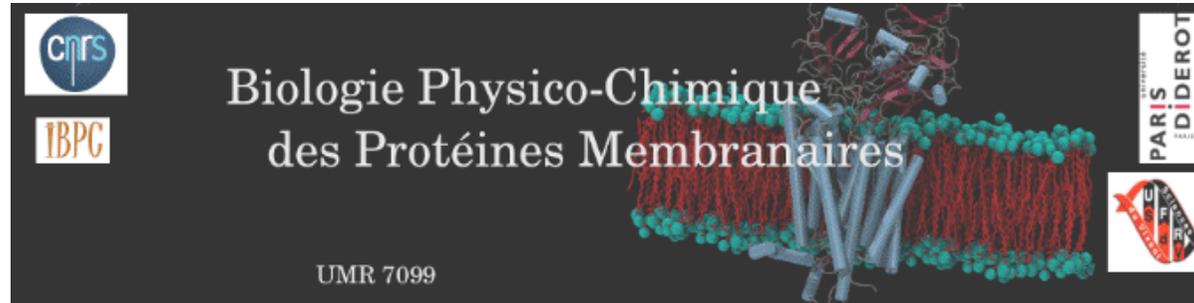


**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT – PARIS 7
U.F.R. DE PHYSIQUE**

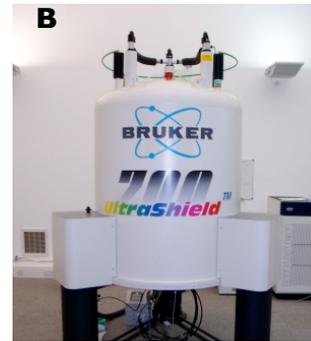
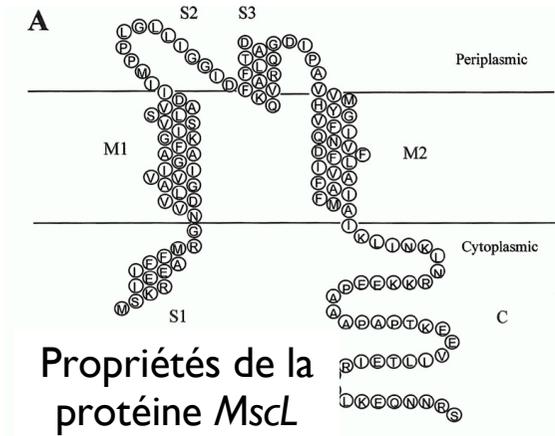
École doctorale : Interdisciplinaire pour le vivant (I-ViV) - ED 387



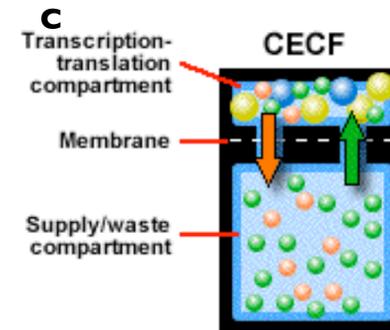
Développement et applications de protocoles de synthèse *in vitro* du canal mécanosensible bactérien à large conductance, pour son étude structurale par résonance magnétique nucléaire en phase solide

Alaa ABDINE

Sous la direction de :
Dr. Dror WARSCHAWSKI

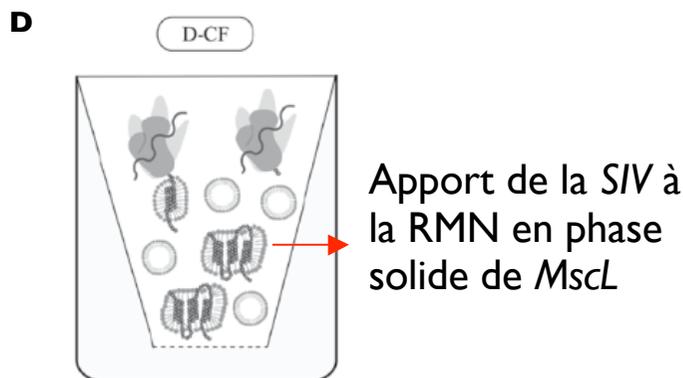


Résonance magnétique nucléaire en phase solide

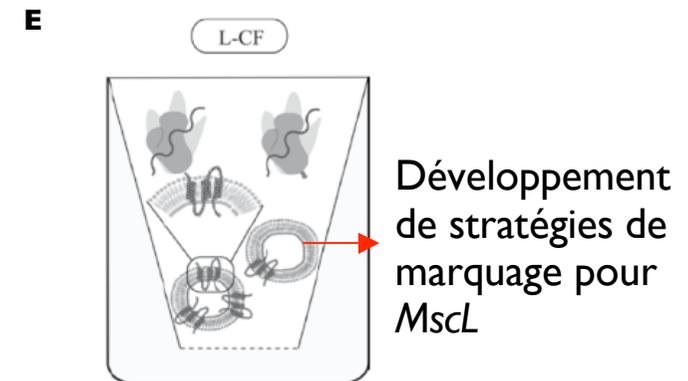


Synthèse *in vitro*

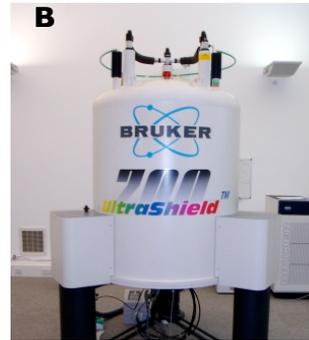
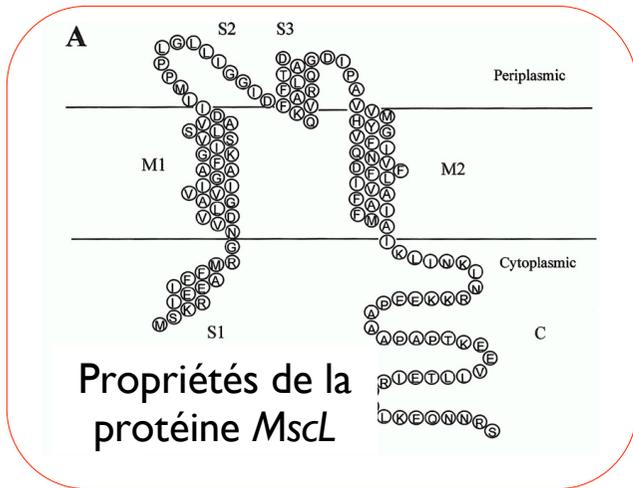
Développement et applications de protocoles de synthèse *in vitro* du canal mécanosensible bactérien à large conductance, pour son étude structurale par résonance magnétique nucléaire en phase solide



