organello* seront réalisées sur des temps plus longs (puisque le marquage observé au bout de 2H est bien plus faible que dans l'état micellaire), et à température ambiante (> 15° C) afin de travailler avec des membranes non figées.

### 1.3. Mise au point des conditions de purification de la protéine dans les conditions d'échange H/D minimum

Pour réaliser une cinétique d'échange dans les membranes mitochondrielles, il était nécessaire de mettre au point une méthode de purification rapide dans des conditions de pH et de température où l'échange H/D est le plus lent. Nous avons vérifié qu'il était possible d'extraire le transporteur des mitochondries en quelques secondes en présence de 1 % (v/v) Triton X-100 en milieu acide (glycine 50 mM, pH 2,5). Pour cela, des mitochondries ont été lysées pendant différents temps (0



**Figure 49 : Mise au point des conditions de purification de bAnc1p sur colonne d'HTP essorée.** **A.** Analyse par Western-blot après centrifugation du surnageant de mitochondries lysées par 1 % (v/v) Triton X-100 instantanément (piste 1), pendant 30 sec (piste 2), 1 min (piste 3), 5 min (piste 4), 10 min (piste 5) et après 30 min de lyse (piste 6). **B.** 100 µL d'un lysat de mitochondries à 10 mg/ml dans 1 % (v/v) Triton X-100 ont été déposés sur une colonne d'HTP essorée de 50 (piste 1), 100 (piste 2), 200 (piste 3), 300 (piste 4), 400 (piste 5) et 500 (piste 6) µL. La fraction non retenue est analysée par SDS-PAGE colorée au bleu de Coomassie. **C.** 100 µL d'un lysat de mitochondries à 10 mg/ml dans 1 % (v/v) Triton X-100 ont été déposés sur une colonne de 300 µL d'HTP. Un volume de tampon croissant allant de 0 (piste 1), 100 (piste 2), 200 (piste 3), 300 (piste 4), 400 (piste 5), 500 (piste 6) µL a été ajouté. La fraction non retenue a été analysée par SDS-PAGE et colorée au bleu de Coomassie. **D.** La proportion de protéines purifiées par rapport à la quantité déposée a été calculée pour chaque échantillon analysé en B et reportée sur un graphique en fonction du volume élué.

sec, 30 sec, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min) puis centrifugées à 10 000 g pendant 30 secondes afin de sédimenter les composés non solubles. Le surnageant a ensuite été analysé par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-bAnc1p totaux (figure 49A). Les bandes observées présentent une intensité comparable pour les différents temps, montrant ainsi clairement que, dès les premières secondes de la lyse, bAnc1p peut être extrait efficacement des mitochondries.

Des essais de purification de bAnc1p sur colonnes de différents volumes d'HTP essorées ont été réalisés afin de définir les conditions optimales pour une purification adéquate du transporteur. La quantité de transporteur à purifier et le volume de l'échantillon sont imposés par la technique d'analyse par spectrométrie de masse. L'échantillon doit contenir entre 0,5 et 1 nmol de transporteur dans un volume de 100 µL (correspondant au volume de la boucle d'injection). La préparation de mitochondries de cœur de bœuf utilisée contient 1100 pmol de sites ATR par mg de protéines totales (Résultats, partie I, 2.1), ce qui correspond à environ 2 nmoles de bAnc1p/mg de protéines totales. Afin de disposer d'une quantité suffisante de bAnc1p purifié dans chaque échantillon après ajustement du pH à 2,5, nous utiliserons pour chaque mesure de la cinétique un lysat de mitochondries de 100 µL à 10 mg/mL (contenant 2 fois plus de transporteur que nécessaire).

Pour définir la taille optimale de la colonne d'HTP, un lysat de mitochondries de 100 µL à 10 mg/mL a été déposé sur des colonnes d'HTP de 50, 100, 200, 300, 400, 500 µL, préalablement équilibrées dans un milieu composé de MOPS-NaOH 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8, et essorées par centrifugation (5 min, 1000 g). Le tampon utilisé pour équilibrer l'HTP ne peut pas être plus acide, car il détruirait les cristaux de phosphate de calcium constituant ce support. Il faut noter que le passage d'un faible volume de lysat acide n'est pas suffisant pour détruire totalement l'HTP, rendant applicable ce protocole. Après élution sous pression, sans apport de tampon, la fraction non retenue est analysée par SDS-PAGE (figure 49B, 49C et 49D).

Cette expérience montre que dans ces conditions, la préparation de bAnc1p à partir de 100 µL de lysat à 10 mg/mL est pure pour des volumes d'HTP supérieurs ou égaux à 300 µL. Une colonne de 300 µL d'HTP minimum sera donc utilisée pour purifier bAnc1p lors des expériences de marquage *in organello*. La quantité de bAnc1p contenue dans la fraction purifiée dans ces conditions est voisine de 1 nmole, soit moins de la moitié de la quantité totale contenue dans le lysat, le reste étant retenu sur la colonne HTP. Afin d'augmenter ce rendement, l'étape d'élution a été améliorée en déposant sur le lysat du tampon contenant 5 mM glycine, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 2,5. Pour éviter que le lysat ne se dilue en ce mélangeant avec le tampon ajouté, il a été additionné de glycérol (20 % (p/v) final). Lors des essais préliminaires, des volumes croissants de tampon ont été ajoutés (0, 100, 200, 300, 400, et 500 µL) pour rechercher les conditions optimales. La fraction éluée a été

analysée par SDS-PAGE, et la quantité de bAnc1p dosée par BCA (figures 49C et 49D). Les résultats montrent que les fractions non retenues sont pures et qu'il faut ajouter au moins 400 µL de tampon pour récolter 95 % du bAnc1p déposé. L'addition de 100 µL de tampon permet cependant d'extraire 1,5 nmole de transporteur dans un volume final adéquat à l'analyse en spectrométrie de masse.

En résumé, nous avons pu mettre au point la deutération des mitochondries, l'extraction en milieu acide et la purification de bAnc1p en quelques dizaines de secondes ; ces conditions répondent parfaitement aux critères de contre-échange minimum. Cette méthode est détaillée ci-dessous :

1- Les culots de mitochondries, contenant 1 mg de protéines totales, sont lysés rapidement à 4°C dans 100 µL d'un tampon contenant 50 mM glycine, 20 % (p/v) glycérol, 250 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, pH 2,5.

2- Le lysat est déposé sur une colonne d'HTP dont le volume est compris entre 250 et 350 µL placée dans une seringue 1 mL (Terumo). L'HTP est préalablement équilibrée dans un tampon 10 mM MOPS-NaOH, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,8.

3- 100 µL de tampon 5 mM glycine, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 2,5 sont ajoutés sur le lysat.

4- Le lysat et le tampon ajouté sont poussés à travers la colonne d'HTP à l'aide du piston de la seringue.

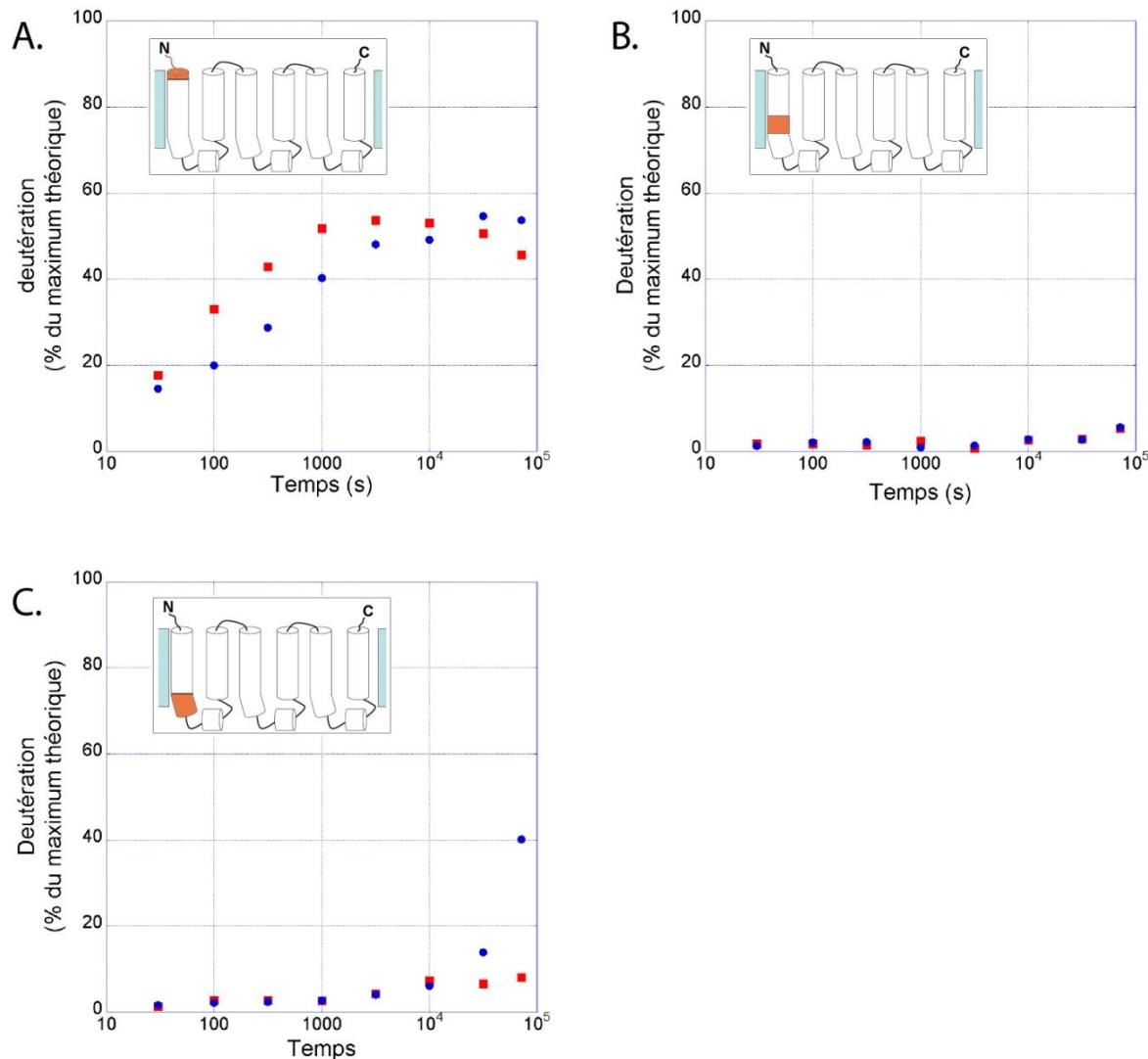
5- La fraction non retenue est éluée dans 25 µL de tampon 100 mM glycine pH 2,5 afin de maintenir le pH de l'échantillon entre 2,5 et 3.

6- L'échantillon est homogénéisé et congelé dans l'azote liquide.

## 2. Analyse des données de deutération de bAnc1p dans l'état membranaire.

L'analyse des peptides issus de la digestion de bAnc1p après deutération dans les membranes mitochondrielles a permis d'obtenir des informations sur les régions peptidiques suivantes : 2-7, 19-29, 31-35, 37-55, 56, 58-69, 71-77, 79-88, 110-116, 118-128, 129-140, 142-159, 227-239 et 249-256. Dans l'ensemble, les régions de bAnc1p présentent des deutérations plus faibles dans l'expérience *in organello* que lors du marquage en milieu micellaire. En effet, la région 2-7 présente un niveau de deutération compris entre 40 et 50 % (figure 50A) du marquage maximum théorique dans cette expérience alors qu'en système micellaire, le marquage atteint 70 % dès 30 secondes de deutération (figure 37A). Ce phénomène est aussi remarqué pour la région peptidique 21-29 de

bAnc1p qui atteint 60 % de marquage dans le complexe bAnc1p-BA en état micellaire (figure 37F) et qui reste très peu marquée dans les membranes mitochondriales (figure 50B). Cette remarque est



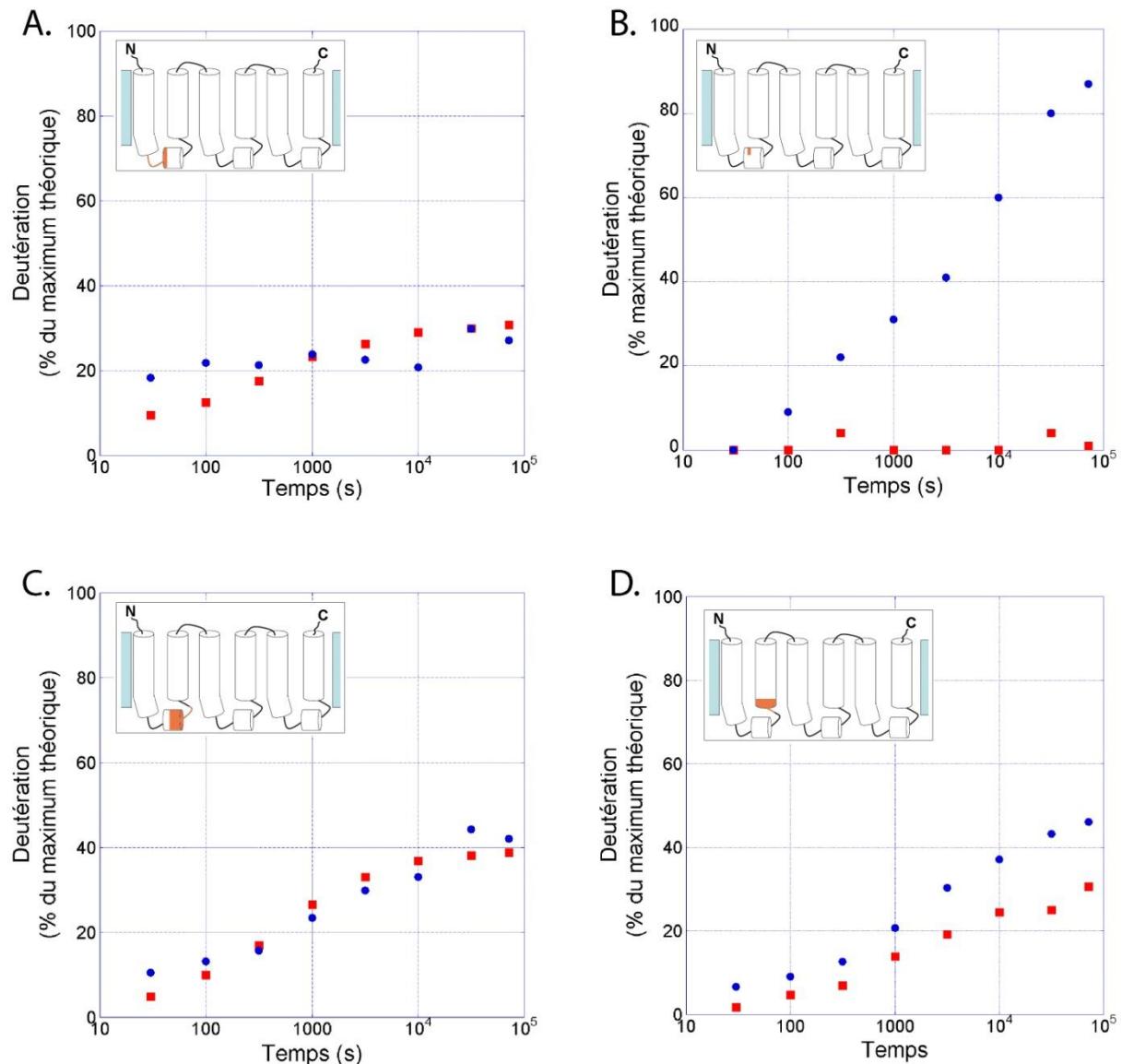
**Figure 50 : Cinétiques de deutération *in organello* de l'hélice H1.** La deutération des régions 2-7 (A), 19-29 (B) et 31-35 (C) de l'hélice H1 de bAnc1p a été mesurée dans les complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). L'encart représente en orange la localisation du peptide marqué dans la structure éclatée de bAnc1p.

valable pour les deux complexes analysés. Même si les niveaux de deutération sont relativement faibles, des différences de marquage entre les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA ont pu être mises en évidence et comparées à celles observées dans l'état micellaire. Par contre, un nombre moins important de peptides a pu être analysé, ce qui a conduit à une baisse notable du pourcentage de recouvrement obtenu pour la protéine (45 %). En effet, aucun peptide couvrant les régions 8-18, 89-108, et 141-159 n'a pu être retrouvé. De plus, certains acides aminés uniques, tels que la cystéine 256, n'ont pu être analysés à cause de l'absence d'un des 2 peptides chevauchants.