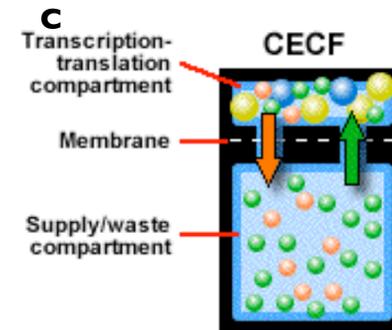
SIV en micelles de détergent



SIV en liposomes

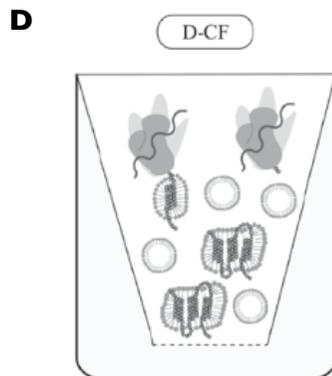


Résonance magnétique nucléaire en phase solide

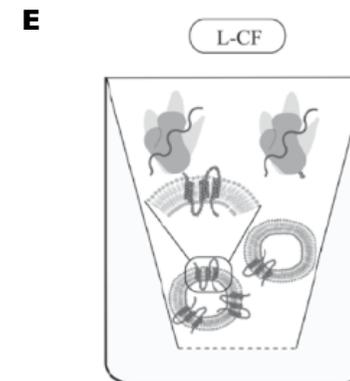


Synthèse *in vitro*

Le canal mécanosensible bactérien MscL



SIV en micelles de détergent



SIV en liposomes

Membrane cellulaire

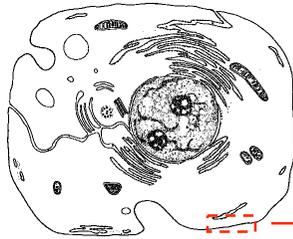


Schéma d'une cellule animale
Taille 10-100 μm

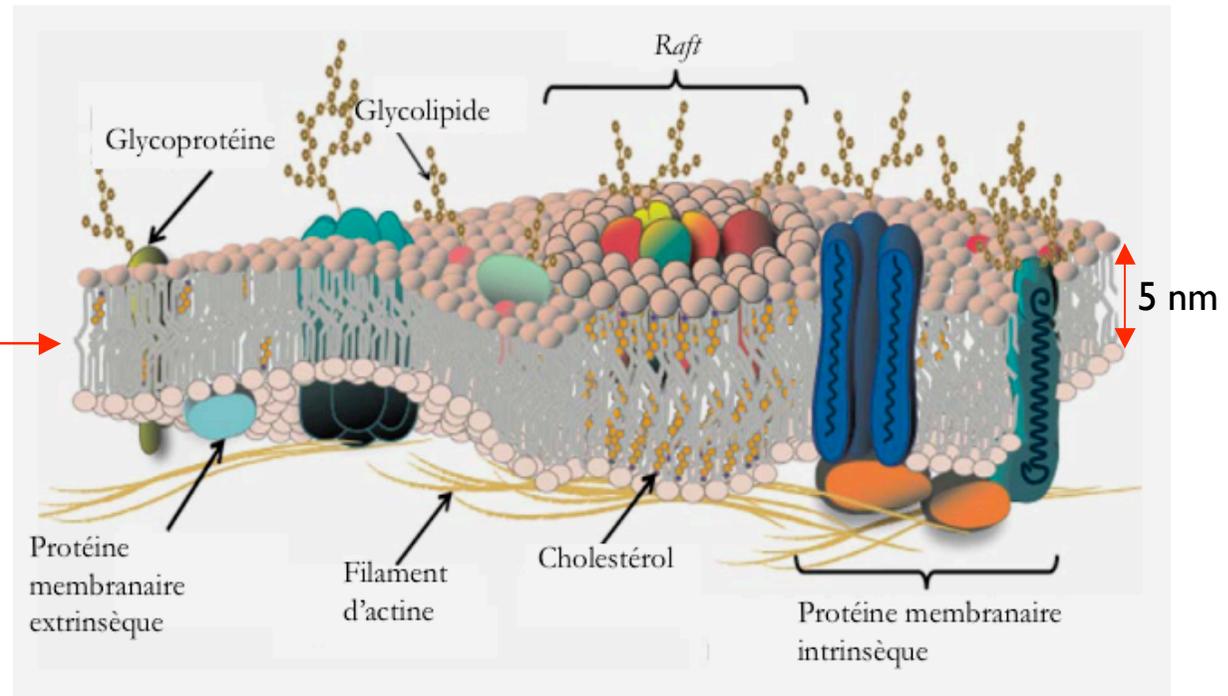


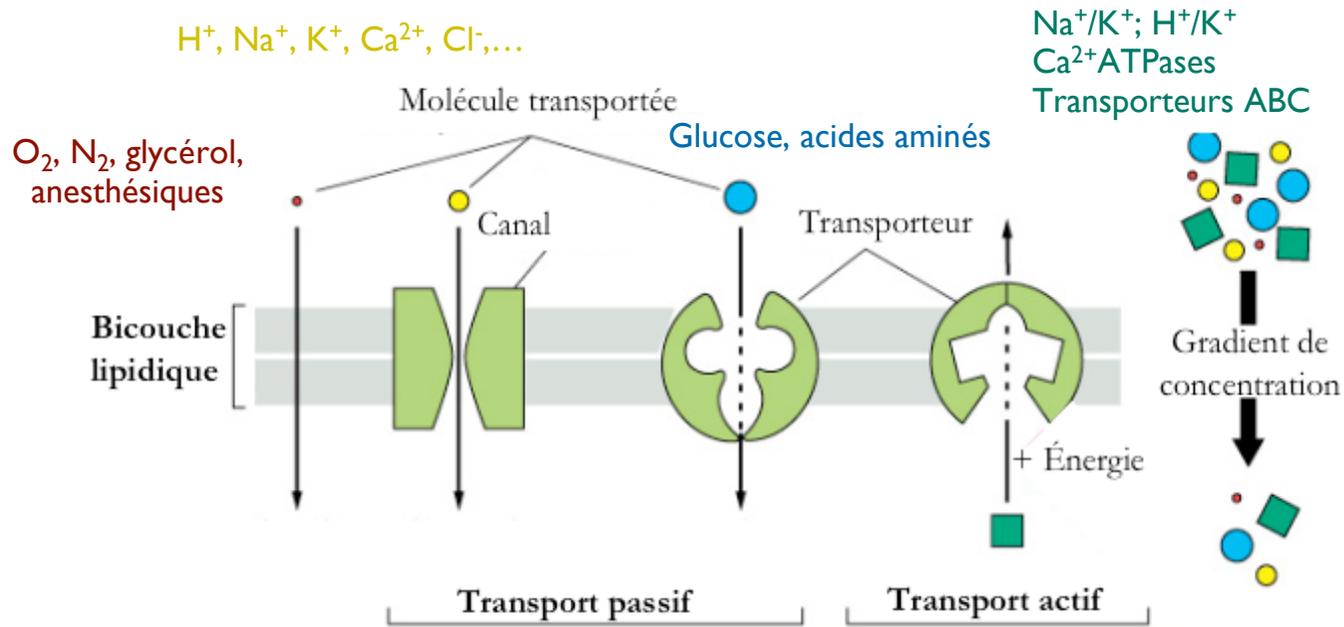
Schéma d'une membrane plasmique¹

Cellule : élément constitutif de tout être vivant

Membrane : bicouche lipidique - glucides - protéines membranaires ...

Rôle : barrière sélective - perméabilité

Membrane cellulaire



Modes de transport à travers la membrane

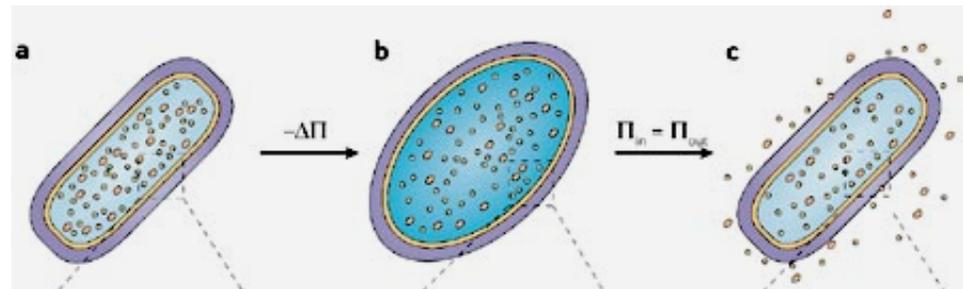
Diffusion des petites molécules hydrophobes

Transport passif selon le gradient de concentration

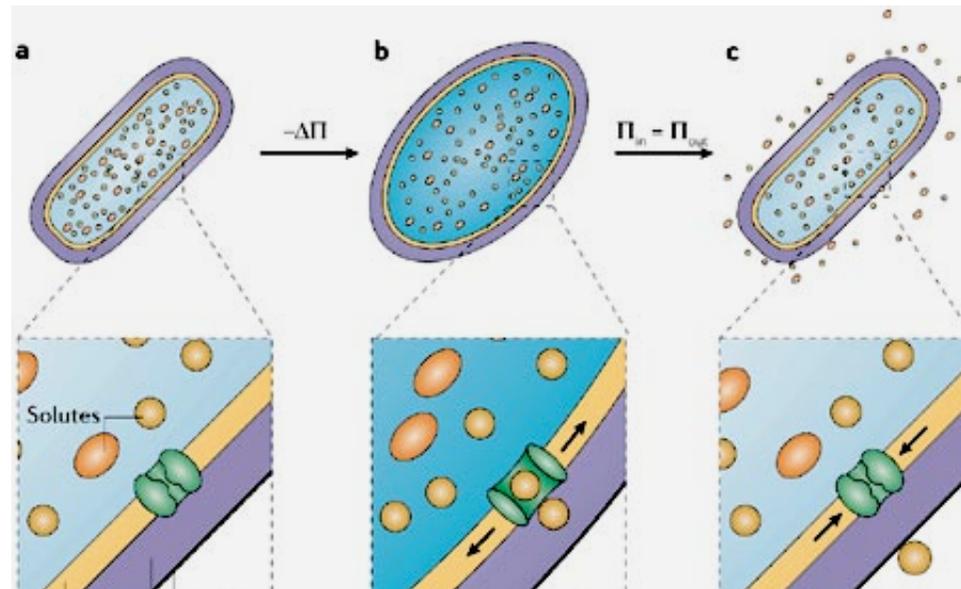
Transport actif contre le gradient

Diffusion de l'eau

Diffusion de l'eau dans la bactérie



Diffusion de l'eau dans la bactérie



Rôle des canaux mécanosensibles dans la prévention de la lyse de la bactérie *E. coli*²

Identification d'une activité mécanosensible dans des sphéroplases d'*E. coli*³

Activation lors d'un choc hypoosmotique

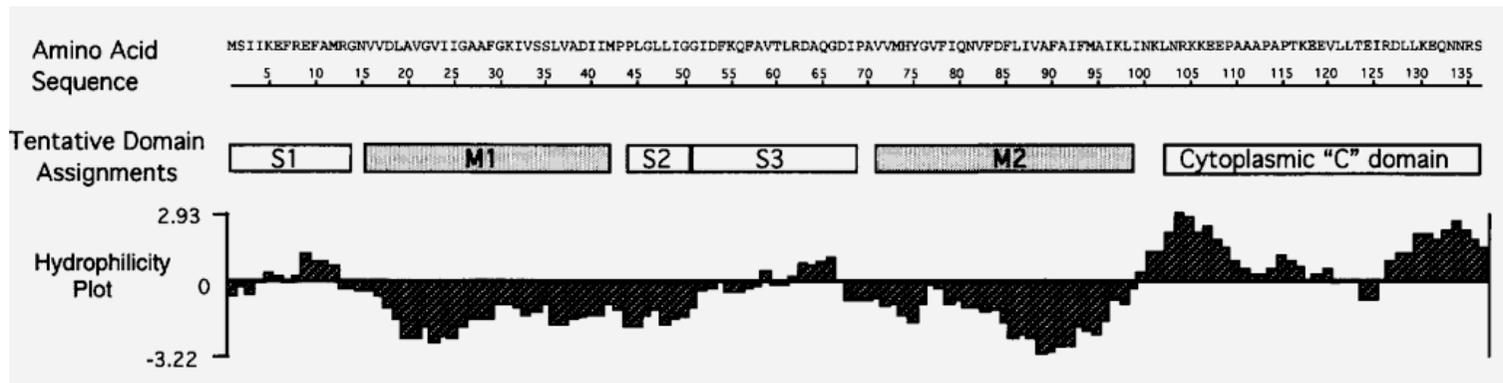
> Nécessité d'une évacuation de l'eau pour prévenir la lyse de la bactérie

Mécanosensibilité : mécanisme présent chez les eucaryotes (*TREK-1*, *TRAAK*,...)

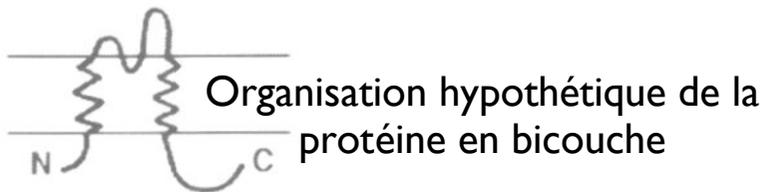
2 - Hamill & Martinac, 2001

3 - Martinac *et al.*, 1987

Canal mécanosensible à large conductance



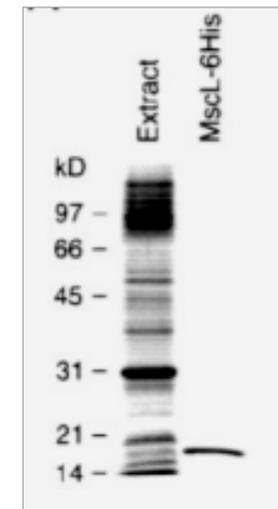
Séquence primaire de la protéine *MscL* d'*E. coli* et profil d'hydrophilie



136 acides aminés - 15 *kDa* - homomère

Résidus N- et C- terminaux cytoplasmiques

Diamètre du pore ouvert 40 Å



Profil de migration sur gel SDS-PAGE de la protéine identifiée *MscL*

MscL de *Mycobacterium tuberculosis*

Structure de la protéine issue de *M. tuberculosis*^{5,6}

Mt-MscL

Ec-MscL

151 acides aminés

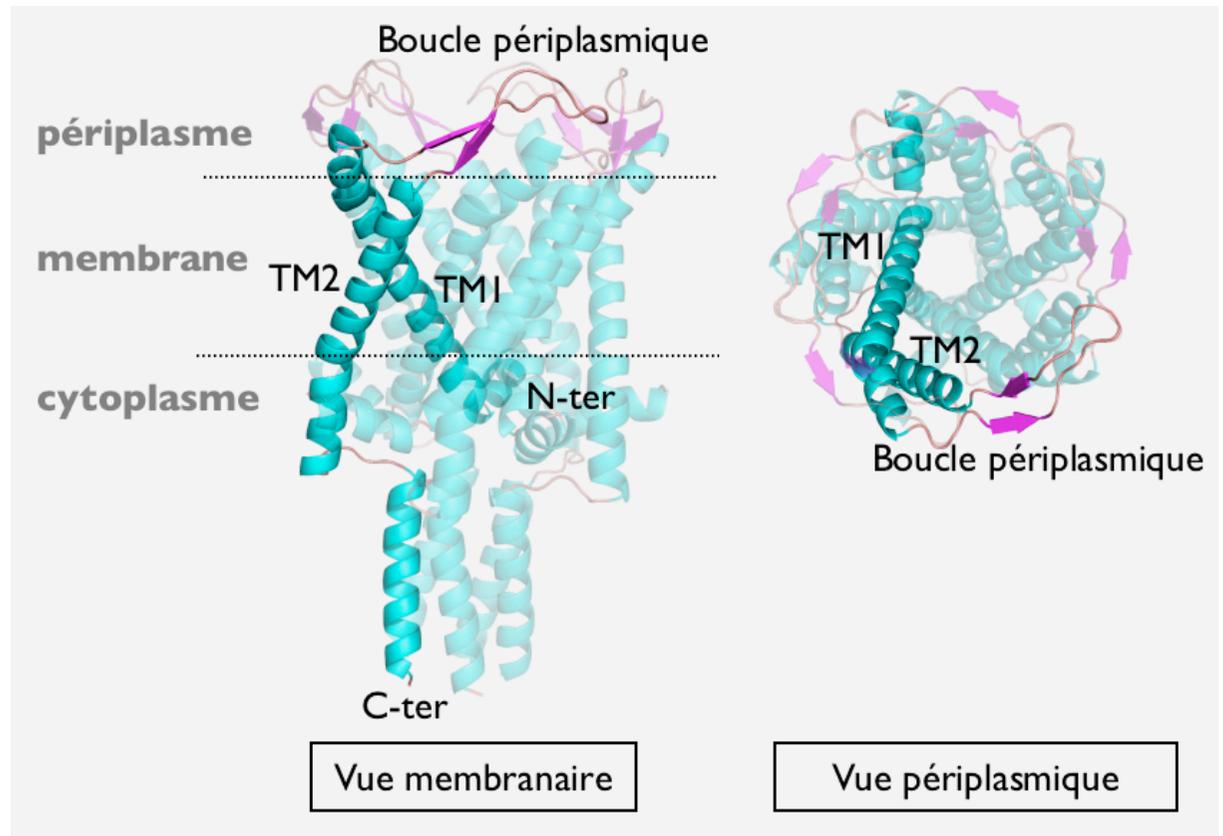
136 acides aminés

Pentamère

?

Seuil d'activation élevé

37% d'identité



Vue membranaire

Vue périplasmique

Résolution 3,5 Å

0,05% $C_{12}M$, pH 3,6

Diamètre du pore < 2 Å

Canal fermé ou inactivé

26 résidus C-ter non résolus

5 - Chang *et al.*, 1998; code PDB: 1msl

6 - Steinbacher *et al.*, 2007; code PDB: 2oar

Mécanismes d'ouverture hypothétiques

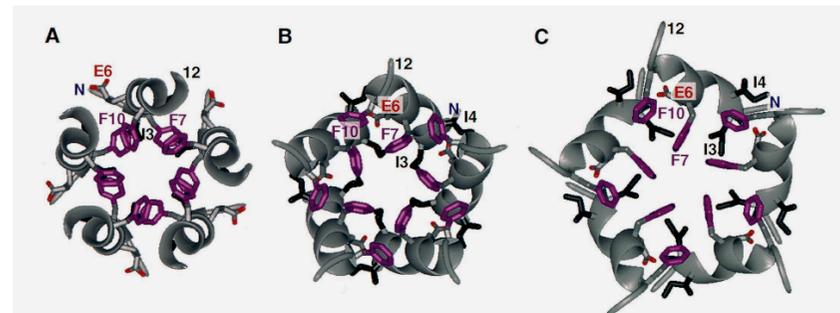
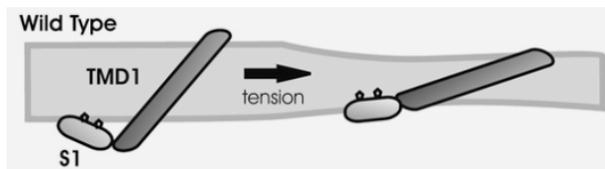
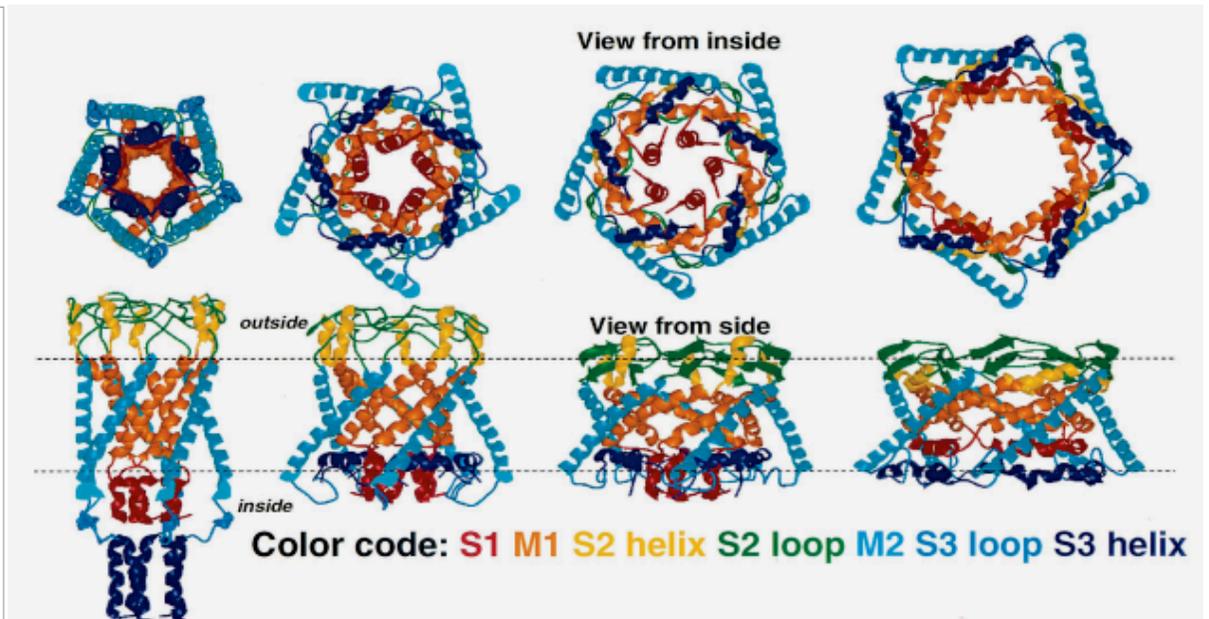
Conformations intermédiaires

Inclinaison des hélices

Site de constriction

Barrière cytoplasmique (N-ter)

Génétique moléculaire,
électrophysiologie et
modélisation moléculaire

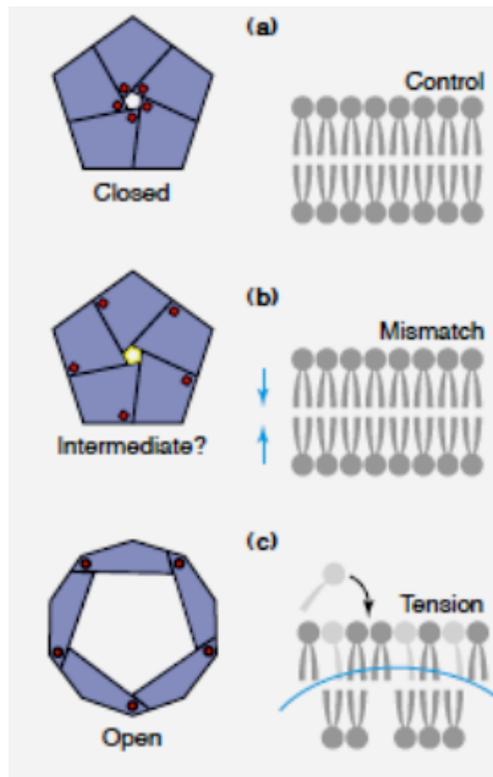


Barrière cytoplasmique **I3 - F7** et **F10**

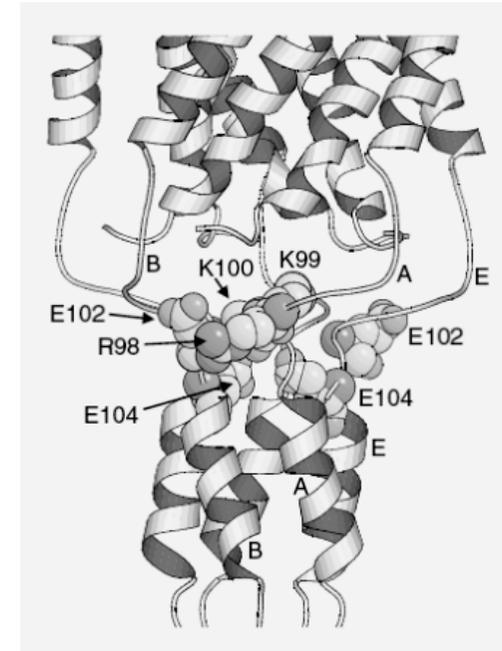
7 - Sukharev *et al.*, 2001

8 - Iscla *et al.*, 2008

Mécanismes d'ouverture hypothétiques



Différentes conformations de la protéine en fonction de l'environnement lipidique^{9,10}



Structure de la partie cytoplasmique de *Mt-MscL*¹². Cluster *RKKxE* = senseur de pH¹¹

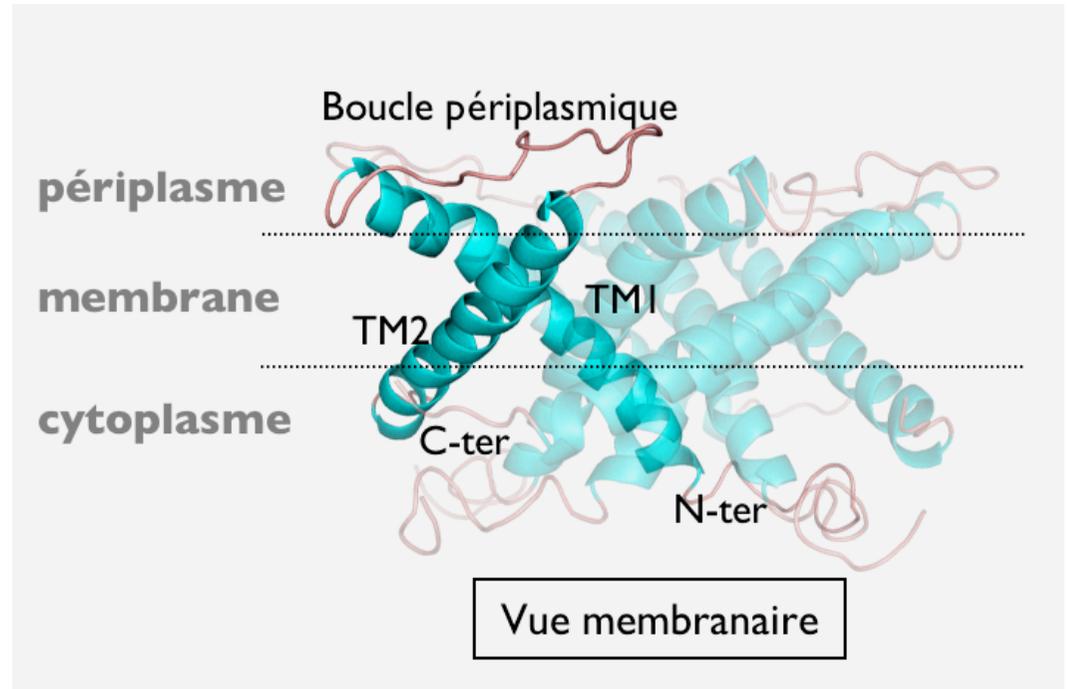
Ouverture fortement dépendante de l'environnement lipidique
--> Mésappariement hydrophobe (hélices transmembranaires)
--> Ancres hydrophobes (N-terminal)
--> Interactions électrostatiques (Résidus chargés - têtes polaires)

MscL de *Staphylococcus aureus*

Structure de *Sa-MscL* $\Delta 26_{C\text{-ter}}$ ¹³

<u><i>Mt-MscL</i></u>	<u><i>Ec-MscL</i></u>	<u><i>Sa-MscL</i></u>
151 acides aminés	136 acides aminés	120 acides aminés
Pentamère	?	Tétramère
Seuil d'activation élevé		

34% d'identité

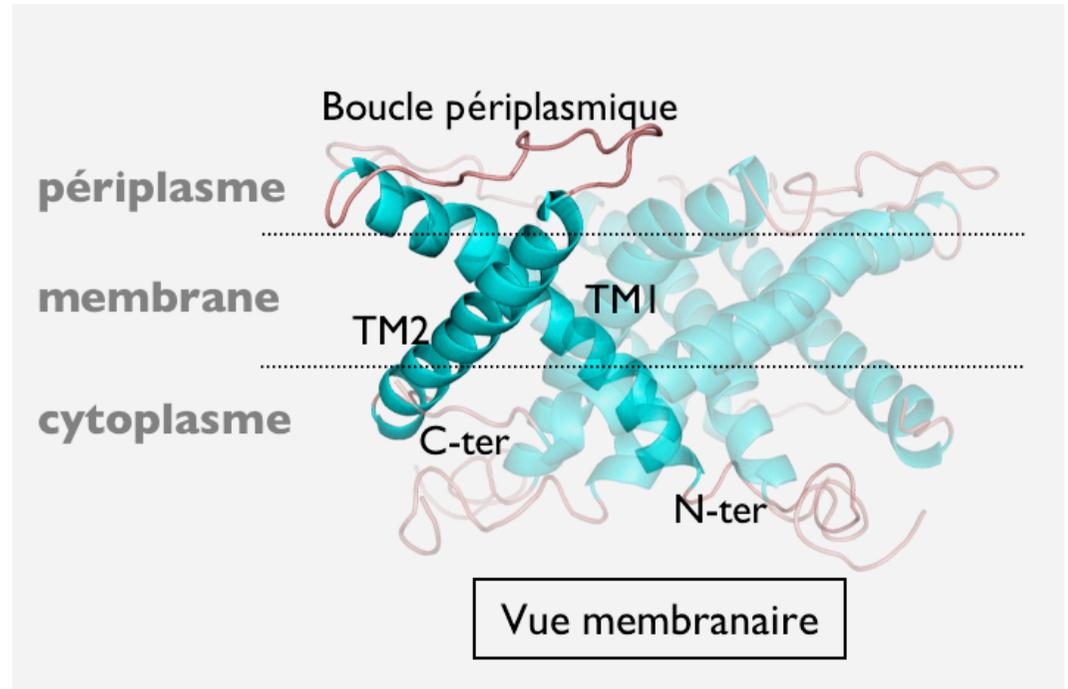


Résolution 3,8 Å
 4,3 mM C_{12} -DAO pH 7,0
 5 mutants pour le phasage
 Diamètre du pore 6-8 Å
 État intermédiaire
 26 résidus C-ter clivés

13 - Liu et al., 2009; code PDB: 3hzq
 14 - Dorwart et al., 2011

MscL de *Staphylococcus aureus*

Structure de Sa-MscL $\Delta 26_{C\text{-ter}}^{13}$



Mt-MscL

Ec-MscL

Sa-MscL

151 acides aminés

136 acides aminés

120 acides aminés

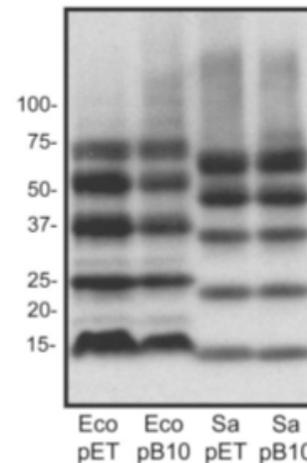
Pentamère

?