## 2.1. Deutération de l'hélice H1 dans la membrane mitochondriale

La région N-terminale de la protéine (2-7) est deutérée au maximum à 50 % dans les deux complexes mais présente une deutération plus rapide dans le complexe bAnc1p-CATR, en accord avec les résultats obtenus précédemment dans l'état micellaire (figures 37 et 50A). La région 19-29 située dans l'hélice membranaire H1 n'est marquée dans aucun des complexes (figure 50B). Cette absence de marquage est en accord avec la faible accessibilité estimée pour cette région dans le complexe bAnc1p-CATR en solution (20 %) mais diffère de celui observé avec le complexe bAnc1p-BA, fortement marqué après plusieurs heures d'incubation dans le D<sub>2</sub>O (65 % après 16 min 40 sec d'incubation). Ce résultat peut être expliqué soit par une protection de cette région plus importante dans la membrane que dans les micelles de détergent, soit par un contre-échange très fort de ce peptide.

La région C-terminale de l'hélice H1 (résidus 31 à 35) située après le coude imposé par la proline n'est pas deutérée dans le complexe bAnc1p-CATR (figure 50C). Dans le complexe bAnc1p-BA, le marquage de cette région n'est visible qu'au bout de 8 heures et 20 minutes de deutération et atteint 40 % du marquage maximum théorique après 27 heures et 45 minutes de marquage (figure 50 C). Les différences de marquage observées pour cette région en fonction de l'inhibiteur utilisé sont en accord avec celles obtenues dans l'état micellaire. Néanmoins le temps d'incubation nécessaire pour mettre en évidence ces différences est beaucoup plus important *in organello*.



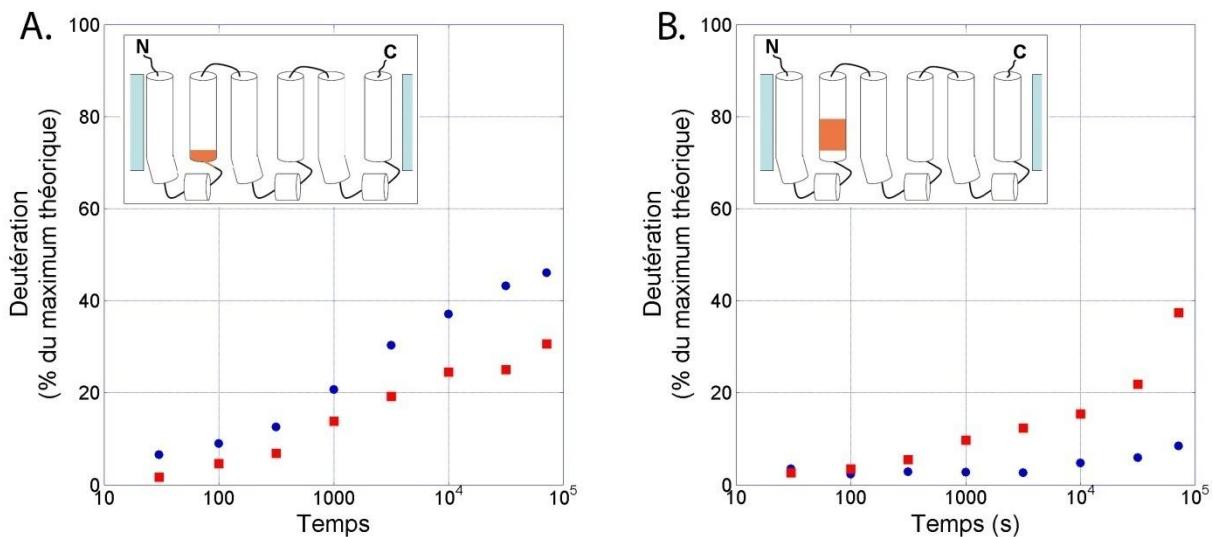
**Figure 51 : Cinétiques de deutération *in organello* de la boucle matricielle m1.** Les cinétiques de deutération des régions 37-55 (**A**), 56 (**B**), 58-69 (**C**) et 71-77 (**D**) recouvrant la boucle m1 ont été analysées après marquage des complexes bAnc1pr-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). Les régions analysées sont localisées en orange dans la structure éclatée de bAnc1p présentée dans l'insert.

## 2.2. Deutération de la boucle m1 dans la membrane mitochondriale

La boucle matricielle m1, couverte par les régions peptidiques 37-55 et 58-69, présente un marquage identique entre les complexes bAnc1p-CATR et -BA (figure 51A et 51C). Ce résultat n'est pas en accord avec le marquage au deutérium de cette région dans l'état micellaire qui avait mis en évidence une accessibilité supérieure dans le complexe bAnc1p-BA que dans le complexe bAnc1p-CATR (figure 42A et 42C). Cette différence de marquage entre les deux expériences peut être causée par la méthode de purification. En effet, cette étape pourrait entraîner un contre-échange important et gommer ainsi des différences au niveau de séquences peptidiques très échangeables. Deux peptides chevauchant 36-55 et 36-56 permettent de suivre le niveau de deutération de la cystéine 56 (figure 51B). Dans la membrane mitochondriale, la cystéine 56 de bAnc1p est fortement marquée dans le complexe BA (80 % du maximum théorique) et peu dans le complexe CATR (5 % du maximum théorique) (figure 51B). Cette accessibilité au solvant, plus importante en présence de BA qu'en présence de CATR, corrèle parfaitement les données de marquage précédemment obtenues en conditions micellaires (voir Résultats, partie II, paragraphe 1.2). Enfin, les données d'incorporation des atomes de deutérium pour la région 71-77, correspondant aux extrémités C-terminale de la boucle matricielle m1 et N-terminale de l'hélice H2, montrent une accessibilité supérieure de cette zone dans le complexe bAnc1p-BA que dans le complexe bAnc1p-CATR. Ce résultat est également en accord avec les données obtenues dans l'état micellaire (figure 51D).

## 2.3. Deutération de l'hélice H2 dans la membrane mitochondriale

L'hélice H2 est couverte par deux peptides qui apportent des informations sur ses régions N-terminale (résidus 71 à 77) et centrale (résidus 79 à 88). La première est plus marquée au deutérium dans le complexe bAnc1p-BA que dans le complexe bAnc1p-CATR, atteignant respectivement au bout de 2 heures et 45 minutes de marquage 40 % et 25 % de deutération (figure 52A). Cette différence est en accord avec les données obtenues dans l'état micellaire, qui montrent un gain d'accessibilité de cette région de l'hélice H2 dans le complexe bAnc1p-BA.



**Figure 52 : Cinétiques de deutération *in organello* de l'hélice H2.** Les cinétiques de deutération des deux régions recouvrant l'hélice H2, 71-77 (**A**) et 79-88 (**B**) ont été analysées après marquage dans la membrane des complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus). Les régions analysées sont localisées en orange dans la structure éclatée de bAnc1p.

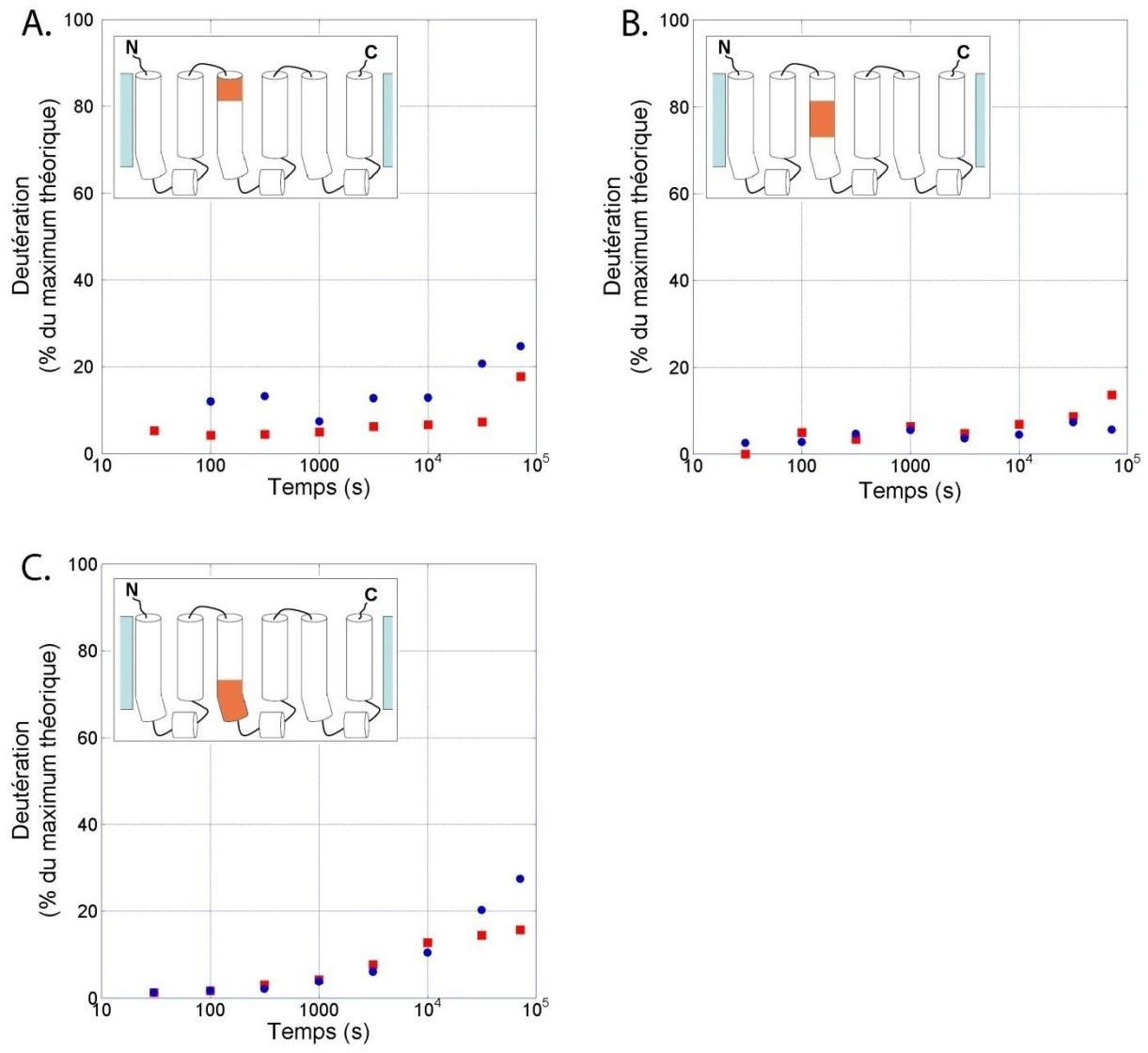
La région centrale de l'hélice H2 présente, à l'inverse de son extrémité N-terminale, une deutération plus importante dans le complexe bAnc1p-CATR que dans le complexe bAnc1p-BA atteignant respectivement 40 % et 10 % de la deutération maximale possible dans le temps de l'expérience (figure 52B). Cette deutération est également en accord avec les données obtenues précédemment dans l'état micellaire qui montrent une exposition plus importante de cette région dans le complexe bAnc1p-BA. Les données obtenues sur l'accessibilité de l'hélice H2 en présence des inhibiteurs montrent clairement un mouvement de cette hélice à travers la membrane, exposant tour à tour au solvant sa région C-terminale (dans le complexe bAnc1p-CATR) ou sa région centrale (dans le complexe bAnc1p-BA).

#### 2.4. Deutération de l'hélice H3 dans la membrane mitochondriale

L'accessibilité de l'hélice H3 a été suivie à l'aide de 3 peptides donnant des informations sur les régions 110-116, 118-128, 129-140, qui couvrent respectivement sa partie N-terminale (située du côté de l'espace intermembranaire), sa partie centrale (dans l'environnement membranaire), et son extrémité C-terminale (située du côté matriciel). Ces trois régions présentent une deutération similaire et peu intense (< 20 % de deutération à 2 heures et 45 minutes (10000s) ) dans les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA (figure 53). Cette faible deutération ne correspond pas à celle observée *in vitro* où l'extrémité N-terminale de l'hélice (110-116) était fortement deutérée dans le complexe bAnc1p-CATR (60 % après 2 h 45 min d'incubation dans du D<sub>2</sub>O), et son extrémité C-terminale (135-140) fortement marquée en présence de BA (90 % après 2 h 45 min) (figures 38A et 38D à 38F). L'absence de différence de marquage pour l'hélice H3 dans les complexes, tout comme le faible taux de deutération de ces régions, sont probablement la conséquence d'un contre-échange important lors de l'étape de purification de la protéine sur HTP.

#### 2.5. Deutération des autres régions de bAnc1p dans la membrane mitochondriale

Seuls trois autres peptides de bAnc1p ont pu être analysés lors de ces expériences. Ils permettent d'obtenir des informations sur les régions 141-159, recouvrant la moitié N-terminale de la boucle m2, 226-239 située dans l'hélice H5 et contenant la signature peptidique des transporteurs d'ADP/ATP mitochondriaux (RRRMM), et 248-256 localisée dans la boucle matricielle m3 (Figure 54). L'analyse de la deutération de ces trois régions montre des niveaux de marquages comparables entre les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA. En effet au bout de 1000 s de marquage les régions 142-159 (figure 54A) et 227-239 (figure 54B) sont deutérées respectivement à



**Figure 53 : Cinétiques de deutération *in organello* de l'hélice H3.** Les cinétiques de deutération des régions 110-116 (**A**), 118-128 (**B**) et 129-140 (**C**) ont été obtenues après marquage au deutérium des complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (rond bleus) dans la membrane mitochondriale. Les encarts montrent la structure éclatée de bAnc1p sur laquelle est localisée en orange la région analysée.

30 % et 10 % dans les deux complexes et la région 249-256 est deutérée à 25 % et 30 % (figure 54C) respectivement dans les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA. Ce faible taux de deutération des hélices transmembranaires ou des boucles matricielles est probablement dû au contre-échange important lors de la purification de bAnc1p et ne permet pas de conclure sur d'éventuelles différences entre les deux complexes.

## 2.6. Conclusion

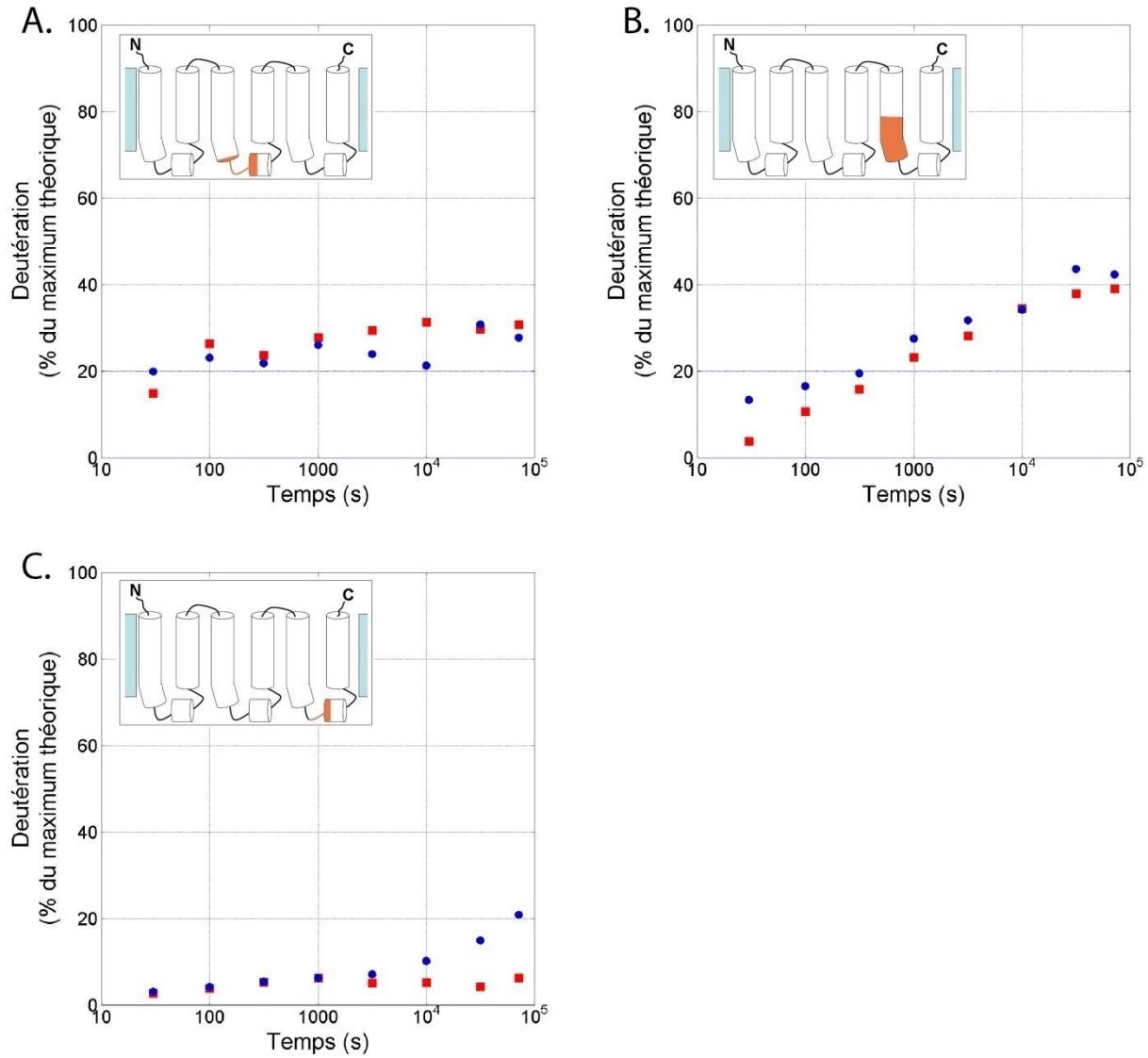
Les mises au point apportées à la méthode de purification de bAnc1p par chromatographie sur colonne d'HTP ont permis d'obtenir en moins d'une minute la protéine purifiée, en conditions acides, et suffisamment concentrée pour être analysée en spectrométrie de masse. L'optimisation des conditions de deutération de bAnc1p en complexe avec le CATR et le BA au sein de la membrane interne mitochondriale ont permis l'obtention des premières données d'accessibilité au deutérium de cette protéine dans son environnement naturel.

Les résultats obtenus lors des expériences *in organello* sont pour une part en accord avec ceux obtenus sur la protéine purifiée en Triton X-100. Cela est en particulier illustré pour les 100 premiers acides aminés, qui montrent une plus forte exposition au solvant dans le complexe bAnc1p-CATR des régions situées dans l'espace intermembranaire et, à l'inverse, une exposition moindre des régions situées du côté matriciel de la membrane mitochondriale. Cependant, les autres régions peptidiques observables par cette approche (118 à 159, 227 à 239 et 249 à 256) ont montré des niveaux de deutération très faibles, présentant peu de différences entre les deux complexes. Ce faible marquage est probablement la conséquence d'un fort contre-échange ayant lieu lors des étapes post-marquage, c'est-à-dire au cours de la purification sur HTP. De plus, il faut noter que seulement 45 % de la protéine a pu être analysée, ce qui est très inférieur au recouvrement obtenu lors des expériences *in vitro*. Cette différence de recouvrement probablement due à un problème dans l'étape de protéolyse induit par un mauvais contrôle de la quantité de protéine injectée.

Cependant, notre approche reste prometteuse, et des améliorations vont être apportées afin de réduire le contre-échange et d'obtenir une carte peptidique aussi complète que possible :

La durée de la cinétique d'échange dépassant plusieurs heures, il est nécessaire de vérifier la qualité du transporteur présent dans les mitochondries au cours de l'expérience.

- i) Pour cela, les sites de fixation de l' $[^3\text{H}]$ ATR seront titrés après différents temps d'incubation dans le milieu de deutération, et le résultat obtenu sera comparé aux données de fixation de cette préparation mitochondriale (voir Résultats, partie I, paragraphe 2.1).



**Figure 54: Cinétiques de deutération *in organello* des boucles matricielles m2 et m3 et de l'hélice H5.** Les boucles matricielles m2 et m3 ainsi qu'une partie de l'hélice H5 ont pu être analysées après deutération des complexes bAnc1p-CATR (carrés rouges) et bAnc1p-BA (ronds bleus) grâce aux régions 142-159 (**A**), 227-239 (**B**) et 249-256 (**C**). Celles-ci sont localisées en orange au sein de la structure éclatée de bAnc1p exposée dans l'insert.

- ii) En parallèle, de nouvelles expériences de séquençage seront réalisées, afin d'optimiser la protéolyse de bAnc1p extrait en condition acide.
- iii) L'étape d'ajout de tampon sera supprimée afin de limiter au maximum le temps de passage sur la colonne d'HTP. Dans ces conditions, la quantité de transporteur purifié à chaque temps sera ajustée en utilisant un lysat plus concentré et de volume plus important.
- iv) Enfin, de nouvelles expériences de deutération *in organello* seront réalisées sur des mitochondries inhibées avec du CATR, du BA, ou des nucléotides non transportés, mais aussi en absence d'inhibiteur, afin d'obtenir des informations sur l'accessibilité au solvant d'un plus grand nombre de conformations adoptées par bAnc1p.

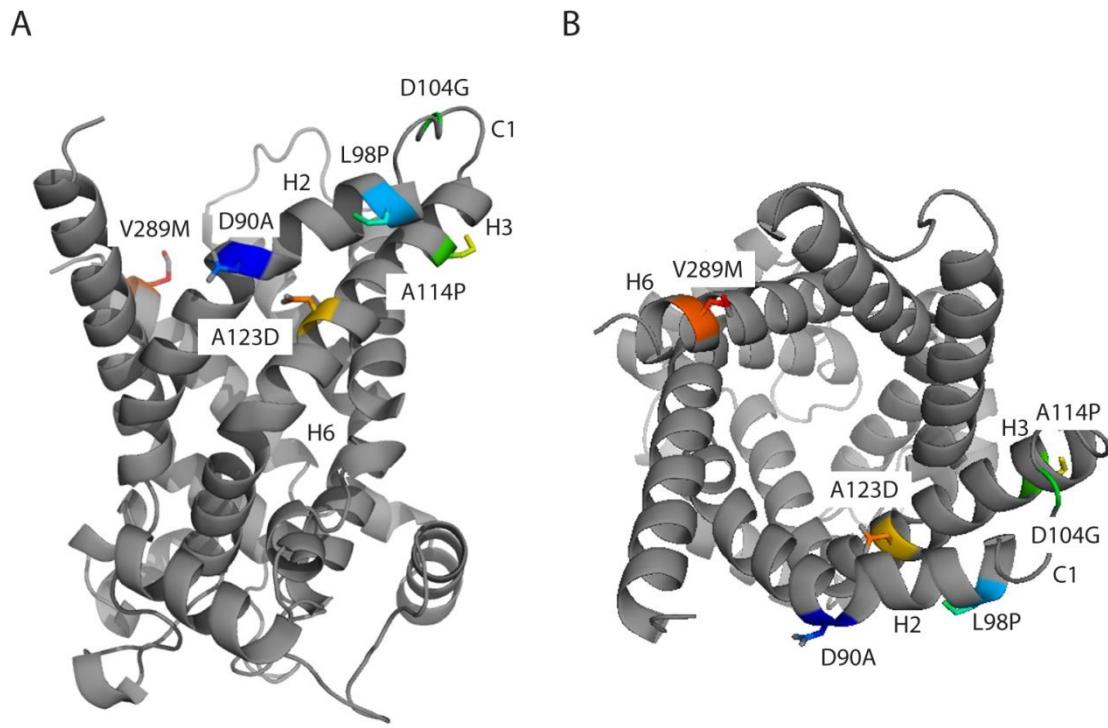
# PARTIE 4 : ETUDE DES MUTATIONS PATHOGENES DU TRANSPORTEUR D'ADP/ATP MITOCHONDRIAL HUMAIN

En parallèle des travaux réalisés sur la dynamique fonctionnelle du transporteur bovin complexé à ses inhibiteurs, j'ai abordé l'étude des mutations du transporteur humain hAnc1p exprimé principalement au niveau du muscle. Ces mutations pathogènes correspondent aux substitutions d'acides aminés suivants : A90D, L98P, D104G, A114P, A123D et V289M, et sont la cause de pathologies sévères, telles que des cardiomyopathies, ou handicapantes, telles que des ophtalmoplégies. Ces résidus sont tous localisés du côté cytosolique du transporteur, et 3 d'entre eux (A90D, L98P et A114P) se situent à l'interface lipide-protéine (figure 55). Cependant l'étude de ces différents mutants est rendue difficile pour plusieurs raisons :

1. Des cellules isolées de patients atteints de pathologies directement imputables au transporteur hAnc1p ne présentent aucun phénotype en culture.
2. La surexpression de hAnc1p dans les cellules en culture induit leur apoptose.
3. Le transporteur hAnc1p est peu produit chez *S.cerevisiae*.
4. Les conséquences fonctionnelles des mutations de ScAnc2p à des positions identiques ou similaires à celles des mutations humaines font l'objet de controverses.

De par son métabolisme particulier (fermentaire ou respiratoire), la levure *S.cerevisiae* représente un modèle de choix pour étudier les mutations pathogènes du transporteur hAnc1p. Afin de résoudre le problème lié à la faible expression du transporteur hAnc1p et de ses mutants dans *S.cerevisiae*, nous avons décidé d'aborder une autre approche, visant à exprimer dans la levure l'unique isoforme du transporteur d'ADP/ATP présent dans l'amibe *Dictyostelium discoideum* (DdAncAp). Le gène correspondant présente la particularité d'avoir 70 % d'identité de séquence avec hANC1 alors que ScANC2 n'en a que 48 % (Bof *et al.*, 1999). De plus, sur les 6 résidus d'acides aminés mutés dans les pathologies humaines, 3 sont strictement conservés dans le gène DdANCA (tableau 3).

L'étude des mutations pathogènes de hANC1 a débuté par une investigation des caractéristiques phénotypiques et biochimiques de la souche de levure dépourvue de transporteur d'ADP/ATP endogène et exprimant le transporteur DdAncAp (JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^+$ -pRS314-DdANCA). Une fois le modèle validé, nous avons abordé la caractérisation des mutations pathogènes de hANC1 strictement conservées entre ce gène et DdANCA. Il s'agit des mutants DdANCA-A94D, DdANCA-A126D et DdANCA-V291M qui correspondent aux mutations humaines A90D, A123D et V289M.



**Figure 55 : Modélisation de hAnc1p sur la structure de bAnc1p-CATR (Trézéguet *et al.*, 2008).** Les acides aminés dont la mutation est impliquée dans des pathologies sont représentés sous forme de bâtonnets dans une structure en ruban vue latéralement (**A**) ou depuis l'espace intermembranaire (**B**).

<b>hAnc1p</b>	<b>DdAncAp</b>
A90D	A94D
L98P	F102P
D104G	N.D.
A114P	I117P
A123D	A126D
V289M	V291M

**Tableau 3 : Mutations humaines dans le transporteur hAnc1p et leurs correspondances dans le transporteur DdAncA**

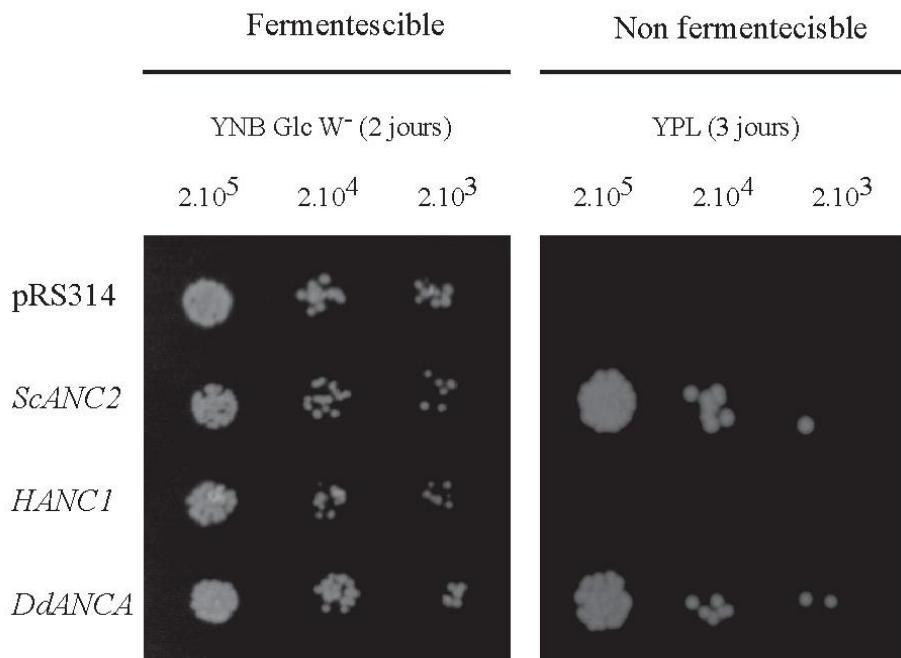
## 1. Validation du modèle DdAncAp exprimé dans *S.cerevisiae*

### 1.1. Croissance des levures

Le gène codant pour le transporteur DdAncAp, ainsi que les gènes ScANC2 et hANCI ont été clonés dans le plasmide pRS314 et ont servi à transformer une souche de levure dépourvue d'Anp (JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^{-}$ ) pour obtenir respectivement les souches JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^{-}$ -pRS314-DdANCA, JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^{-}$ -pRS314-ScANC2 et JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^{-}$ -pRS314-hANCI. Ces souches, ainsi que la souche contrôle JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^{-}$ -pRS314 contenant le plasmide sans insert, ont été cultivées sur un milieu solide, fermentescible ou non, afin de mettre en évidence, par simple visualisation, des différences de croissance (figure 56). Toutes les souches montrent une croissance identique sur milieu fermentescible, indiquant que les différents plasmides ne sont pas toxiques pour les différentes souches. En milieu non fermentescible, la faible production de la protéine humaine, hAnc1p, dans la souche JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^{-}$  ne permet pas d'amorcer la croissance des levures après 3 jours de culture (figure 56). Par contre, les souches exprimant le gène du transporteur sauvage ScANC2 et celui de l'amibe DdANCA présentent une croissance visible après 3 jours de culture, ainsi qu'un temps de génération identique d'environ 3 heures (tableau 4). En conclusion, l'expression des gènes DdANCA et ScANC2, et/ou l'activité des transporteurs DdAncAp et ScAnc2p, dans la levure, semblent être tout aussi efficaces.