Tétramère

Seuil d'activation élevé

34% d'identité



Cross-linking (en conditions natives) et profil de migration sur gel SDS-PAGE des protéines *Ec-MscL* et *Sa-MscL*¹⁴.

13 - Liu *et al.*, 2009; code PDB: 3hzq

14 - Dorwart *et al.*, 2011

Interactions *MscL* - lipides

Activation de *MscL* : tension membranaire

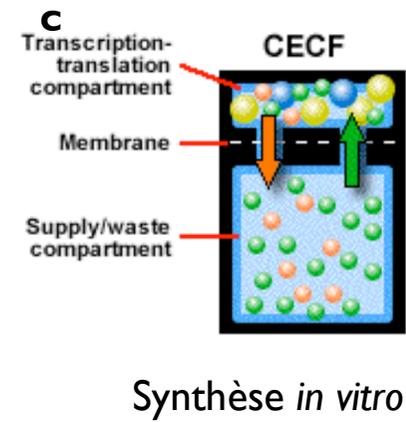
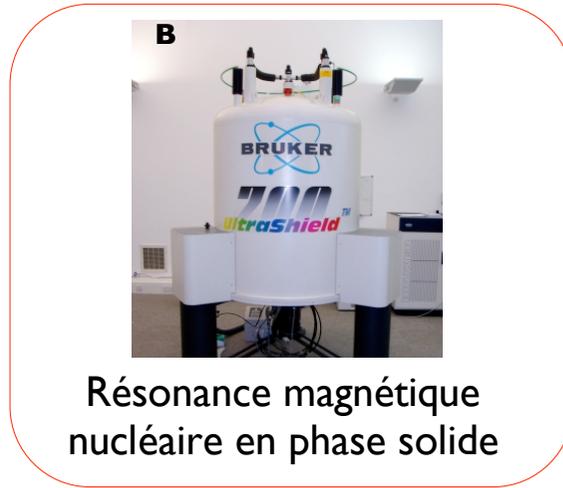
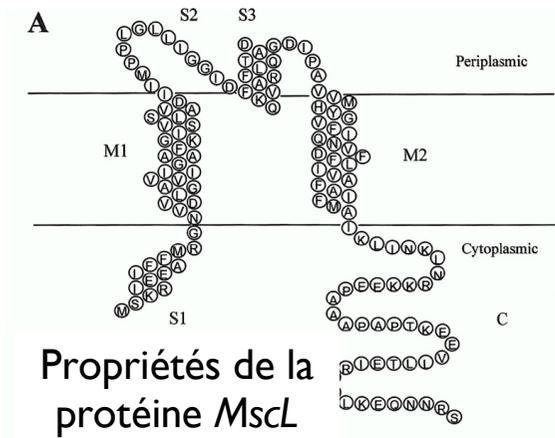
MscL inactive en détergent

Différentes conformations en fonction de l'environnement lipidique

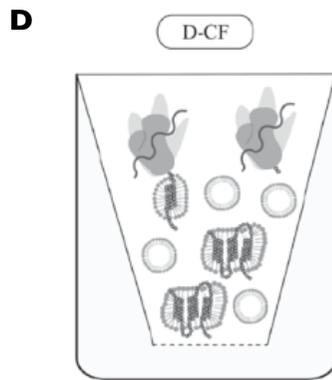
ex. *MscL* active en liposomes de *DOPC*⁹



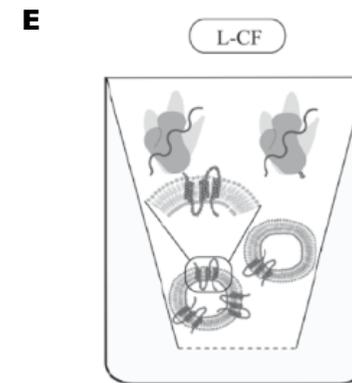
Étude structurale de *MscL in situ* par
résonance magnétique nucléaire en phase solide



Étude structurale de MscL *in situ* par résonance magnétique nucléaire en phase solide



SIV en micelles de détergent



SIV en liposomes

Détermination structurale de protéines membranaires

Protéines membranaires : 25% du génome, 60-70% des cibles thérapeutiques
<2% des structures de la PDB

Cristallographie	RMN en solution	RMN des solides	Microscopie électronique
------------------	-----------------	-----------------	--------------------------

Détermination structurale de protéines membranaires

Protéines membranaires : 25% du génome, 60-70% des cibles thérapeutiques
<2% des structures de la PDB

	Cristallographie	RMN en solution	RMN des solides	Microscopie électronique
Structures	237	38	11	7
Avantages	Taille Résolution	Dynamique Résolution	Dynamique Résolution Bicouche lipidique	Bicouche lipidique Taille
Limites	Cristallisation 3D Phasage Détergent	Limite 30 kDa Concentration Marquage	Concentration Marquage	Cristallisation 2D Basse résolution

Banques de données
<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/listAll/list>
<http://www.drorlist.com/nmr/MPNMR.html>

Résonance magnétique nucléaire

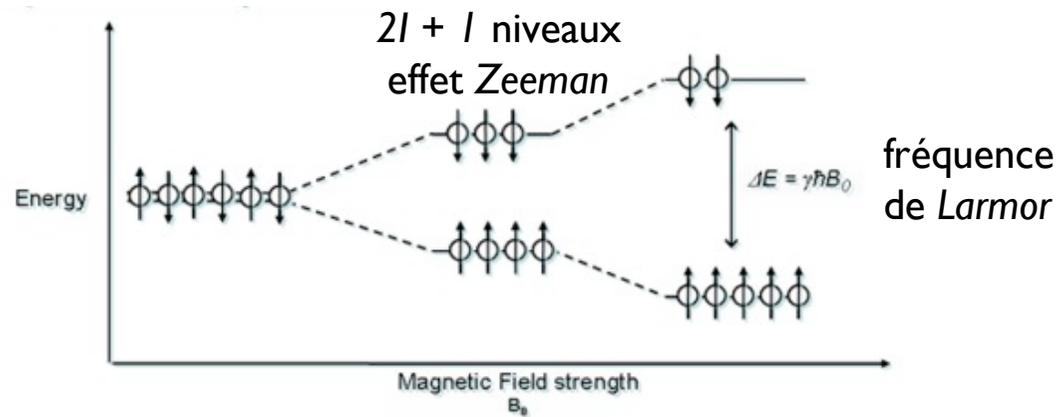
Présentation sommaire

Spin I non nul 1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , et ^{31}P ($I = 1/2$) \Rightarrow moment magnétique

Résonance magnétique nucléaire

Présentation sommaire

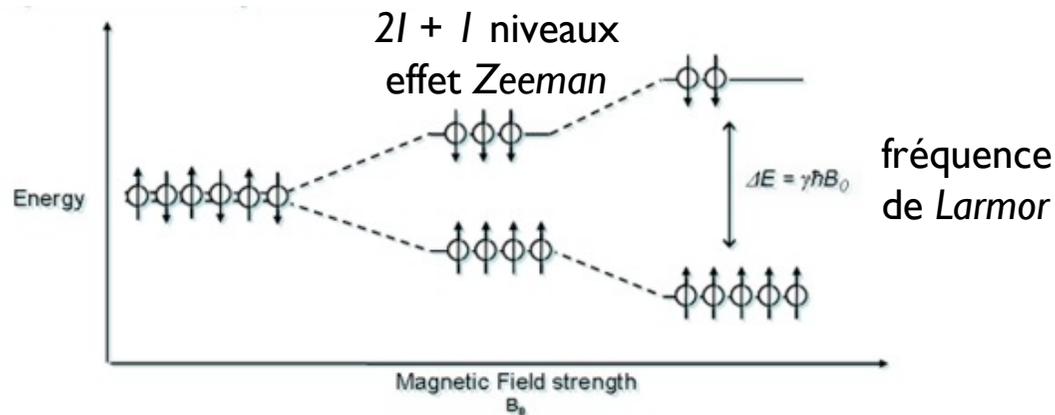
Spin I non nul ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , et ^{31}P ($I = 1/2$) \Rightarrow moment magnétique



Résonance magnétique nucléaire

Présentation sommaire

Spin I non nul ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , et ^{31}P ($I = 1/2$) \Rightarrow moment magnétique



Retour à l'équilibre influencé par :

- Interaction *Zeeman* avec le champ B_0 \longrightarrow - Levée de dégénérescence
- Écrantage électronique \longrightarrow - Déplacement chimique
- Couplages J / spin-spin \longrightarrow - Interactions entre 2 noyaux liés
- Interactions dipolaires \longrightarrow - Interactions 2 spins proches
- Interactions quadripolaires si $I > 1/2$ \longrightarrow - Nulle pour les spins $1/2$

Résonance magnétique nucléaire

Présentation sommaire

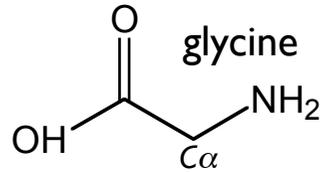
RMN des solutions

Solution isotrope

- Interaction *Zeeman* avec le champ B_0
- Écrantage électronique
- Couplages J / spin-spin
- Interactions dipolaires
- Interactions quadripolaires si $I > 1/2$

Résonance magnétique nucléaire

Présentation sommaire

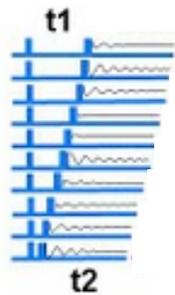
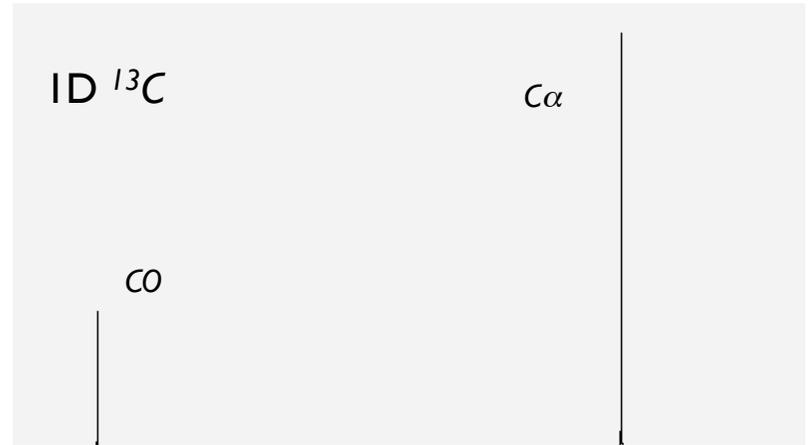