### 1.2. Quantification du transporteur DdAncAp dans les mitochondries

La quantification précise des transporteurs DdAncAp et ScAnc2p dans la membrane mitochondriale a été réalisée par la mesure du nombre de sites de fixation de l' $[^3\text{H}]$ ATR. Cette expérience renseigne également sur l'affinité des différents transporteurs pour cet inhibiteur (tableau 4). Les résultats obtenus montrent que le transporteur DdAncAp est 3 fois moins produit dans les mitochondries de levure que le transporteur sauvage ScAnc2p (respectivement  $235 \pm 63$  et  $680 \pm 80$  pmoles de sites  $[^3\text{H}]$ ATR /mg de protéines totales). Il est intéressant de noter que la présence d'environ 200 pmoles d'un transporteur actif est suffisante pour permettre une croissance proche de celle de la souche exprimant le transporteur sauvage de levure (ScAnc2p). De plus, l'affinité du transporteur DdAncAp pour  $[^3\text{H}]$ ATR est équivalente à celle du transporteur ScAnc2p, puisque les constantes de dissociation ( $K_d$ ) pour les complexes transporteur-ATR sont respectivement de  $292 \pm 66$  et  $375 \pm 44$  nM (tableau 4). Le transporteur DdAncAp est donc correctement replié dans la membrane mitochondriale.



**Figure 56 : Analyse phénotypique de la souche JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> (dépourue de transporteur d'ADP/ATP) transformée par le plasmide pRS314 portant les gènes ScANCA, HANC1, DdANCA.** Les clones transformés ont été dilués de  $2.10^5$  à  $2.10^3$  cellules/ml et déposés en gouttes (20 µL) sur un milieu solide sélectif fermentescible (YNB glucose dépouvu de tryptophane : YNB Glc W-) ou riche non fermentescible (YPL) et mis à l'étuve à 28°C pendant plusieurs jours.

### 1.3. Paramètres cinétiques de l'échange ADP/ATP pour le transporteur DdAncAp

Les paramètres cinétiques de l'échange ADP/ATP dans les mitochondries contenant DdAncAp et ScAnc2p ont été mesurés en suivant la cinétique de l'efflux d'ATP en fonction des concentrations d'ADP externe ajoutées dans le milieu. Cette expérience est réalisée sur des mitochondries non congelées, placées dans des conditions de phosphorylation, et utilisant l' $\alpha$ -cétoglutarate exogène comme substrat respiratoire. Dans nos conditions expérimentales, c'est à dire compte tenu de la présence de  $Mg^{2+}$ , la concentration en ADP libre présent dans le milieu correspond à la fraction transportable de l'ADP, a été calculée grâce au logiciel WebMAXC Standard. Elle représente environ 1/3 de la concentration d'ADP totale.

Les vitesses de transport mesurées avec les mitochondries contenant le transporteur DdAncAp et ScAnc2p ont été reportées dans le tableau 4. Les vitesses maximales d'échange diffèrent d'un facteur 3 atteignant respectivement 360 et 1080 nmol d'ATP/min/mg protéines totales (tableau 4). Par contre, les constantes catalytiques ( $k_{cat}$ ) des deux transporteurs sont identiques (environ 1600 min<sup>-1</sup>). Il en est de même pour les  $K_M$  pour l'ADP externe (respectivement 2,3 ± 0,4 et 3,7 ± 2,0  $\mu M$ ). Ces résultats montrent que les paramètres cinétiques et enzymatiques des transporteurs DdAncAp et ScAnc2p sont identiques ( $k_{cat}$ , Kd pour l'<sup>3</sup>H-ATR et  $K_M$ , etc.) et que seul l'import dans les mitochondries varie.

En conclusion, l'expression de DdANCA dans une souche de levure dépourvue de transporteur d'ADP/ATP a permis de restaurer une croissance sur milieu non fermentescible très proche de celle obtenue en exprimant le gène sauvage ScANC2. De plus, le mécanisme de transport de DdAncAp présente des caractéristiques identiques à celles de ScAnc2p. Notre modèle étant validé dans la levure, nous avons donc abordé l'étude des mutations pathogènes humaines en analysant leur effet sur l'expression et les paramètres cinétiques du transporteur DdANCA dans *S. cerevisiae*.

Souche	<i>ScANC2</i>	<i>DdANCA</i>
<i>Culture de levure en YPL</i> <sup>a</sup>		
Temps de génération (h)	2,5	3,0
Plateau de saturation D.O. <sub>600 nm</sub>	12	11
<i>Fixation [<sup>3</sup>H]ATR</i> <sup>b</sup>		
<i>B</i> <sub>max</sub> pmol/mg protéines	680 ± 80	235 ± 63
Kd (nM)	375 ± 44	292 ± 66
<i>Echange ADP/ATP</i> <sup>c</sup>		
<i>V</i> <sub>max</sub> (nmol ATP/min/mg prot.)	1080 ± 127	360 ± 69
<i>k</i> <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	1538 ± 214	1685 ± 231
<i>K</i> <sub>M</sub> ADP externe (μM)	3,7 ± 2,0	2,3 ± 0,4

<sup>a</sup> Les plateaux de saturation et les temps de générations ont été déterminés à partir de culture liquide en milieu riche YPL à 28°C. Les plateaux de saturation correspondent à la valeur des D.O.<sub>600 nm</sub> mesurées durant la phase stationnaire des différentes souches.

<sup>b</sup> Les paramètres de fixation du [<sup>3</sup>H]ATR sont la moyenne de 3 expériences indépendantes

<sup>c</sup> Les *V*<sub>max</sub> et les *K*<sub>M</sub> apparents pour l'ADP libre externe ont été calculés à partir des données cinétiques en utilisant l'équation de Michaelis-Menten. Le *k*<sub>cat</sub> correspond à la vitesse d'un cycle de transport d'une unité de transport en utilisant le fait qu'1 mole d'ATR se fixe sur une mole d'unité de transport. Les données sont la moyenne de 3 expériences indépendantes.

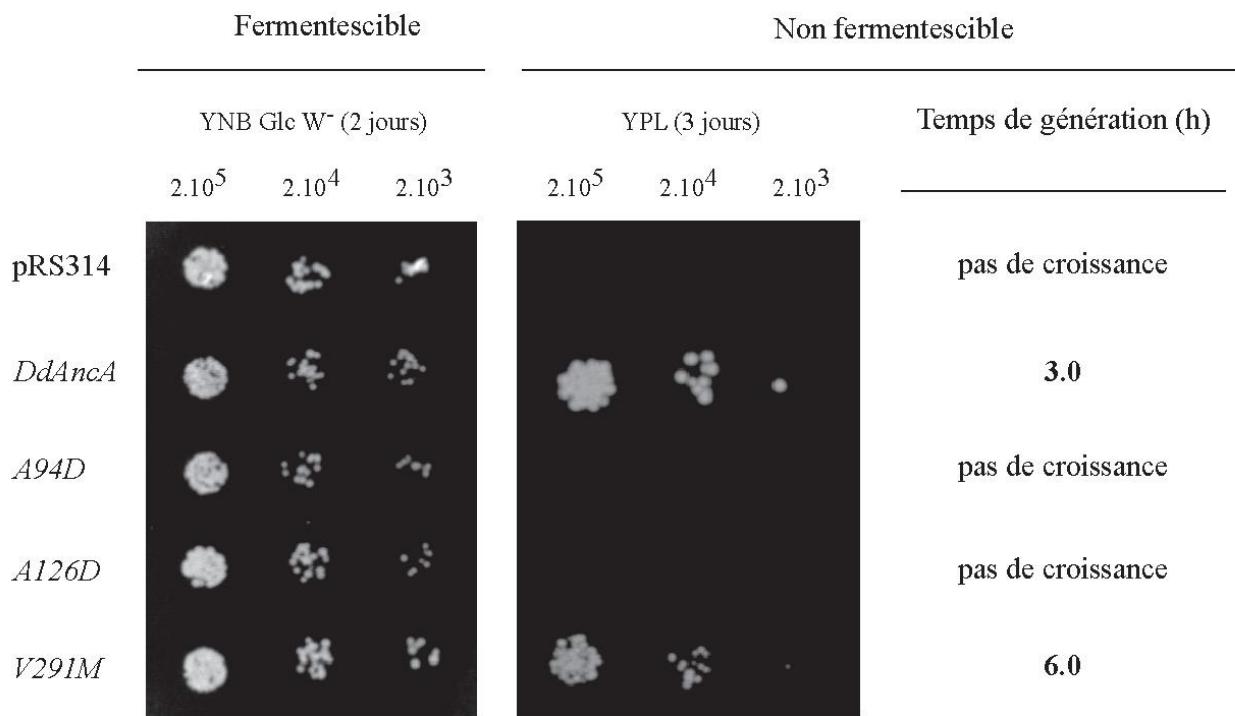
**Tableau 4 : Données de croissance des souches de levures, de fixation de l'[<sup>3</sup>H]ATR et paramètres cinétiques du transport d'ADP/ATP obtenus à partir de mitochondries isolées des souches JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-ScANC2 et JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-DdANCA.**

## 2. Etude des mutations pathogènes de hAnc1p dans la souche JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-DdANCA

Afin d'étudier l'effet des mutations humaines A90D, A123D et V289M, qui correspondent respectivement aux mutants A94D, A126D et V291M dans DdAncAp, des expériences similaires à celles décrites précédemment pour DdAncAp ont été réalisées à partir des souches JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-pRS314-DdANCA-A94D, JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-pRS314-DdANCA-A126D et JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-pRS314-DdANCA-V291M également construites au cours de ce travail.

### 2.1. Croissance des levures exprimant les transporteurs DdAncAp mutés

La croissance de ces souches a tout d'abord été analysée comparativement sur milieux riches solides, fermentescibles ou non (figure 57). Les résultats obtenus montrent une croissance identique sur milieu fermentescible, indiquant que les différents plasmides ne sont pas toxiques pour les souches correspondantes. En milieu non fermentescible, seules les souches exprimant le gène DdANCA et DdANCA-V291M présentent une croissance visible après 3 jours de culture. Ce résultat montre que l'expression des gènes DdANCA-A94D et DdANCA-A126D ne permet pas de restaurer dans le temps de l'expérience la croissance d'une souche dépourvue de transporteur d'ADP/ATP sur un milieu non fermentescible. Le temps de génération de la souche exprimant le gène DdANCA-V291M a été mesuré et correspond au double de celui de la souche exprimant le transporteur sauvage *DdANCA*, respectivement 6 et 3 heures (Tableau 5). En conclusion, les mutations A94D et A126D introduites dans DdAncAp entraînent un problème au niveau du transporteur, altérant soit son import, soit son activité de transport dans les mitochondries de levure. L'expression de DdANCA-V291M permet par contre une croissance de cette souche sur un milieu non fermentescible. L'augmentation du temps de génération observée pour la souche JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-pRS314-DdANCA-V291M peut traduire une plus faible quantité de transporteur importé dans la mitochondrie, ou un problème dans le mécanisme global du transport pour ce mutant. Suite à l'obtention de ces résultats, nous nous sommes particulièrement intéressés à ce mutant dans la suite du projet.



**Figure 57 : Analyse de la croissance des souches de levure exprimant différents transporteurs d'ADP/ATP mutés.** Les souches de levures JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> contenant les plasmides pRS314 vide (pRS314), pRS314-DdANCA, pRS314-DdANCA-A94D, pRS314-DdANCA-A126D, pRS314-DdANCA-V291M, diluées de  $2.10^5$  à  $2.10^3$  cellules/ml, sont déposées sur des milieux solides YNB glucose dépourvus de tryptophane (Glc W-) ou YPL. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C dans des conditions aérobies pendant plusieurs jours. Les temps de génération ont été déterminés à partir de culture liquide en milieu riche YPL à 28°C.

## 2.2. Quantification du transporteur DdAncAp-V291M dans les mitochondries

La quantité de transporteur DdAncAp-V291M présent dans les mitochondries de levure a été estimée comme décrit précédemment, c'est-à-dire, en utilisant un dosage à l'aide d' $[^3\text{H}]$ ATR (tableau 5). Les résultats obtenus montrent que la quantité de transporteur DdAncAp-V291M présente dans les mitochondries est deux fois plus importante que celle du transporteur sauvage DdAncAp (respectivement  $416 \pm 65$  et  $235 \pm 63$  pmoles/mg de protéines totales). Cette expérience nous a également permis d'accéder au  $K_d$  du complexe DdAncAp-V291M-[ $[^3\text{H}]$ ATR, qui est identique à celui du complexe DdAncAp-[ $[^3\text{H}]$ ATR (respectivement  $328 \pm 63$  et  $292 \pm 66$  nM). Ce résultat montre que les transporteurs sauvages ou mutés sont capables de reconnaître cet inhibiteur de manière identique, et donc que la mutation V291M n'affecte probablement pas le repliement de la protéine.

## 2.3. Paramètres cinétiques de l'échange ADP/ATP pour le transporteur DdAncAp-V291M

La mesure des cinétiques d'export de l'ATP a été réalisée pour le mutant DdAncAp-V291M dans les conditions décrites dans le paragraphe 1.3. Le transporteur muté présente une  $V_{max}$  de  $114 \pm 69$  nmol ATP/min/mg de protéines totales, bien inférieure à celle mesurée pour DdAncAp (tableau 5). Comme le transporteur muté est 2 fois plus présent dans les mitochondries que le sauvage, la  $k_{cat}$  caractérisée de ce mutant est beaucoup plus faible par rapport au transporteur sauvage (respectivement  $274 \pm 34$  et  $1685 \pm 231$  min $^{-1}$ ). Les mesures des  $K_M$  pour l'ADP externe ne sont pas significativement éloignées (tableau 5). Ces résultats montrent donc que le mutant DdAncAp-V291M présente un mécanisme de transport déficient mais conserve ses propriétés de reconnaissance et de fixation de ligands, qu'ils soient substrat (comme l'ADP) ou inhibiteur (comme l'ATR).

## 3. Conclusion

L'étude des mutations humaines induisant des pathologies chez l'homme a débuté dans le laboratoire à l'aide d'un système hybride, basé sur l'expression hétérologue de l'unique isoforme du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de l'amibe *Dyctostelium discoideum* dans une souche de levure *S. cerevisiae*. Cette étude a permis tout d'abord de valider ce modèle, en montrant que la protéine de l'amibe était capable de restaurer, à l'image du transporteur sauvage de levure ScAnc2p,

Souche	<i>DdANCA</i>	<i>DdANCA-V291M</i>
<i>Culture de levure en YPL</i> <sup>a</sup>		
Temps de génération (h)	3.0	6.0
Plateau de saturation D.O. <sub>600 nm</sub>	11	6
<i>Fixation [<sup>3</sup>H]ATR</i> <sup>b</sup>		
<i>B</i> <sub>max</sub> pmol/mg protéines	235 ± 63	416 ± 65
Kd (nM)	292 ± 66	328 ± 63
<i>Echange ADP/ATP</i> <sup>c</sup>		
<i>V</i> <sub>max</sub> (nmol ATP/min/mg prot.)	360 ± 69	114 ± 69
<i>k</i> <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	1685 ± 231	274 ± 34
<i>K</i> <sub>M</sub> ADP externe (μM)	2,3 ± 0,4	3,7 ± 0,7

<sup>a</sup> Les plateaux de saturation et les temps de génération ont été déterminés à partir de culture liquide en milieu riche YPL à 28°C. Les plateaux de saturation correspondent à la valeur des D.O.<sub>600 nm</sub> mesurées durant la phase stationnaire des différentes souches.

<sup>b</sup> Les paramètres de fixation du <sup>3</sup>H-ATR sont la moyenne de 3 expériences indépendantes.

<sup>c</sup> Les *V*<sub>max</sub> et les *K*<sub>M</sub> apparents pour l'ADP libre externe ont été calculés à partir des données cinétiques en utilisant l'équation de Michaelis-Menten. Le *k*<sub>cat</sub> correspond à la vitesse de réalisation d'un cycle de transport d'une unité de transport en utilisant le fait qu'1 mole d'ATR se fixe sur une mole d'unité de transport. Les données sont la moyenne de 3 expériences indépendantes.

**Tableau 5 : Données de croissance des souches de levures, de fixation de l'[<sup>3</sup>H]ATR et paramètres cinétiques du transport d'ADP/ATP obtenus à partir de mitochondrie isolées des souches JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-DdANCA et JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>-DdANCA-V291M.**

la croissance sur un milieu non fermentescible d'une souche de levure dépourvue de transporteur endogène. Ces résultats nous ont permis d'appréhender l'étude de 3 mutations entraînant des pathologies humaines dont les acides aminés sont strictement conservés entre hAnc1p et DdAncAp (tableau 3). Les premiers résultats obtenus montrent que la présence des mutations A94D, A126D et V291M dans la protéine DdAncAp affecte plus ou moins fortement la croissance des levures sur milieu non fermentescible. L'étude biochimique du mutant DdAncAp-V291M a permis de montrer une altération du mécanisme intrinsèque du transport des nucléotides par rapport à la protéine DdAncAp. Celle-ci explique probablement le retard de croissance observé sur milieu lactate pour les levures exprimant ce transporteur muté.

# **DISCUSSION GENERALE**

Au cours de ma thèse, j'ai abordé l'étude du transporteur d'ADP/ATP à l'aide de deux approches distinctes : 1. L'échange H/D couplé à la MS. 2. L'analyse dans la levure des mutations du gène *HANCI* causant des pathologies humaines *via* un autre transporteur d'ADP/ATP modèle. Ces deux approches ont nécessité l'utilisation d'un éventail de techniques biochimiques, biophysiques et de biologie moléculaire, et l'utilisation de plusieurs modèles biologiques, principalement le bœuf et la levure. La première approche, l'étude des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA par DXMS, a représenté la majeure partie de mon travail. Elle a été abordée en 3 parties.

## 1. Mise en œuvre de la méthode d'analyse par MS en présence de détergent

La technique de DXMS, largement utilisée dans les études structure-fonction des protéines solubles, et plus récemment dans leurs interactions transitoires avec des lipides (Man *et al.*, 2007), n'a jamais été appliquée à l'étude des protéines membranaires. Ce travail représente donc un pas en avant prometteur. Un point central de mon travail a concerné la mise au point d'un protocole rapide et efficace pour éliminer le détergent, incompatible avec la technique d'analyse par MS, tout en préservant les peptides d'intérêt et leur marquage au deutérium. L'utilisation du DCM comme solvant lors de l'extraction du détergent sur phase solide s'est révélée particulièrement efficace. Du fait de sa forte hydrophobicité, ce solvant non protique s'est avéré bien adapté pour extraire les détergents et les molécules hydrophobes non chargées, et préserve les peptides retenus dans la Micro-Trap. En effet, dans des conditions optimales d'utilisation, aucune perte de peptide n'a pu être mise en évidence lors des lavages au DCM dans les expériences réalisées avec l'aMb, pas plus qu'une perte significative de deutération. Cependant, l'aMb n'est pas une protéine membranaire et, même si elle interagit avec des lipides dans certaines conditions, l'affinité des peptides issus de cette protéine pour le détergent est probablement plus faible que celle des peptides issus d'une protéine transmembranaire comme le transporteur d'ADP/ATP. Comme il a été impossible d'analyser les peptides issus de la digestion de bAnc1p sans recourir à ce contrôle, on ne peut pas exclure qu'elle ait été à l'origine de la perte de peptides très hydrophobes. Cependant, les difficultés rencontrées pour protéolyser la partie C-terminale du transporteur peuvent également expliquer en partie le recouvrement partiel de la séquence primaire.

Cette technique d'élimination du détergent par extraction sur phase solide n'est pas spécifique du Triton X-100, ni même du transporteur d'ADP/ATP bovin, et peut probablement être adaptée à d'autres détergents comme les Brij et à d'autres protéines membranaires. D'ailleurs, un projet visant à étudier la porine VDAC en DXMS a débuté dans notre laboratoire. L'adaptation du protocole de

DXMS aux protéines membranaires représente donc une avancée significative. De plus, cette technique n'est pas limitée à l'échange H/D mais pourrait s'appliquer à d'autres types d'études menées sur les protéines membranaires, comme leur séquençage ou la localisation de régions photomarquées. En effet, l'extraction du détergent par des solvants peut être effectuée à des pH et à des températures variées, et de manière plus efficace que dans les conditions bien spécifiques dictées par les expériences de DXMS. Cependant, elle présente quelques limitations dans le choix du solvant, du détergent et dans son utilisation. En effet, la nature du solvant utilisé est critique pour le bon déroulement de l'analyse. Le solvant doit présenter plusieurs propriétés : i) tout d'abord, il doit être très peu miscible à l'eau car un mélange eau/solvant serait très éluotrope et entraînerait les peptides d'intérêt en même temps que le détergent ; ii) ensuite, il doit être suffisamment hydrophobe pour solubiliser spécifiquement le détergent. Cette contrainte exclut par exemple les solvants présentant des alcools à longue chaîne carbonée tels que l'octanol. Le détergent utilisé doit être extrêmement soluble dans le solvant organique choisi. Les détergents ioniques sont donc exclus. La plupart des détergents non ioniques pourront être extraits spécifiquement par le DCM ou le TCM, à l'exception des alkyl-glycosides qui présentent une solubilité trop faible dans ces solvants, et des aminoxydes en milieu acide à cause de la protonation de la fonction aminoxyde.

## 2. Deutération des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA

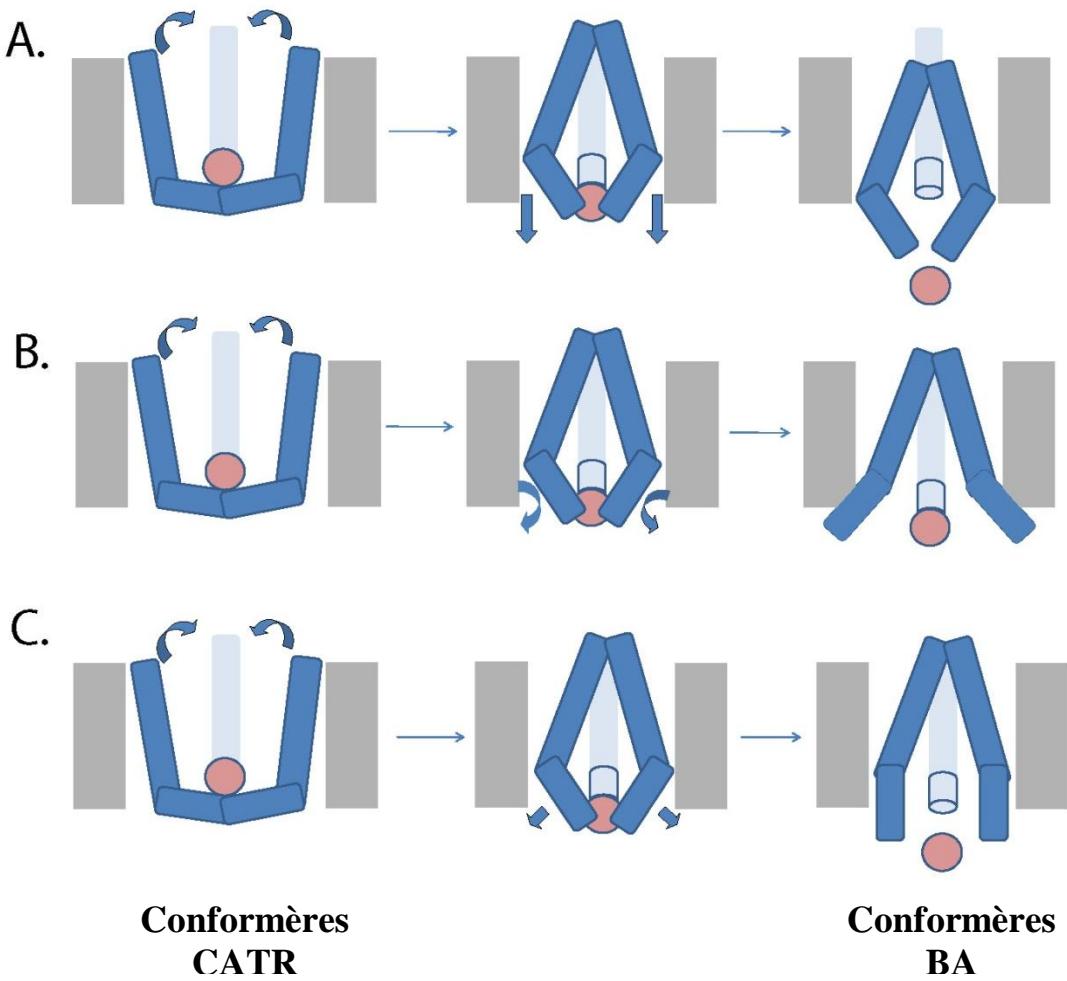
La deuxième partie de cette étude a consisté à mesurer les cinétiques d'échange H/D de bAnc1p en complexe avec ses inhibiteurs. Les données obtenues à l'aide de cette méthode ont été analysées en se basant sur les données biochimiques disponibles dans la littérature ainsi que sur la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR. Cette approche a permis de mettre en évidence les différences d'accessibilité au deutérium du transporteur solubilisé dans des micelles de détergent en fonction de l'inhibiteur testé.

Les résultats de mon étude sont compatibles avec la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR ainsi qu'avec les différences d'accessibilités des complexes transporteur-inhibiteur décrites dans la littérature à l'aide de différentes approches (marquage chimique, immunomarquage, protéolyse ménagée, *etc.*). Par conséquent, l'ensemble de ces données valide l'utilisation du DXMS dans l'analyse conformationnelle du transporteur en solution. Par exemple, nous avons pu montrer que les régions matricielles ou intermembranaires du complexe bAnc1p-CATR sont bien plus exposées au solvant que les segments transmembranaires qui sont protégés du milieu aqueux par la micelle de détergent ; résultat qui est en accord avec la structure 3D (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). L'analyse du

complexe bAnc1p-BA en DXMS montre une perte d'accessibilité au solvant de la partie intermembranaire par rapport au complexe bAnc1p-CATR, et inversement pour la partie matricielle. Ce résultat est en accord avec les données d'immunomarquage de l'extrémité N-terminale de bAnc1p qui montrent que cette partie du transporteur bovin est plus accessible à l'anticorps en présence de CATR qu'en présence de BA (Brandolin *et al.*, 1989). Les travaux réalisés sur le transporteur de levure ScAnc2p ont également confirmé ce constat. En effet, l'extrémité C-terminale de l'hélice 2 de ScAnc2p a été montrée plus accessible à des réactifs chimiques de thiols dans le complexe transporteur-CATR que dans le complexe transporteur-BA (Kihira *et al.*, 2005). Cette adéquation entre les données de la littérature et celles obtenues au cours de ce travail est aussi vérifiée pour les régions matricielles du transporteur qui présentent dans le complexe BA une accessibilité supérieure à des protéases et à de nombreux réactifs chimiques. C'est le cas, d'une part des lysines 42, 146 et 244 de bAnc1p (situées respectivement dans les boucles matricielles m1, m2 et m3) qui sont accessibles à des protéases uniquement dans le complexe bAnc1p-BA (Marty *et al.*, 1992; Brandolin *et al.*, 1993) et d'autre part des cystéines 56 dans bAnc1p et 73 et 271 dans ScAnc2p dont la réactivité au NEM ou à l'EMA s'est avérée supérieure en présence de cet inhibiteur (Boulay et Vignais, 1984; Majima *et al.*, 1993; Majima *et al.*, 1994).

Cependant, des différences ont aussi été constatées entre nos résultats et la littérature. Tout d'abord, la cystéine 256 dans bAnc1p présente une deutération rapide en présence de BA alors que son marquage par l'EMA est inhibé dans ce complexe (Majima *et al.*, 1994). Cette divergence de résultat peut être expliquée soit par les différences de taille des réactifs utilisés soit par les conditions dans lesquelles ont été réalisées ces expériences, respectivement un marquage sur des SMP ou dans des micelles (voir Résultats, partie II, paragraphe 1.2). Ensuite, le mouvement de balancier de la boucle m2, observé entre les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA, exposant alternativement le résidu C161 à l'EMA et déplaçant en même temps un site de coupure à la trypsin de la liaison 163-164 vers 178-179 (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005), n'a pas été mis en évidence lors de nos expériences de DXMS sur le transporteur bovin. Néanmoins, cette observation confirme une nouvelle fois que ces deux protéines présentent des différences conformationnelles (voir Introduction, paragraphe 4.5).