RMN des solutions

RMN à une dimension

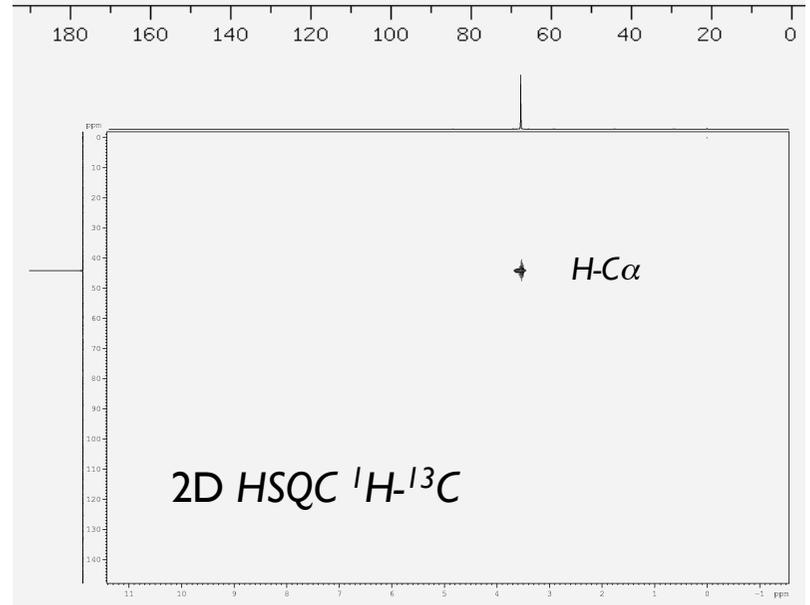


Transformée de Fourier



TF t_2

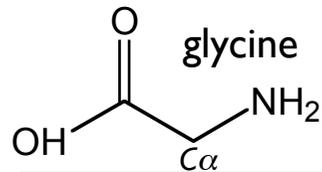
TF t_1



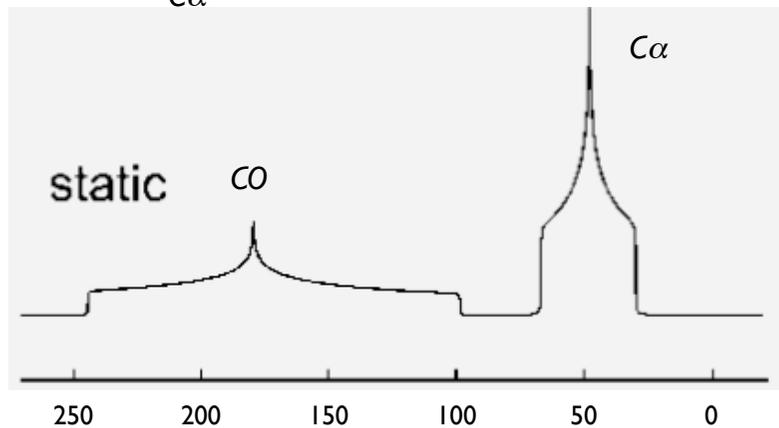
- Interaction *Zeeman* avec le champ B_0
- Écrantage électronique
- Couplages J / spin-spin
- Interactions dipolaires
- Interactions quadripolaires si $I > 1/2$

Résonance magnétique nucléaire en phase solide

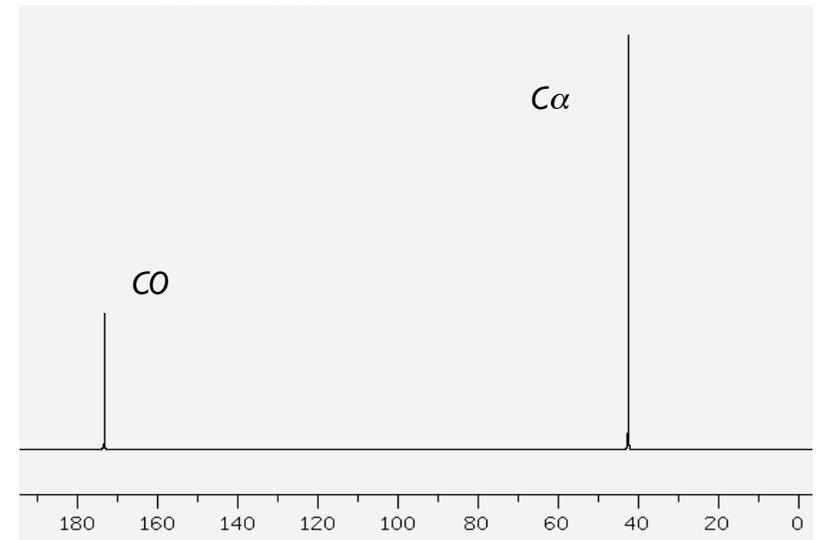
Présentation sommaire



Solide



Solution



- Interaction Zeeman avec le champ B_0
- Ecrantage électronique $\propto (3\cos^2\theta - 1)$
- Couplages J / spin-spin
- Interaction dipolaires $\propto (3\cos^2\theta - 1)$
- Interaction quadrupolaires si $I > 1/2$

Rotation à l'angle magique (MAS) θ : pour mimer les mouvements en liquide^{15,16}

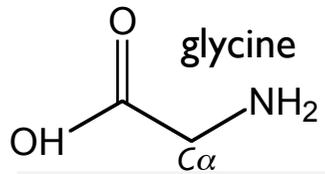
Découplage dipolaire : élimine les interactions scalaires et dipolaires¹⁷

15 - Andrew et al., 1959 ; 16 - Lowe, 1959

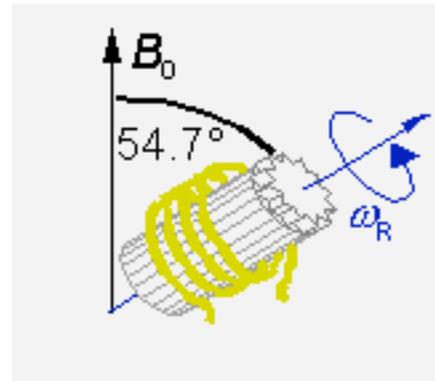
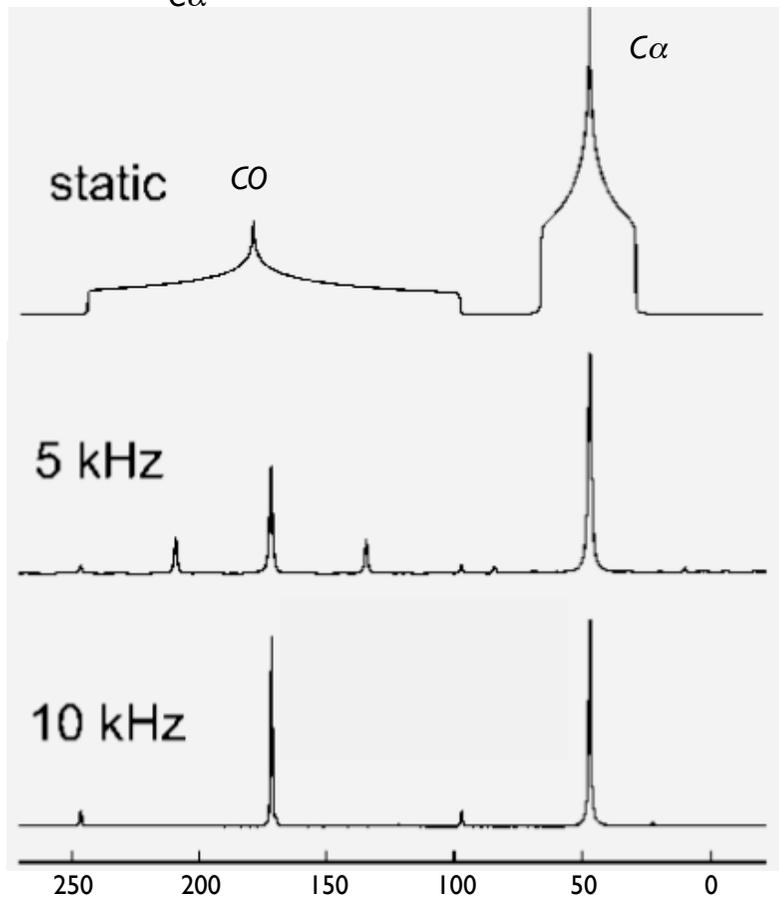
17 - Bloch, 1958

Résonance magnétique nucléaire en phase solide

Présentation sommaire



Solide



Rotation à l'angle magique

Résonance magnétique nucléaire en phase solide

Présentation sommaire

Les autres termes utilisés :

Polarisation croisée :

- pour augmenter la sensibilité de noyaux tels le ^{13}C (x4), le ^{15}N (x10)
- réduire le temps d'acquisition¹⁸

Recouplage :

- réintroduire de manière contrôlée des informations anisotropes¹⁹



Spectromètre RMN 700 MHz (16,4 Tesla)

Sonde CP-MAS 4mm ^1H , ^{13}C , ^{15}N

Rotor 4 mm (volume 50 μL)

18 - Pines *et al.*, 1972

19 - Griffin, 1998

Étude structurale de *Ec-MscL in situ*

Résonance magnétique nucléaire en phase solide

- Surexpression (~mg de protéine)
- Marquage aux isotopes ^{13}C & ^{15}N
- Production d'un échantillon pur et fonctionnel

Étude structurale de *Ec-MscL* in situ

Résonance magnétique nucléaire en phase solide

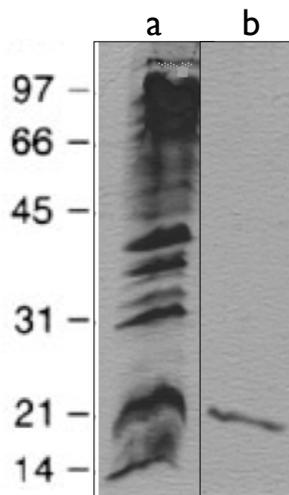
- Surexpression (~mg de protéine)
- Marquage aux isotopes ^{13}C & ^{15}N
- Production d'un échantillon pur et fonctionnel

RMN @ ICSN, Gif-sur-Yvette

BL21 (DE3)

^{13}C -glucose & ^{15}N H_4Cl

Patch clamp @ IBBM, Orsay



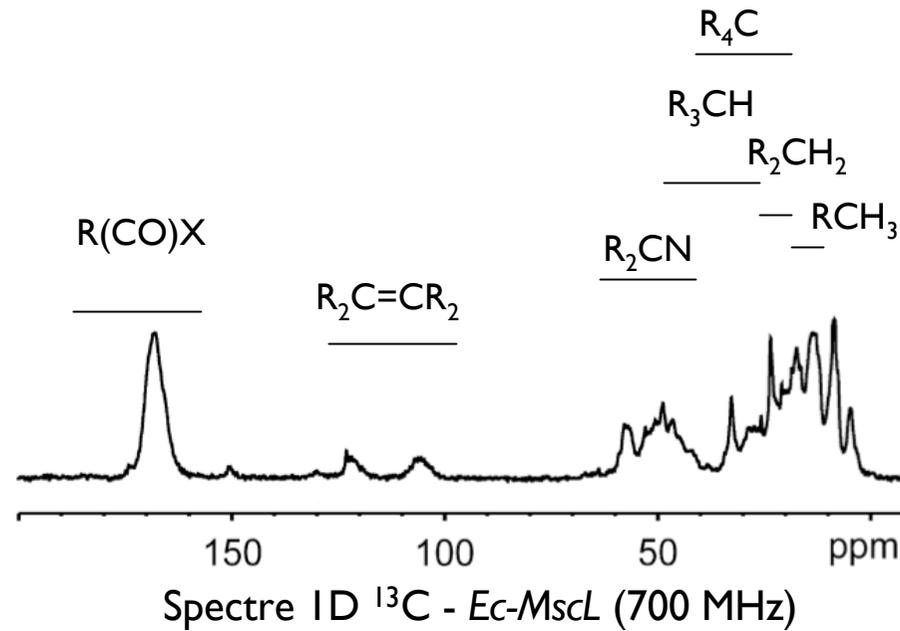
Gel SDS-PAGE :
Coloration au bleu
de Coomassie. (a)
extraits bactériens ;
(b) protéine purifiée