Enfin, les données obtenues par DXMS ont permis de mettre en évidence de nouvelles différences conformationnelles entre ces complexes et donc de mieux appréhender la conformation du transporteur bovin en complexe avec le BA. Ainsi, la perte d'accessibilité au solvant observée pour les régions situées du côté intermembranaire et le gain de deutération mis en évidence pour les régions matricielles en présence de BA nous ont permis de proposer deux modèles conformationnels



**Figure 58 : Modèle hypothétique du mécanisme de transport d'ADP/ATP réalisé par bAnc1p.**  
 bAnc1p est schématisé transversalement à la membrane interne représentée par des rectangle gris, l'espace intermembranaire localisé vers le haut et la matrice vers le bas. Les hélices H1 et H3 sont représentées chacune en deux parties (avant et après le coude induit par les prolines) par deux rectangles bleus foncés. Le rectangle bleu clair ainsi que le cylindre schématise en arrière plan l'hélice H5 segmentée de la même manière. Le nucléotide transporté est représenté par un rond orange. Tous les modèles proposés font d'abord intervenir un basculement des hélices H1 et H3. Ensuite, ces hélices peuvent soit s'enfoncer dans la membrane et ouvrir une cavité dans l'espace intermembranaire (**A**), soit subir une rotation autour d'un axe perpendiculaire à la membrane induisant un éloignement des coudes situés après les prolines (**B**), ou se déplier et ouvrir ainsi une cavité dans l'espace intermembranaire (**C**)

de bAnc1p complexé à cet inhibiteur (figure 45). Ces derniers exposent une cavité fermée du côté cytosolique et ouverte vers la matrice mitochondriale (voir paragraphe 2.6 de la partie II des Résultats). Bien que les données obtenues en DXMS pour les hélices H4 et H5 soient partielles, et donc sujettes à controverse, nous proposons une ouverture dissymétrique de la cavité dans nos modèles, en raison de l'absence de différence d'accessibilité entre les deux complexes au niveau de l'hélice H4 et la faible variation d'accessibilité observée pour l'hélice H5 (uniquement au niveau de sa région N-terminale). Cette dissymétrie dans le mouvement des hélices transmembranaires impaires est en accord avec la présence, en aval du coude de l'hélice H5, d'un cluster peptidique très conservé, la séquence RRRMM, qui différencie cette hélice impaire des deux autres. De plus, des analyses *in silico* montrent que l'hélice H5 présenterait par rapport aux hélices H1 et H3 une mobilité moindre, caractérisée notamment par une très faible variation possible de l'angle créé par la proline (Wang et Tajkhorshid, 2008). Il semble donc que cette région de la protéine soit peu mobile et puisse être décrite ainsi dans nos modèles.

Le mécanisme d'ouverture de la cavité vers la matrice mitochondriale reste tout de même peu défini, et nous n'avons pas obtenu d'informations au cours de cette étude permettant de l'identifier. Pour cette raison, nous proposons plusieurs mécanismes de transport des nucléotides illustrant les possibilités d'ouverture de la cavité contenant le nucléotide vers la matrice mitochondriale. Le premier modèle (figure 58A) est basé sur le conformère BA exposé dans la figure 45A, où l'ouverture de la cavité serait induite par un glissement des hélices H1, H2 et H3, dans la membrane interne mitochondriale, de l'espace intermembranaire vers la matrice. Ce mouvement est de plus en accord avec les données de cryofracture réalisées sur des liposomes contenant les différents complexes. Celles-ci ont montré un changement de distribution des complexes dans la membrane : le complexe bAnc1p-CATR étant prédominant dans la face externe de la membrane et inversement pour le complexe bAnc1p-BA (Brandolin *et al.*, 1980). Les deux autres modèles détaillent les mouvements possibles des coudes transmembranaires en se basant sur le conformère BA exposé dans la figure 45B. Ces changements conformationnels pourraient être dûs : i), soit à une rotation, autour d'un axe formé par la partie de l'hélice transmembranaire en amont du coude, qui entraînerait un éloignement des hélices matricielles, mais conserverait intact l'angle du coude (figure 58B) ; ii), soit à un dépliement des coudes formés par les prolines, modifiant alors la valeur de cet angle (figure 58C). Le résultat serait globalement similaire et tendrait à éloigner les hélices matricielles de l'axe de la protéine (augmentant probablement leur accessibilité au solvant) afin de ne pas obstruer la cavité et permettre le largage du nucléotide. Dans tous ces modèles, les mouvements des hélices H1, H2 et H3 engendreraient les protections et les expositions au deutérium observées à partir de nos analyses.

Cependant, ces modèles sont d'une part calqués sur la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR et d'autre part basés sur les différences d'accessibilité observées en DXMS. Ils ne représentent donc que le monomère de bAnc1p ayant fixé le CATR et ne prennent pas en compte l'oligomérisation de bAnc1p mise en évidence par de nombreuses approches biochimiques (Riccio *et al.*, 1975; Brandolin *et al.*, 1982; Block et Vignais, 1984) et biophysiques (Hackenberg et Klingenberg, 1980; Block *et al.*, 1982). Les cinétiques de deutération du complexe bAnc1p-CATR corrèlent parfaitement avec sa structure 3D, et aucune preuve de la présence d'un dimère n'a été obtenue par notre approche. Cette contradiction entre la biochimie et la biologie structurale pourrait être une conséquence des étapes de préparation de la protéine qui sont similaires en DXMS à celles utilisées lors des expériences de cristallisation. En effet, la technique de purification de bAnc1p par non rétention sur une colonne d'HTP en absence de phosphate est identique pour ces deux approches. Il en est de même pour l'utilisation de concentrations en détergent élevées pour extraire le transporteur de son environnement lipidique, ainsi que pour l'étape de concentration de la protéine, pendant laquelle la quantité de détergent dans la préparation est difficilement contrôlable. Le détergent peut dépasser aisément les 10 % (p/v) et pourrait alors provoquer une monomérisation de bAnc1p. En effet, des expériences de centrifugation analytique menées sur le transporteur bAnc1p extrait en Triton X-100 en complexe avec ses inhibiteurs ont montré que celui-ci était principalement monomérique (Nury *et al.*, 2008).

Alors que la présence du CATR au sein de la cavité formée par bAnc1p a été clairement observée après purification et concentration du complexe (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003), aucune donnée ne nous permet d'affirmer que le BA reste complexé au transporteur bAnc1p dans ces conditions expérimentales. En effet, il a été proposé que les fortes concentrations en détergent présentes dans nos préparations puissent engendrer une dissociation du complexe bAnc1p-BA à cause de la nature lipidique de cet inhibiteur. L'analyse de l'accessibilité au solvant de ce complexe pourrait alors être biaisée, et correspondre entièrement ou en partie à un autre intermédiaire conformationnel. Les travaux réalisés par Agathe Afchain durant sa thèse, visant à mettre en évidence la présence d'un complexe bAnc1p-BA après purification et concentration en vue de sa cristallisation, n'ont malheureusement pas permis de trancher en faveur ou non d'une dissociation du complexe. En effet, il a été impossible de différencier les micelles contenant le complexe bAnc1p-BA de celles contenant des protéines et le BA non lié.

### 3. Deutération des complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA dans les membranes mitochondrielles

Comme nous l'avons exposé dans les pages précédentes, les étapes liées à la préparation de la protéine peuvent introduire un certain nombre de biais altérant la qualité des conformations des complexes transporteur-inhibiteur. Afin de s'affranchir des problèmes biochimiques liés à la préparation de la protéine, une étude de deutération *in organello* du transporteur d'ADP/ATP bovin a débuté en parallèle. Cette approche a permis de réaliser le marquage de bAnc1p au sein des membranes mitochondrielles en s'affranchissant des contraintes liées aux étapes d'extraction et de concentration. Son objectif est d'obtenir des informations conformationnelles sur bAnc1p, non seulement en complexe avec le CATR et le BA, mais aussi avec des inhibiteurs moins affins pour le transporteur, comme des dérivés non transportés de nucléotides ou tout autre effecteur capable de modifier la conformation du transporteur bAnc1p.

Cependant, cette méthode encore en développement au laboratoire présente une étape limitante, celle correspondant à la purification des complexes sur colonne d'HTP, qui aboutit à une perte d'information non négligeable, due à un contre-échange très important. En effet, même si cette méthode de purification est simple et rapide, elle ne peut être réalisée qu'à des pH supérieurs à 6, sinon les cristaux de phosphate de calcium sont dissous et le phosphate alors relâché va modifier le pH du milieu jusqu'à ce que celui-ci soit proche de 6. Afin de réduire au maximum le temps de purification, l'utilisation de lysats plus concentrés et de plus grand volume (150 à 200 µL à 20 mg/mL) permettrait d'une part de s'affranchir de l'ajout de tampon au dessus du lysat pour obtenir suffisamment de transporteur marqué, et d'autre part de réduire le temps de passage sur la colonne d'HTP. De plus, le recouvrement de la séquence peptidique observé dans cette expérience est nettement inférieur à celui obtenu dans l'approche en solution. Cette perte de qualité au niveau de la digestion peut avoir plusieurs raisons : i) elle peut tout d'abord être due à un mauvais contrôle de la quantité de la protéine purifiée à chaque temps de la cinétique, qui serait induit par la nécessité de travailler très rapidement avec des colonnes d'HTP préparées manuellement. ii) Elle peut aussi être liée au milieu contenant bAnc1p qui diffère en fonction du marquage réalisé en solution ou dans les membranes. En effet, les sels présents dans l'échantillon digéré sont principalement amenés par le milieu de lyse contenant 500 mM NaCl. Dans l'expérience réalisée en solution, celui-ci est tout d'abord dilué environ 3 fois lors de la chromatographie sur colonne d'HTP en conditions classiques puis 10 fois lors de la dilution nécessaire pour marquer la protéine au deutérium (voir Matériel et Méthodes paragraphe 1.9.1). Par contre, dans l'expérience réalisée *in organello*, ce

milieu de lyse n'est dilué que deux fois par l'ajout du tampon destiné à augmenter la quantité de transporteur extrait (voir Résultats, partie III paragraphe 1.3). Ainsi, la concentration en sels de l'échantillon digéré sur la colonne varie environ d'un facteur 15 au profit de l'analyse *in organello* et pourrait donc entraîner une baisse d'activité de la pepsine. iii) Enfin, la purification de la protéine en conditions acides peut aussi engendrer des modifications la rendant moins sensible à la protéolyse. Ces deux dernières hypothèses restent à vérifier.

Cette étude a permis d'obtenir les premières données de deutération de bAnc1p dans la membrane interne mitochondriale. Sa mise au point a montré qu'il était nécessaire d'augmenter le temps d'incubation des membranes mitochondrielles en présence de D<sub>2</sub>O par rapport aux expériences de marquage réalisées dans l'état micellaire. Dans ces conditions, la baisse significative du marquage observée pour les régions intermembranaires du transporteur telles que l'extrémité N-terminale (très accessible en solution), montre que l'eau deutérée diffuse lentement dans les membranes de la mitochondrie. Les différences de deutération, observées pour les régions ayant retenu suffisamment le marquage entre les deux complexes sont cependant en accord avec celles obtenues dans les expériences réalisées dans l'état micellaire. Ces résultats mettent en évidence que la conformation des régions concernées est proche de celle observée après purification et concentration des complexes en présence de détergent. Ces données sont donc en faveur de la présence d'un complexe bAnc1p-BA stable dans les micelles de Triton X-100.

#### 4. Etude des mutations pathogènes du transporteur d'ADP/ATP humain

Le 4<sup>ème</sup> volet de ma thèse a porté sur l'étude des mutations de l'isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP humain entraînant des pathologies. Le manque de modèles biologiques disponibles pour étudier ce gène limite l'analyse fonctionnelle de mutants. Notre approche s'est donc orientée tout d'abord vers la validation d'un nouveau modèle d'étude mettant en jeu l'expression hétérologue de l'unique isoforme du transporteur d'ADP/ATP de l'amibe *D. discoideum* dans la levure *S. cerevisiae*.

Contrairement aux résultats obtenus avec les gènes hANC1 ou bANC1 (Hashimoto *et al.*, 1999; Hatanaka *et al.*, 2001c ; De Marcos Lousa *et al.*, 2002), l'expression du gène DdANCA dans une souche de levure dépourvue de transporteur d'ADP/ATP endogène a permis de restaurer une croissance sur milieu non fermentescible identique à celle observée avec le gène sauvage ScANC2. Les transporteurs ScAnc2p et DdAncAp présentent des caractéristiques biochimiques comparables

(Tableau 4). Cependant, le transporteur DdAncAp est 3 fois moins abondant dans les mitochondries de levure que le transporteur endogène. Cette différence n'entraîne pas de retard de croissance sur un milieu riche lactate. Elle pourrait néanmoins avoir une conséquence négative dans d'autres conditions physiologiques dans le cas des mutants pathogènes, et donc représenter un point faible de notre modèle. Cependant, nos résultats confirment que le transporteur DdAncAp, qui présente 70 % d'identité de séquence avec le transporteur hAnc1p, est tout aussi efficace que le transporteur sauvage de levure rendant possible l'étude des mutations humaines pathogènes dans ce modèle.

L'étude des mutants DdANCA-A94D, DdANCA-A126D et DdANCA-V291M, mimant les trois mutations humaines (A90D, A123D et V289M), a ensuite été réalisée. L'expression des transporteurs mutés dans une souche de levure dépourvue de transporteur d'ADP/ATP n'a pas permis de restaurer une croissance sur milieu non fermentescible pour les deux premiers, suggérant pour ces mutants des problèmes dans l'import, dans le repliement ou dans le mécanisme de transport des nucléotides. La mutation A94D n'ayant pas été étudiée phénotypiquement jusqu'à maintenant, ces résultats présentent les premières données biochimiques disponibles sur cette mutation. Le résultat obtenu pour le mutant DdANCA-A126D est en accord avec les données de la littérature (Palmieri *et al.*, 2005). En effet, des protéoliposomes reconstitués avec des extraits mitochondriaux de patients présentant cette mutation ne montrent aucune activité de transport de l'ATP. De plus, l'analyse du mutant ScAnc2p-A137D (correspondant à la même mutation dans ScAnc2p) montre une perte complète de la fonction de transport (Palmieri *et al.*, 2005).