Marquage uniforme de la protéine

Purification par affinité (*His-tag*) 1 mg/ Litre de culture

Reconstitution en liposomes de *DOPC*

Surexpression et marquage uniforme de *Ec-MscL*



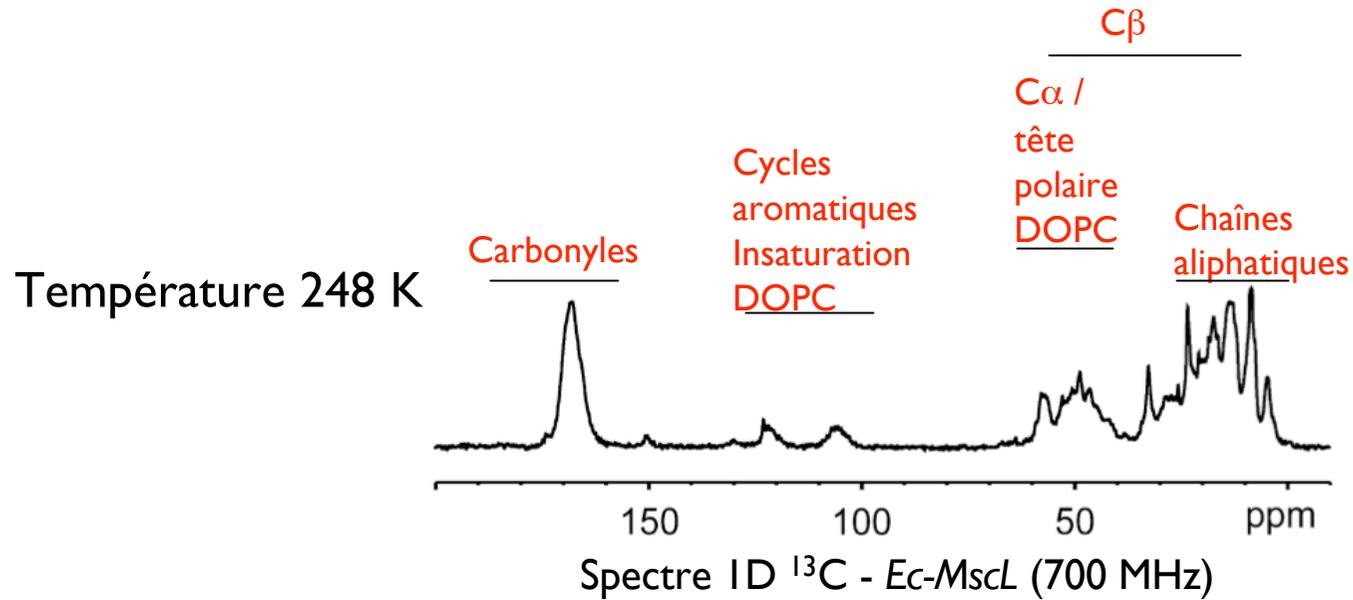
Marquage uniforme de la protéine

Purification par affinité (*His-tag*) 1 mg/ Litre de culture

Reconstitution en liposomes de *DOPC*

Composition de l'échantillon RMN : 18 mg H_2O - 6 mg lipides - 3 mg *MscL*

Surexpression et marquage uniforme de *Ec-MscL*



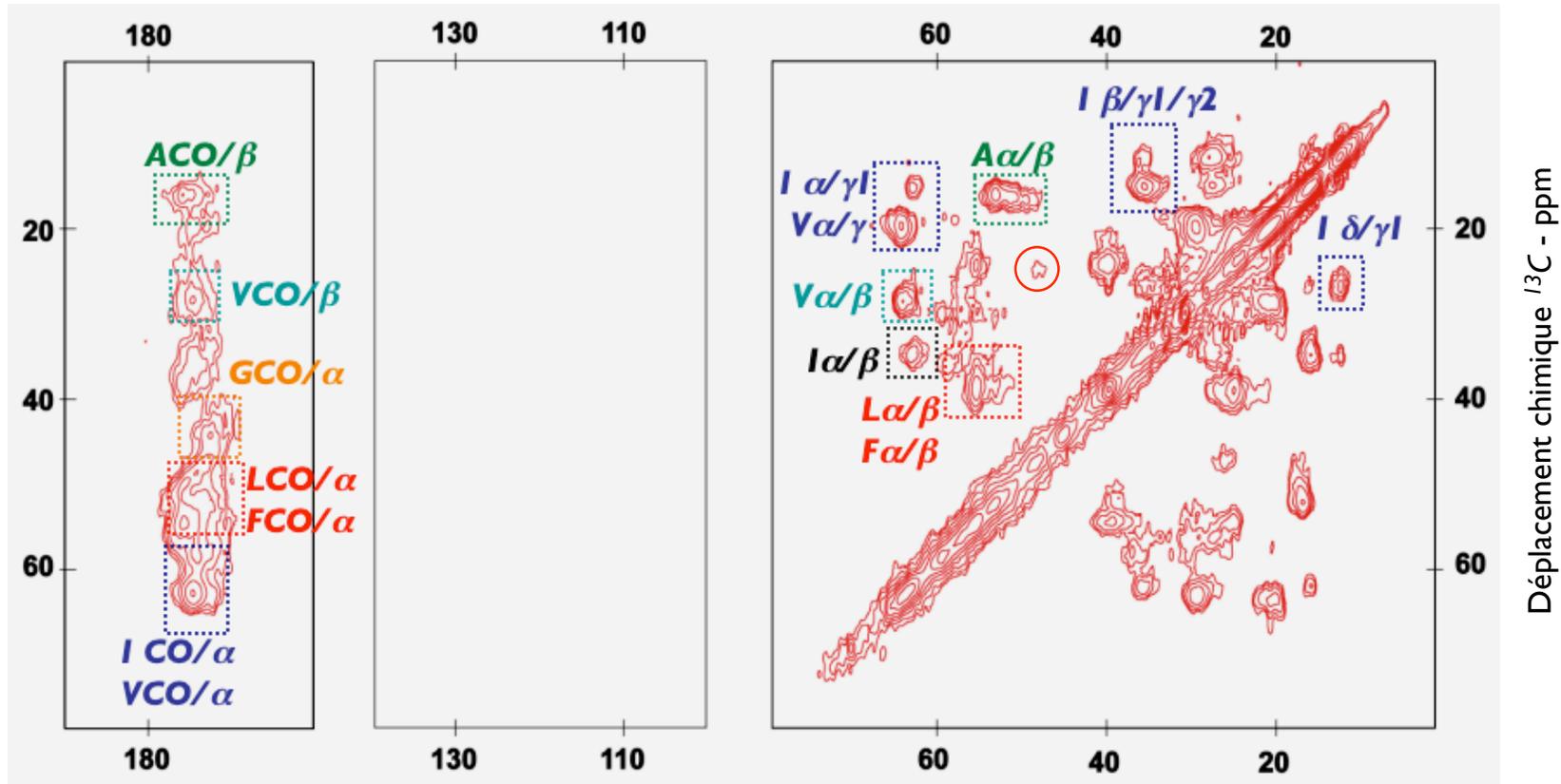
Marquage uniforme de la protéine

Purification par affinité (*His-tag*) 1 mg/ Litre de culture

Reconstitution en liposomes de *DOPC*

Composition de l'échantillon RMN : 18 mg H_2O - 6 mg lipides - 3 mg *MscL*

Échantillon uniformément marqué



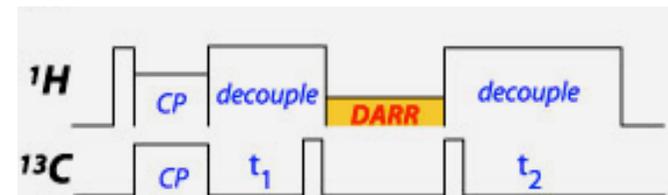
Déplacement chimique ^{13}C - ppm

2D- ^{13}C - ^{13}C DARR

Temps d'acquisition 14 h

Température 248 K

Temps de mélange 10 ms



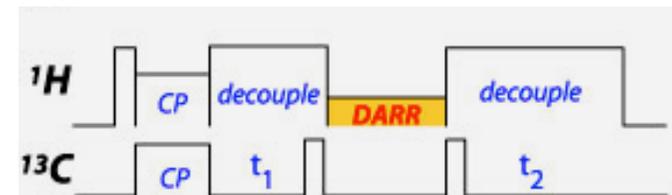
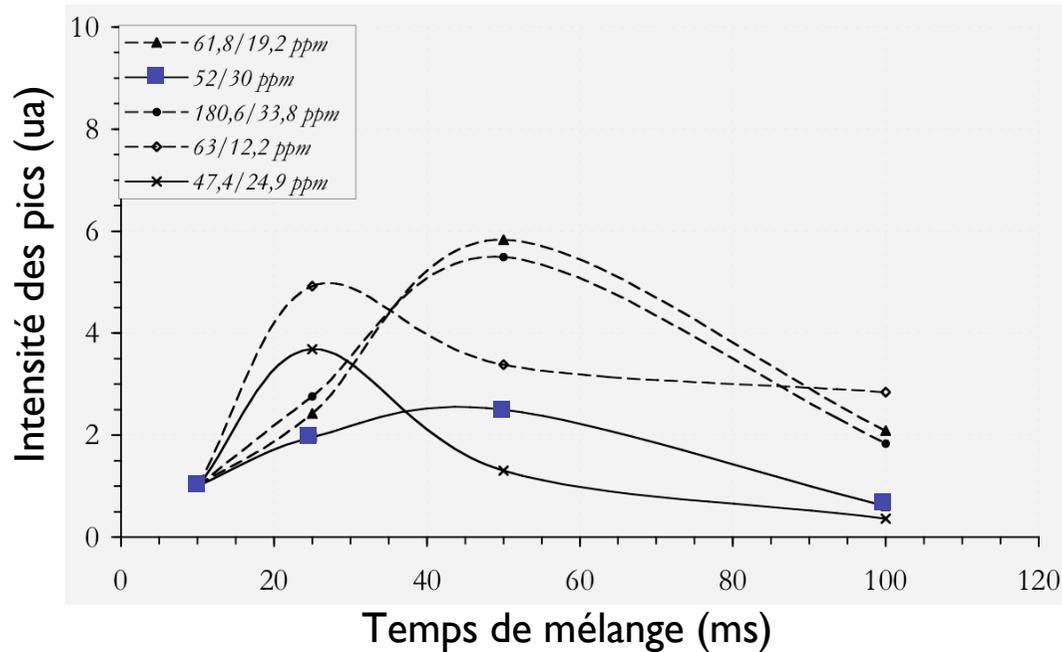
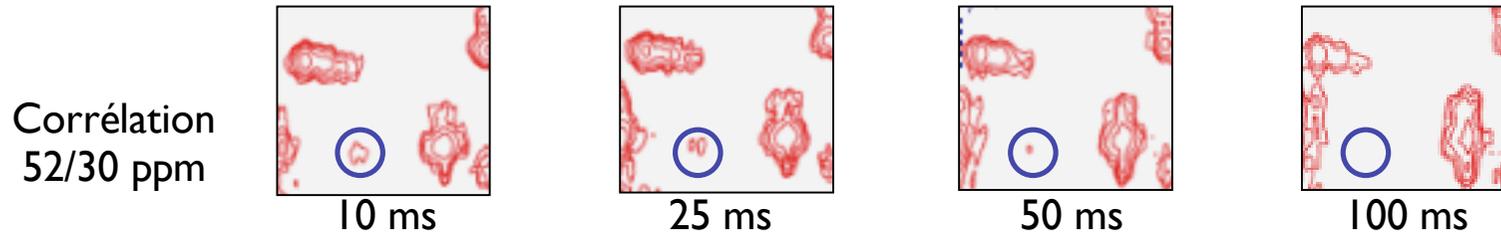
Séquence de recouplage DARR