L'expression du troisième mutant DdANCA-V291M a mis en évidence une déficience du mécanisme intrinsèque de transport, qui pourrait expliquer le retard de croissance dans un milieu non fermentescible observé pour les levures exprimant ce transporteur. Ces résultats ne corroborent pas l'étude du mutant hANC1-V289M (exprimé dans une souche de levure dépourvue de transporteur endogène) qui a mis en évidence une absence de croissance sur un milieu non-fermentescible. En effet, il a été montré que le phénotype observé est lié à un problème d'import du mutant (De Marcos Lousa *et al.*, 2002). La souche de levure exprimant le gène hANC1 est caractérisée par un temps de génération compris entre 17 et 36 heures et une quantité de transporteur hAnc1p importé dans la mitochondrie égale à 174 pmoles d'unité de transport/mg de protéines totales, soit moitié moins que DdAncAp. Ainsi, l'arrêt de la croissance des levures liée à une absence totale d'import de la protéine hANC1-V289M n'est pas forcément à l'origine de la pathologie humaine. Elle peut résulter seulement d'une diminution de l'import de ce transporteur muté amplifiée par la quantité déjà limitée de transporteur natif (hAnc1p) importée dans la mitochondrie de levure (De Marcos Lousa *et al.*, 2002). En conclusion, les premiers résultats obtenus sur les mutants pathogènes du transporteur humain, *via* l'expression hétérologue du

transporteur DdAncAp dans *S. cerevisiae*, ont été confirmés par les données disponibles dans la littérature (mutation A126D) et ont permis d'appréhender l'étude d'une mutation difficilement caractérisable jusqu'à maintenant (mutation V289M).

# **DISCUSSION GENERALE**

## 1. Etude du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin par DXMS

Le travail réalisé au cours de mon doctorat a permis l'adaptation de la technique de DXMS à l'étude des protéines membranaires et sa première application à l'étude d'une protéine membranaire intégrale, le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin, bAnc1p en complexe avec deux inhibiteurs, le CATR et le BA. Cette étude a mis en évidence des mouvements moléculaires impliquant au moins la moitié N-terminale de la protéine et montrant une ouverture de la protéine vers l'espace matriciel, couplée à une fermeture nécessaire de la cavité du côté de l'espace intermembranaire dans le complexe bAnc1p-BA.

Une étude de cette protéine a été envisagée par échange H/D au sein des membranes mitochondrielles afin de s'affranchir de l'effet du détergent sur sa conformation lors des étapes d'extraction et de concentration. Les premiers résultats semblent conforter ceux obtenus dans l'état micellaire, mais la faible intensité de marquage induite par un trop fort contre-échange n'a pas permis l'obtention de données de qualité. Cette technique semble néanmoins représenter un outil extrêmement intéressant pour étudier les transporteurs mitochondriaux et de nombreuses expériences pourront être réalisées afin de comprendre le mécanisme de transport des Ancp. En effet, il est envisageable d'étudier, grâce à cette méthode, d'autres transporteurs d'ADP/ATP comme ScAnc2p et ainsi cribler l'état conformationnel de nombreux mutants présentant des défauts d'activité. Il serait aussi intéressant de continuer l'étude de bAnc1p au sein des membranes mitochondrielles, en complexe ou non avec des dérivés non-transportés de nucléotides. Ces études ont nécessité la mise au point d'une technique d'extraction du détergent sur phase solide à l'aide de solvants organiques, qui n'est pas spécifique de ces protéines ni de l'échange H/D. Elle pourra donc être adaptée à d'autres protéines et d'autres techniques en rapport avec la MS. Par exemple, il sera possible grâce à cette technique de s'affranchir des séparations protéiques par SDS-PAGE et des protéolyses en gel en réalisant directement la protéolyse en solution et en éliminant le détergent *via* notre méthode.

## 2. Etude des mutations de hAnc1p entraînant des pathologies humaines

L'étude des mutations du transporteur humain entraînant des pathologies a été menée à partir d'un nouveau modèle protéique et a permis de mettre en évidence un défaut dans l'activité intrinsèque de transport du mutant DdAncAp-V291M. L'étude des autres mutations de hAnc1p entraînant des pathologies, comme des myopathies et des adPEO, est en cours au laboratoire à travers d'une part l'étude des mutants DdAncp-A94D et -A126D, et d'autre part celle de deux autres mutations dont l'acide aminé mis en cause n'est pas strictement conservé chez le transporteur DdAncAp. Tout d'abord, l'étude des mutants DdAncp-A94D et -A126D sera abordée après croissance sur un milieu fermentescible des souches de levure transgéniques. Ensuite l'étude des autres mutations pathogènes s'effectuera en deux étapes. Premièrement, l'acide aminé impliqué présent chez hAnc1p avant mutation sera introduit dans DdAncAp, à la même place que l'acide aminé muté, pour former les mutants DdANCA-F102L et DdANCA-I117A. Ces deux mutants serviront de contrôle afin de vérifier que le remplacement d'un acide aminé dans le transporteur DdAncAp par son équivalent dans hAnc1p sauvage n'altère pas les propriétés intrinsèques de la protéine DdAncAp. Si les contrôles s'avèrent valides, l'étude des mutations L98P et A114P de hAnc1p pourra alors être abordée de la même manière que les précédentes.

A plus long terme, une stratégie similaire à celle employée pour étudier chez la levure des mutations ponctuelles du gène *ATP6*, codant la sous unité 6 de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, et pouvant être à l'origine de pathologies humaines, pourra être mise en œuvre. Elle reposera sur un criblage de molécules potentiellement actives qui permettraient de restaurer la croissance, sur un milieu non fermentescible, des levures exprimant dans leurs mitochondries un transporteur d'ADP/ATP peu ou pas fonctionnel.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aquila, H., Eiermann, W., Babel, W. et Klingenberg, M.** (1978). Isolation of the ADP/ATP translocator from beef heart mitochondria as the bongrekate-protein complex. *Eur J Biochem* **85**, 549-60.
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. et Klingenberg, M.** (1982). Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**, 345-9.
- Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. et Englander, S. W.** (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86.
- Bakker, H. D., Scholte, H. R., Van den Bogert, C., Ruitenbeek, W., Jeneson, J. A., Wanders, R. J., Abeling, N. G., Dorland, B., Sengers, R. C. et Van Gennip, A. H.** (1993). Deficiency of the adenine nucleotide translocator in muscle of a patient with myopathy and lactic acidosis: a new mitochondrial defect. *Pediatr Res* **33**, 412-7.
- Barnidge, D.R., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J. et Sunner, J.** (1999). Extraction method for analysis of detergent-solubilized bacteriorhodopsin and hydrophobic peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **269**, 1-9.
- Barrera, N.P., Isaacson, S.C., Zhou, M., Bavro, V.N., Welch, A., Schaedler, T.A., Seeger, M.A., Miguel, R.N., Korkhov, V.M., van Veen, H.W., Venter, H.; Walmsley, A.R., Tate, C.G. et Robinson, C.V.** (2009). Mass spectrometry of membrane transporters reveals subunit stoichiometry and interactions. *Nat Methods* **6**, 585-7.
- Bauer, M. K., Schubert, A., Rocks, O. et Grimm, S.** (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* **147**, 1493-502.
- Bell, F. P.** (1980). Inhibition of adenine nucleotide translocase by oleoylcarnitine, oleoylCoA and oleate in isolated arterial mitochondria. *Atherosclerosis* **37**, 21-32.
- Beyer, K. et Klingenberg, M.** (1985). ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **24**, 3821-6.
- Bisaccia, F., Zara, V., Capobianco, L., Iacobazzi, V., Mazzeo, M. et Palmieri, F.** (1996). The formation of a disulfide cross-link between the two subunits demonstrates the dimeric structure of the mitochondrial oxoglutarate carrier. *Biochim Biophys Acta* **1292**, 281-88.
- Block, M. R., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1981). Chemical modifications of atracyloside and bongrekic acid binding sites of the mitochondrial adenine nucleotide carrier. Are there distinct binding sites? *Biochemistry* **20**, 2692-9.
- Block, M. R., Zocca, G., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1982). Small angle neutron scattering of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in detergent. *Biochem Biophys Res Commun* **109**, 471-7.

- Block, M. R., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1983). Use of 3'-O-naphthoyladenosine 5'-diphosphate to probe distinct conformational states of membrane-bound adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate carrier. *Biochemistry* **22**, 2202-8.
- Block, M. R. et Vignais, P. V.** (1984). Substrate-site interactions in the membrane-bound adenine-nucleotide carrier as disclosed by ADP and ATP analogs. *Biochim Biophys Acta* **767**, 369-76.
- Block, M. R., Boulay, F., Brandolin, G., Dupont, Y., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1986). Fluorescent probes of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Methods Enzymol* **125**, 639-49.
- Block, M. R. et Vignais, P. V.** (1986). Dependence of the conformational state of the isolated adenine nucleotide carrier protein on the detergent used for solubilization. *Biochemistry* **25**, 374-9.
- Blonder, J., Goshe, M.B., Moore, R.J., Pasa-Tolic, L., Masselon, C.D., Lipton, M.S., Smith, R.D.** (2002) Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* **1**, 351-60.
- Bof, M., Brandolin, G., Satre, M. et Klein, G.** (1999). The mitochondrial adenine nucleotide translocator from Dictyostelium discoideum. Functional characterization and DNA sequencing. *Eur J Biochem* **259**, 795-800.
- Bogner, W., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1986). The transmembrane arrangement of the ADP/ATP carrier as elucidated by the lysine reagent pyridoxal 5-phosphate. *Eur J Biochem* **161**, 611-20.
- Boulay, F., Lauquin, G. J.-M., Tsugita, A. et Vignais, P. V.** (1983). Photolabeling approach to the study of the topography of the atractyloside binding site in mitochondrial adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate carrier protein. *Biochemistry* **22**, 477-84.
- Boulay, F. et Vignais, P. V.** (1984). Localization of the N-ethylmaleimide reactive cysteine in the beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Biochemistry* **23**, 4807-12.
- Boulay, F., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1986). Localization of immunoreactive regions in the beef heart adenine nucleotide carrier using rabbit antisera against the carboxyatractyloside-ligated and the sodium dodecyl sulfate denatured carrier forms. *Biochemistry* **25**, 7567-71.
- Brandolin, G., Doussiere, J., Gulik, A., Gulik-Krzywicki, T., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1980). Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* **592**, 592-614.
- Brandolin, G., Dupont, Y. et Vignais, P. V.** (1982). Exploration of the nucleotide binding sites of the isolated ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria. 2. Probing of the nucleotide sites by formycin triphosphate, a fluorescent transportable analogue of ATP. *Biochemistry* **21**, 6348-53.

**Brandolin, G., Dupont, Y. et Vignais, P. V.** (1985). Substrate-induced modifications of the intrinsic fluorescence of the isolated adenine nucleotide carrier protein: demonstration of distinct conformational states. *Biochemistry* **24**, 1991-7.

**Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P. et Vignais, P. V.** (1989). Orientation of the N-terminal region of the membrane-bound ADP/ATP carrier protein explored by antipeptide antibodies and an arginine-specific endoprotease. Evidence that the accessibility of the N-terminal residues depends on the conformational state of the carrier. *Biochemistry* **28**, 1093-100.

**Brandolin, G., Le Saux, A., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1993). Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* **25**, 459-72.

**Brinkworth, C. S. et Bourne, D. J.** (2007). The effect of Tween80 on signal intensity of intact proteins by MALDI time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **18**, 102-5.

**Burke, J.E., Karbarz, M.J., Deems, R.A., Li, S., Woods, V.L. Jr. et Dennis, E.A.** (2008) Interaction of group IA phospholipase A2 with metal ions and phospholipid vesicles probed with deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry* **47**, 6451-9.

**Chen, E.I., McClatchy, D., Park, S.K. et Yates, J.R. 3rd.** (2008) Comparisons of mass spectrometry compatible surfactants for global analysis of the mammalian brain proteome. *Anal Chem.* **80**, 8694-701.

**Chen, X. J.** (2002). Induction of an unregulated channel by mutations in adenine nucleotide translocase suggests an explanation for human ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet* **11**, 1835-43.

**Chen, Z., Koelsch, G., Han, H. P., Wang, X. J., Lin, X. L., Hartsuck, J. A. et Tang, J.** (1991). Recombinant rhizopuspepsinogen. Expression, purification, and activation properties of recombinant rhizopuspepsinogens. *J Biol Chem* **266**, 11718-25.

**Chevrollier, A., Loiseau, D., Chabi, B., Renier, G., Douay, O., Malthiery, Y. et Stepien, G.** (2005). ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 307-16.

**Chowdhury, S. K., Katta, V. et Chait, B. T.** (1990). Electrospray ionization mass spectrometric peptide mapping: a rapid, sensitive technique for protein structure analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **167**, 686-92.

**Cléménçon, B., Rey, M., Dianoux, A. C., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Brandolin, G. et Pelosi, L.** (2008). Structure-function relationships of the C-terminal end of the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier isoform 2. *J Biol Chem* **283**, 11218-25.

**Colombini, M.** (2009). The published 3D structure of the VDAC channel: native or not? *Trends Biochem Sci* **34**, 382-9.

**Cravello, L., Lascoux, D. et Forest, E.** (2003). Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 2387-93.

- Dahout-Gonzalez, C., Brandolin, G. et Pebay-Peyroula, E.** (2003). Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallog* **59**, 2353-5.
- Dahout-Gonzalez, C., Ramus, C., Dassa, E. P., Dianoux, A. C. et Brandolin, G.** (2005). Conformation-dependent swinging of the matrix loop m2 of the mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier. *Biochemistry* **44**, 16310-20.
- Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J. et Vignais, P. V.** (1988). Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]adenosine diphosphate. *Biochemistry* **27**, 5141-9.
- Dassa, E. P., Dahout-Gonzalez, C., Dianoux, A. C. et Brandolin, G.** (2005). Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome c fusion protein. *Protein Expr Purif* **40**, 358-69.
- Daum, G., Bohni, P. C. et Schatz, G.** (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 13028-33.
- De Marcos Lousa, C., Trézéguet, V., Dianoux, A. C., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.-M.** (2002). The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* **41**, 14412-20.
- De Marcos Lousa, C., Trézéguet, V., David, C., Postis, V., Arnou, B., Pebay-Peyroula, E., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.-M.** (2005). Valine 181 is critical for the nucleotide exchange activity of human mitochondrial ADP/ATP carriers in yeast. *Biochemistry* **44**, 4342-8.
- Demmers, J. A., Rijkers, D. T., Haverkamp, J., Killian, J. A. et Heck, A. J.** (2002). Factors affecting gas-phase deuterium scrambling in peptide ions and their implications for protein structure determination. *J Am Chem Soc* **124**, 11191-8.
- Deschauer, M., Hudson, G., Muller, T., Taylor, R. W., Chinnery, P. F. et Zierz, S.** (2005). A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* **15**, 311-5.
- Dianoux, A. C., Noel, F., Fiore, C., Trézéguet, V., Kieffer, S., Jaquinod, M., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2000). Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl-[beta-32P]ADP. Identification of the binding segments by mass spectrometry. *Biochemistry* **39**, 11477-87.
- Diezel, W., Kopperschlager, G. et Hofmann, E.** (1972). An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem* **48**, 617-20.
- Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D. et Palmieri, F.** (2005). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* **579**, 633-7.