Dipolar assisted rotational resonance ²¹

20 - Abdine *et al.*, 2010
21 - Takegoshi *et al.*, 2001

Échantillon uniformément marqué

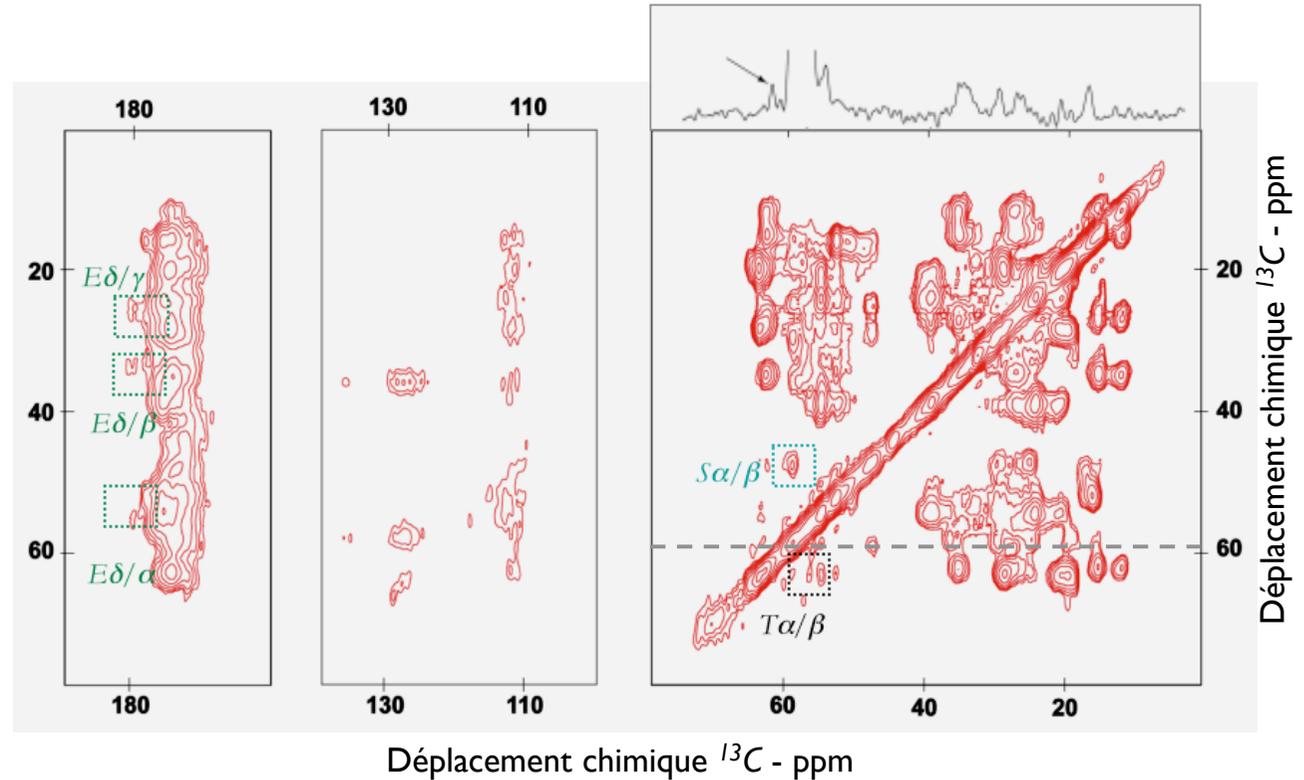
Analyse de l'intensité des pics isolés en fonction du temps de mélange



Séquence de recouplage DARR
Dipolar assisted rotational resonance ²¹

Échantillon uniformément marqué

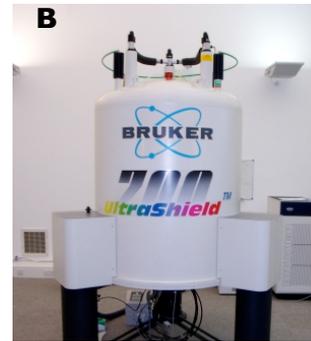
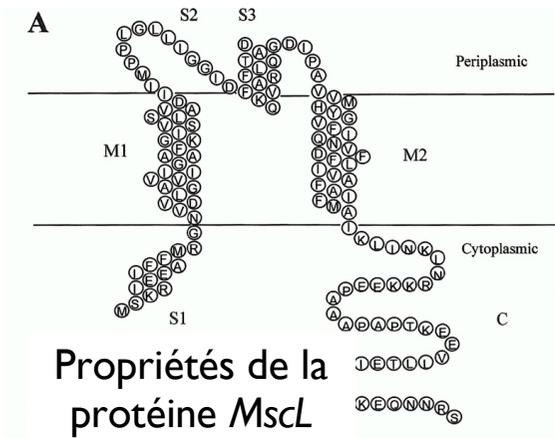
2D- ^{13}C - ^{13}C DARR
Temps d'acquisition 56 h
Température 248 K
Temps de mélange 50 ms



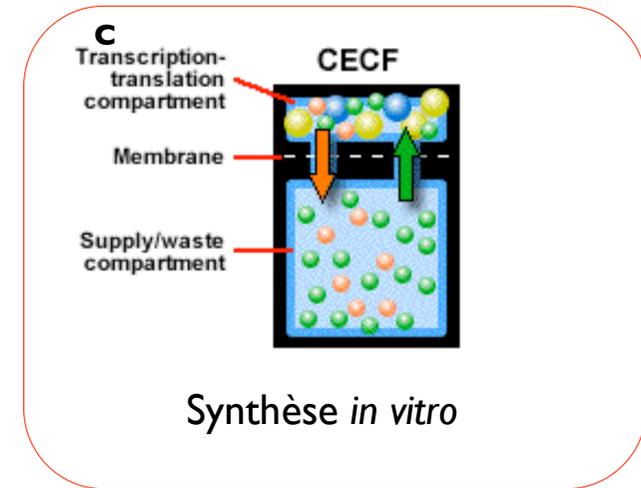
Bonne résolution: 0,6 ppm
Bon ratio signal/bruit

Recouvrement des signaux
Gamme de temps de mélange 10 - 100 ms

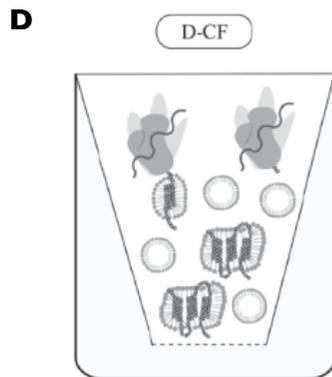
Nécessité d'un marquage
spécifique



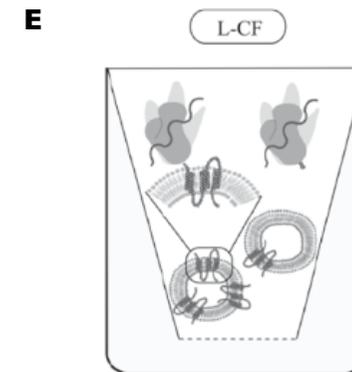
Résonance magnétique nucléaire en phase solide



Synthèse *in vitro* en échange continu



SIV en micelles de détergent



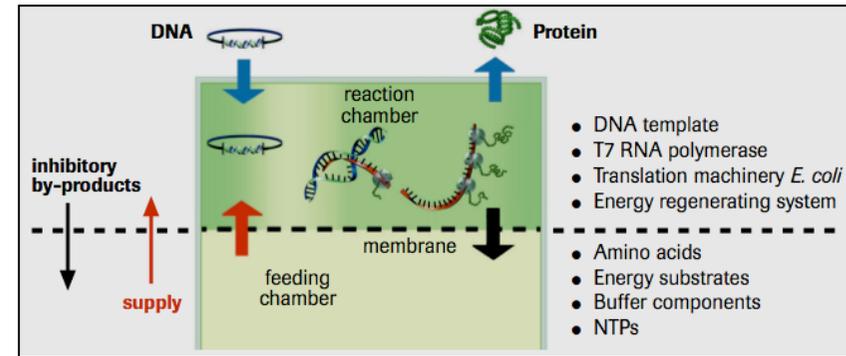
SIV en liposomes

Expression acellulaire en échange continu

Expression *in vitro* de protéines :

- *E. coli*^{22,23}
- Germes de blé²⁴
- Réticulocytes^{25,26}

Faible concentration, Produits incomplets,...

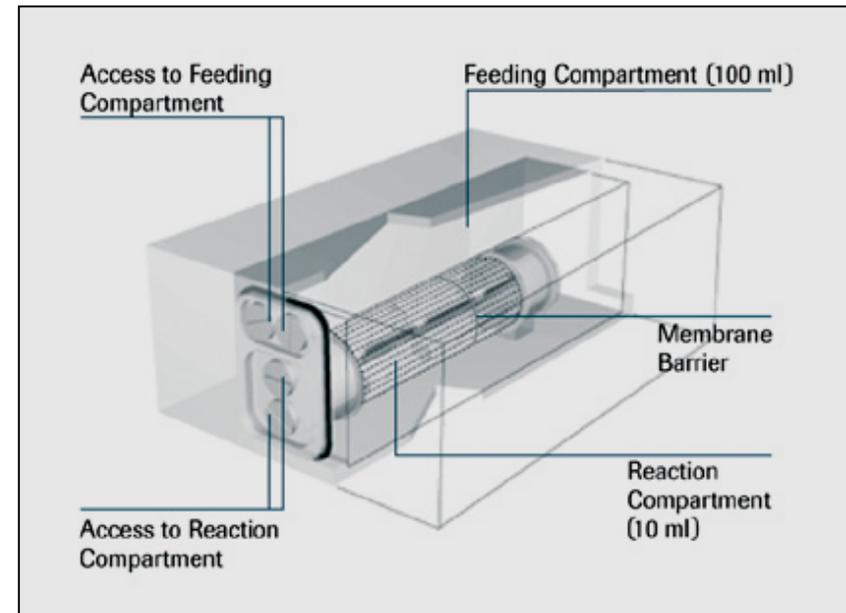


Synthèse *in vitro*

CE-CF = Cell-Free Continuous Exchange :
Transcription/traduction en milieu acellulaire ouvert (jusqu'à 24 H)²⁷

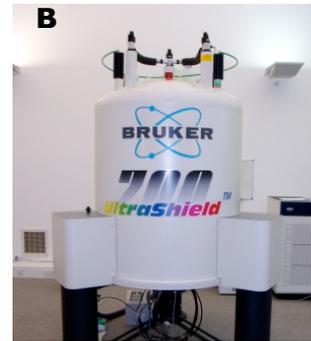
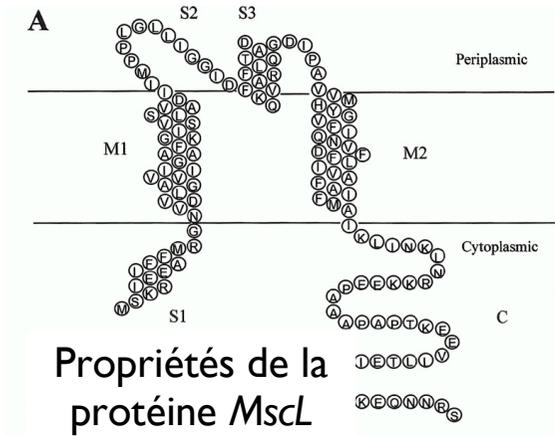
Synthèse contrôlée :

- Cofacteurs
- Acides aminés marqués ou non naturels
- Détergent, lipides, tensioactifs
- ...