- Drgon, T., Sabova, L., Nelson, N. et Kolarov, J.** (1991). ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **289**, 159-62.
- Duée, E. D. et Vignais, P. V.** (1965). Exchange between extra- and intramitochondrial adenine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* **107**, 184-8.
- Duszynski, J., Bogucka, K., Letko, G., Kuster, U., Kunz, W. et Wojtczak, L.** (1981). Relationship between the energy cost of ATP transport and ATP synthesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **637**, 217-23.
- Dyson, H. J. et Wright, P. E.** (2004). Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* **104**, 3607-22.
- Fiore, C., Trézéguit, V., Roux, P., Le Saux, A., Noel, F., Schwimmer, C., Arlot, D., Dianoux, A. C., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2000). Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: influence of the conformational states of the C-terminal region. *Protein Expr Purif* **19**, 57-65.
- Fiore, C., Arlot-Guilligay, D., Trezeguet, V., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2001). Fluorometric detection of ADP/ATP carrier deficiency in human muscle. *Clin Chim Acta* **311**, 125-35.
- Flentke, G. R., Glinski, J., Satyshur, K. et Rich, D. H.** (1999). Purification and crystallization of rhizopuspepsin: the use of nickel chelation chromatography to select for catalytically active species. *Protein Expr Purif* **16**, 213-20.
- Fontanesi, F., Palmieri, L., Scarcia, P., Lodi, T., Donnini, C., Limongelli, A., Tiranti, V., Zeviani, M., Ferrero, I. et Viola, A. M.** (2004). Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum Mol Genet* **13**, 923-34.
- Froschauer, E. M., Schweyen, R. J. et Wiesenberger, G.** (2009). The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 1044-50.
- Garcia, R. A., Pantazatos, D. et Villarreal, F. J.** (2004). Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for investigating protein-ligand interactions. *Assay Drug Dev Technol* **2**, 81-91.
- Gavurnikova, G., Sabova, L., Kissova, I., Haviernik, P. et Kolarov, J.** (1996). Transcription of the AAC1 gene encoding an isoform of mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by oxygen in a heme-independent manner. *Eur J Biochem* **239**, 759-63.
- Graham, B. H., Waymire, K. G., Cottrell, B., Trounce, I. A., MacGregor, G. R. et Wallace, D. C.** (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* **16**, 226-34.

**Hackenberg, H. et Klingenberg, M.** (1980). Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate--adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* **19**, 548-55.

**Haitina, T., Lindblom, J., Renstrom, T. et Fredriksson, R.** (2006). Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* **88**, 779-90.

**Hashimoto, M., Shinohara, Y., Majima, E., Hatanaka, T., Yamazaki, N. et Terada, H.** (1999). Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers. *Biochim Biophys Acta* **1409**, 113-24.

**Hatanaka, T., Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2001a). Significant effect of the N-terminal region of the mitochondrial ADP/ATP carrier on its efficient expression in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 28881-8.

**Hatanaka, T., Kihira, Y., Shinohara, Y., Majima, E. et Terada, H.** (2001b). Characterization of loops of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier facing the cytosol by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 936-42.

**Hatanaka, T., Takemoto, Y., Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2001c). Significant expression of functional human type 1 mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria. *Biol Pharm Bull* **24**, 595-9.

**Henderson, P. J. et Lardy, H. A.** (1970). Bongrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. *J Biol Chem* **245**, 1319-26.

**Hoerner, J. K., Xiao, H., Dobo, A. et Kaltashov, I. A.** (2004). Is there hydrogen scrambling in the gas phase? Energetic and structural determinants of proton mobility within protein ions. *J Am Chem Soc* **126**, 7709-17.

**Holloway, P. W.** (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem* **53**, 304-8.

**Hsu, Y.H., Burke, J.E., Li, S., Woods, V.L. Jr. et Dennis, E.A.** (2009) Localizing the membrane binding region of Group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 using peptide amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem* **284**, 23652-61

**Iwahashi, A., Kihira, Y., Majima, E., Terada, H., Yamazaki, N., Kataoka, M. et Shinohara, Y.** (2006). The structure of the second cytosolic loop of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier AAC2 is dependent on the conformational state. *Mitochondrion* **6**, 245-51.

**Iwahashi, A., Ishii, A., Yamazaki, N., Hashimoto, M., Ohkura, K., Kataoka, M., Majima, E., Terada, H. et Shinohara, Y.** (2008). Functionally important conserved length of C-terminal regions of yeast and bovine ADP/ATP carriers, identified by deletion mutants studies, and water accessibility of the amino acids at the C-terminal region of the yeast carrier. *Mitochondrion* **8**, 196-204.

- Joh, N.H., Min, A., Faham, S., Whitelegge, J.P., Yang, D., Woods, V.L. et Bowie, J.U.** (2008). Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins. *Nature* **453**, 1266-70.
- Jorgensen, T. J., Gardsvoll, H., Ploug, M. et Roepstorff, P.** (2005). Intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides upon collisional activation. *J Am Chem Soc* **127**, 2785-93.
- Katta, V. et Chait, B. T.** (1991). Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **5**, 214-7.
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keranen, S., Peltonen, L. et Suomalainen, A.** (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* **289**, 782-5.
- Kihira, Y., Iwahashi, A., Majima, E., Terada, H. et Shinohara, Y.** (2004). Twisting of the second transmembrane alpha-helix of the mitochondrial ADP/ATP carrier during the transition between two carrier conformational states. *Biochemistry* **43**, 15204-9.
- Kihira, Y., Majima, E., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2005). Cysteine labeling studies detect conformational changes in region 106-132 of the mitochondrial ADP/ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **44**, 184-92.
- Klingenberg, M. et Pfaff, E.** (1968). Metabolic control in mitochondria by adenine nucleotide translocation. *Biochem Soc Symp* **27**, 105-22.
- Klingenberg, M.** (1980). The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol* **56**, 97-105.
- Klingenberg, M., Mayer, I. et Appel, M.** (1985). Interaction of fluorescent 3'-[1,5-(dimethylamino)naphthoyl]adenine nucleotides with the solubilized ADP/ATP carrier. *Biochemistry* **24**, 3650-9.
- Klingenberg, M.** (2008). The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1978-2021.
- Kolarov, J., Kolarova, N. et Nelson, N.** (1990). A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J Biol Chem* **265**, 12711-6.
- Komaki, H., Fukazawa, T., Houzen, H., Yoshida, K., Nonaka, I. et Goto, Y.** (2002). A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions. *Ann Neurol* **51**, 645-8.
- Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E. et Kaplan, R. S.** (1999). Oligomeric state of wild-type and cysteine-less yeast mitochondrial citrate transport proteins. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 543-9.

- Krämer, R. et Klingenberg, M.** (1980). Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry* **19**, 556-60.
- Kunji, E. R.** (2004). The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett* **564**, 239-44.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LaNoue, K., Mizani, S. M. et Klingenberg, M.** (1978). Electrical imbalance of adenine nucleotide transport across the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **253**, 191-8.
- Lauquin, G. J.-M., Lunardi, J. et Vignais, P. V.** (1976a). Effect of genetic and physiological manipulations on the kinetic and binding parameters of the adenine nucleotide translocator in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Biochimie* **58**, 1213-20.
- Lauquin, G. J.-M., Duplaa, A. M., Klein, G., Rousseau, A. et Vignais, P. V.** (1976b). Isobongrekic acid, a new inhibitor of mitochondrial ADP-ATP transport: radioactive labeling and chemical and biological properties. *Biochemistry* **15**, 2323-7.
- Lawson, J. E. et Douglas, M. G.** (1988). Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J Biol Chem* **263**, 14812-8.
- le Coutre, J., Whitelegge, J. P., Gross, A., Turk, E., Wright, E. M., Kaback, H. R. et Faull, K. F.** (2000). Proteomics on full-length membrane proteins using mass spectrometry. *Biochemistry* **39**, 4237-42.
- Le Saux, A., Roux, P., Trezeguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Vignais, P. V., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.-M.** (1996). Conformational changes of the yeast mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier studied through its intrinsic fluorescence. 1. Tryptophanyl residues of the carrier can be mutated without impairing protein activity. *Biochemistry* **35**, 16116-24.
- Lodi, T., Bove, C., Fontanesi, F., Viola, A. M. et Ferrero, I.** (2006). Mutation D104G in ANT1 gene: complementation study in *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 810-5.
- Lowther, W. T., Majer, P. et Dunn, B. M.** (1995). Engineering the substrate specificity of rhizopuspepsin: the role of Asp 77 of fungal aspartic proteinases in facilitating the cleavage of oligopeptide substrates with lysine in P1. *Protein Sci* **4**, 689-702.
- MacLeod, J. K., Lewis, I. A., Moeller, P. D. et Oelrichs, P. B.** (1990). The toxic extractives from Wedelia asperrima, III. Structures of two naturally occurring rhamnosyl analogues of wedeloside. *J Nat Prod* **53**, 1256-61.
- Majima, E., Koike, H., Hong, Y. M., Shinohara, Y. et Terada, H.** (1993). Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide. *J Biol Chem* **268**, 22181-7.

- Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y. M. et Terada, H.** (1994). Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulphydryl reagent eosin-5-maleimide. *Biochemistry* **33**, 9530-6.
- Majima, E., Takeda, M., Miki, S., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2002). Close location of the first loop to the third loop of the mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from cross-linking catalyzed by copper-o-phenanthroline of the solubilized carrier with Triton X-100. *J Biochem* **131**, 461-8.
- Man, P., Montagner, C., Vernier, G., Dublet, B., Chenal, A., Forest, E. et Forge, V.** (2007). Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry. *J Mol Biol* **368**, 464-72.
- Mannella, C. A.** (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 542-8.
- Marty, I., Brandolin, G., Gagnon, J., Brasseur, R. et Vignais, P. V.** (1992). Topography of the membrane-bound ADP/ATP carrier assessed by enzymatic proteolysis. *Biochemistry* **31**, 4058-65.
- Mayer, I., Dahms, A. S., Riezler, W. et Klingenberg, M.** (1984). Interaction of fluorescent adenine nucleotide derivatives with the ADP/ATP carrier in mitochondria. 1. Comparison of various 3'-O-ester adenine nucleotide derivatives. *Biochemistry* **23**, 2436-42.
- Mayinger, P., Winkler, E. et Klingenberg, M.** (1989). The ADP/ATP carrier from yeast (AAC-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett* **244**, 421-6.
- Mullis, K., Falloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.,** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**, 263-73.
- Napoli, L., Bordoni, A., Zeviani, M., Hadjigeorgiou, G. M., Sciacco, M., Tiranti, V., Terentiou, A., Moggio, M., Papadimitriou, A., Scarlato, G. et Comi, G. P.** (2001). A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family. *Neurology* **57**, 2295-8.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Brandolin, G. et Pebay-Peyroula, E.** (2005). Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett* **579**, 6031-6.
- Nury, H., Manon, F., Arnou, B., le Maire, M., Pebay-Peyroula, E. et Ebel, C.** (2008). Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also forms multimeric species. *Biochemistry* **47**, 12319-31.
- Palmieri, F.** (1994). Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* **346**, 48-54.

- Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., Ferrero, I. et Zeviani, M.** (2005). Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* **14**, 3079-88.
- Pan, J., Han, J., Borchers, C. et Konermann, L.** (2008). Electron Capture Dissociation of Electrosprayed Protein Ions for Spatially Resolved Hydrogen Exchange Measurements. *J Am Chem Soc*, **130**, 11574–5.
- Pan J., Han J., Borchers C. et Konermann L.** (2009) Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Top-Down Electron Capture Dissociation for Characterizing Structural Transitions of a 17 kDa Protein. *J Am Chem Soc*, **131** (35), 12801–12808.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J. et Brandolin, G.** (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractylamide. *Nature* **426**, 39-44.
- Pfaff, E., Klingenberg, M. et Heldt, H. W.** (1965). Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **104**, 312-5.
- Pfanner, N. et Geissler, A.** (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 339-49.
- Rey, M., Man, P., Brandolin, G., Forest, E. et Pelosi, L.** (2009). Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 3431-8.
- Riccio, P., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1975). Purification of the carboxy-tractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett* **56**, 133-8.
- Sabova, L., Zeman, I., Supek, F. et Kolarov, J.** (1993). Transcriptional control of AAC3 gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor. *Eur J Biochem* **213**, 547-53.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. et Futai, M.** (1999). Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation. *Science* **286**, 1722-4.
- Schroers, A., Burkowski, A., Wohlrab, H. et Kramer, R.** (1998). The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J Biol Chem* **273**, 14269-76.
- Siciliano, G., Tessa, A., Petrini, S., Mancuso, M., Bruno, C., Grieco, G. S., Malandrini, A., DeFlorio, L., Martini, B., Federico, A., Nappi, G., Santorelli, F. M. et Murri, L.** (2003). Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscul Disord* **13**, 162-5.
- Sikorski, R.S. et Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **122**(1):19-27

- Smith, A.L.** (1967). Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small-scale. *Methods Enzymol* **10**, 81-86.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. et Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Stanislas, E. et Vignais, P.** (1964). On the Principal Toxins of Atractylis Gummifera L. *C R Hebd Seances Acad Sci* **259**, 4872-5.
- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A. B., Hodge, J. A. et Wallace, D. C.** (1992). Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* **267**, 14592-7.
- Stewart, M. J. et Steenkamp, V.** (2000). The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* **22**, 641-9.
- Studier, F. W. et Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Trézéguet, V., Pelosi, L., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2008). The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 435-43.
- Trimpin, S. et Brizzard, B.** (2009). Analysis of insoluble proteins. *Biotechniques* **46**, 409-19.
- Vignais, P. V. et Vignais, P. M.** (1972). Effect of SH reagents on atractyloside binding to mitochondria and ADP translocation. Potentiation by ADP and its prevention by uncoupler FCCP. *FEBS Lett* **26**, 27-31.
- Vignais, P. V., Vignais, P. M. et Defaye, G.** (1973). Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin). *Biochemistry* **12**, 1508-19.
- Vignais, P. V., Vignais, P. M. et Doussiere, J.** (1975). Functional relationship between the ADP/ATP-carrier and the F1-ATPase in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **376**, 219-30.
- Vignais, P. V.** (1976). The mitochondrial adenine nucleotide translocator. *J Bioenerg* **8**, 9-17.
- Vissers, J.P., Hulst, W.P., Chervet, J.P., Snijders, H.M. et Cramers, C.A.** (1996) Automated on-line ionic detergent removal from minute protein/peptide samples prior to liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl.* **686**, 119-28
- Wales, T. E. et Engen, J. R.** (2006). Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom Rev* **25**, 158-70.

- Walker, J. E. et Runswick, M. J.** (1993). The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenerg Biomembr* **25**, 435-46.
- Wang, Y. et Tajkhorshid, E.** (2008). Electrostatic funneling of substrate in mitochondrial inner membrane carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9598-603.
- Whitelegge, J. P., le Coutre, J., Lee, J. C., Engel, C. K., Prive, G. G., Faull, K. F. et Kaback, H. R.** (1999). Toward the bilayer proteome, electrospray ionization-mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10695-8.
- Yang, H. et Smith, D. L.** (1997). Kinetics of cytochrome c folding examined by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry* **36**, 14992-9.
- Yu, Y.Q., Gilar, M., Lee, P.J., Bouvier, E.S. et Gebler, J.C.** (2003) Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal Chem.* **75**, 6023-8
- Yu, Y. Q., Gilar, M. et Gebler, J. C.** (2004). A complete peptide mapping of membrane proteins: a novel surfactant aiding the enzymatic digestion of bacteriorhodopsin. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 711-5.
- Zhang, Z. et Smith, D. L.** (1993). Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci* **2**, 522-31.