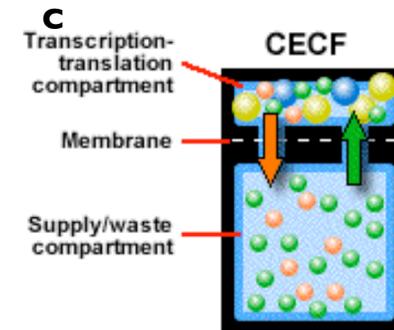


Dispositif RTS 9000

22 - Nirenberg, 1961 ; 23 - Zubay, 1973 ; 24 - Marcu & Dudock, 1974
25 - Cohen, 1969 ; 26 - Pelham, 1976 ; 27 - Spirin, 1988

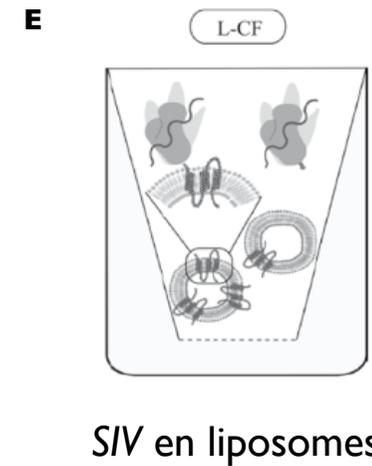
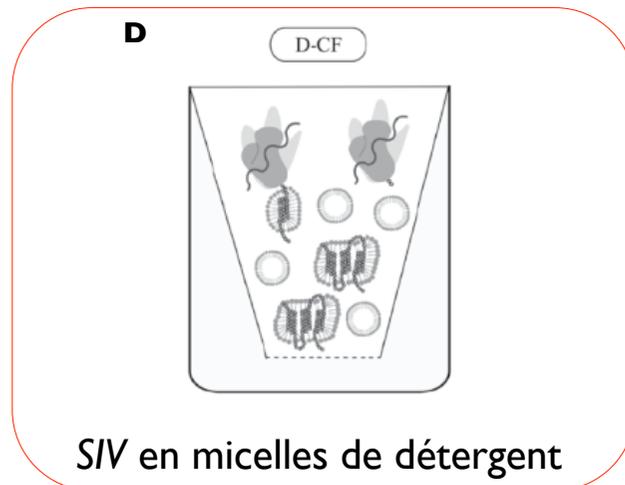


Résonance magnétique nucléaire en phase solide



Synthèse *in vitro*

Synthèse *in vitro* de la protéine MscL en micelles de détergent



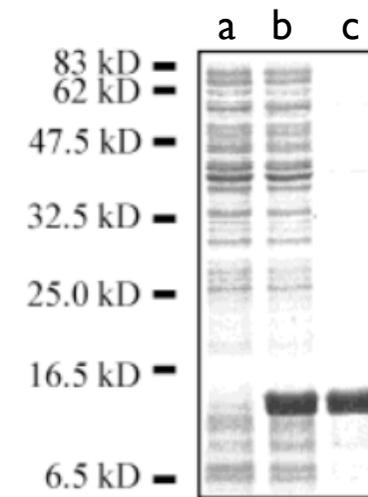
Synthèse *in vitro* et marquage sélectif

Synthèse *in vitro* SIV de la protéine *Ec-MscL*

Le gène identifié *mscL* est seul responsable de l'activité mécanosensible dans *E. coli*²⁸

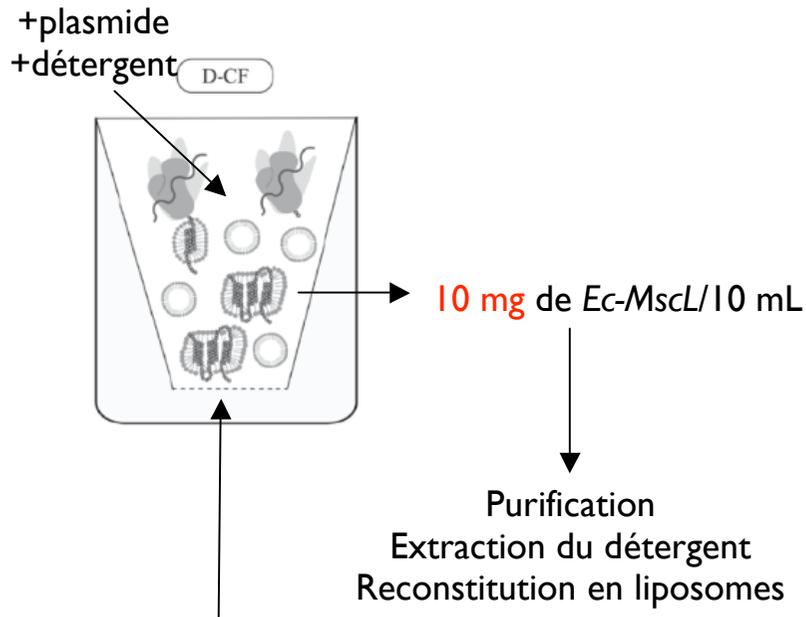
SIV de *Ec-MscL* en présence de différents détergents (*RTS-500*)²⁹

SIV de *Ec-MscL* (*RTS-9000*) en micelles de triton-x-100 et incorporation d'acides aminés marqués aux ¹³C, ¹⁵N, puis reconstitution en liposomes^{30,31}



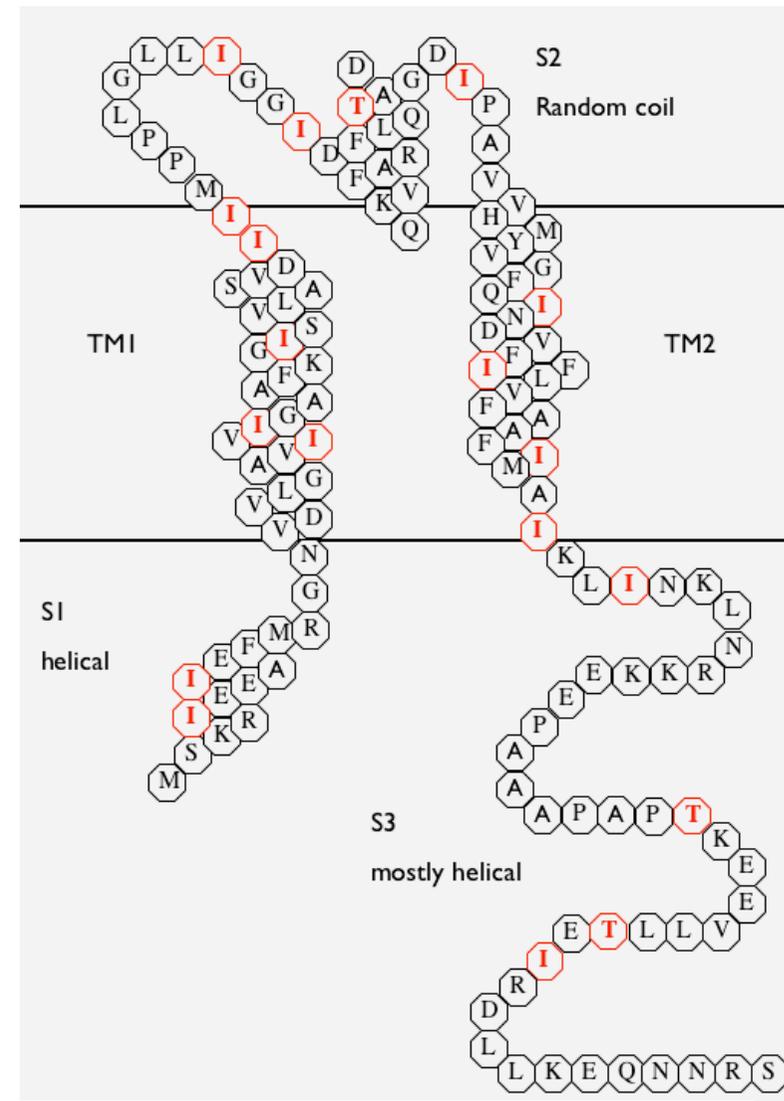
*RTS-500 MscL*²⁹ :
avant synthèse (a),
après synthèse (b),
après purification (c)

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Ile₁₆, Thr₃)-*Ec*-MscL



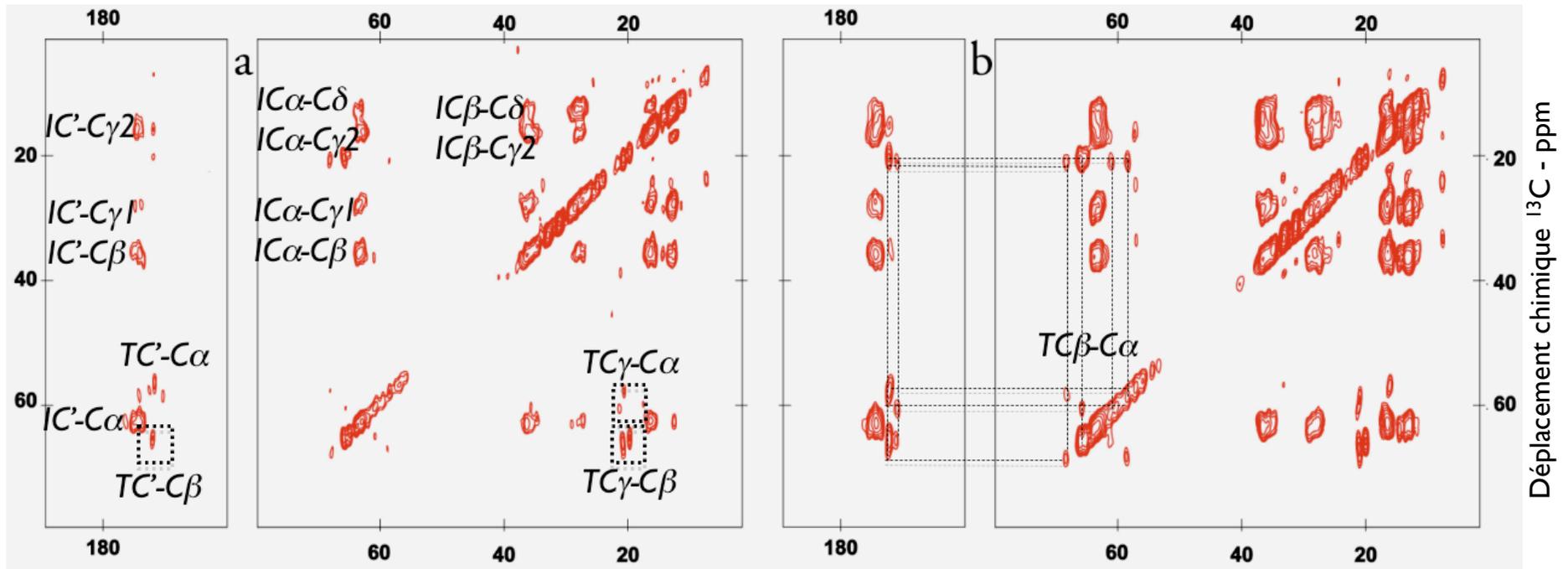
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Ile & Thr
les autres acides aminés
non marqués

Ec-MscL sélectivement marquée (+His-tag) :
16,3 kDa



Composition de l'échantillon RMN : 18 mg H₂O - 6 mg lipides - 3 mg *MscL*

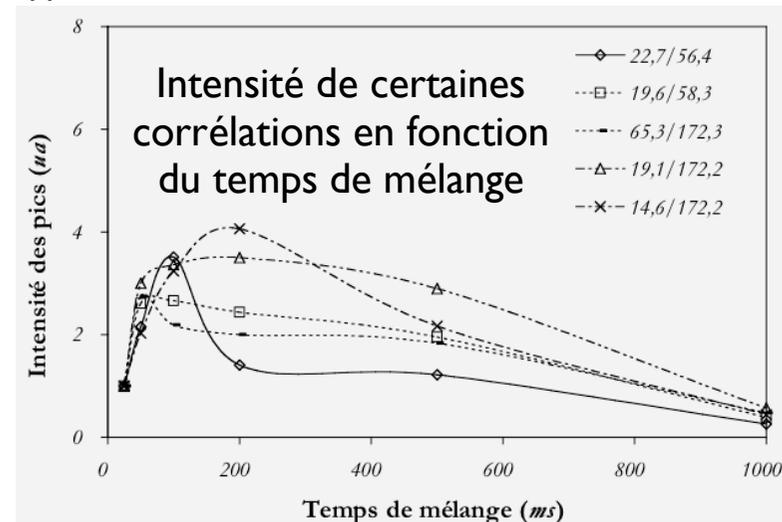
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Ile₁₆, Thr₃)-Ec-Mscl



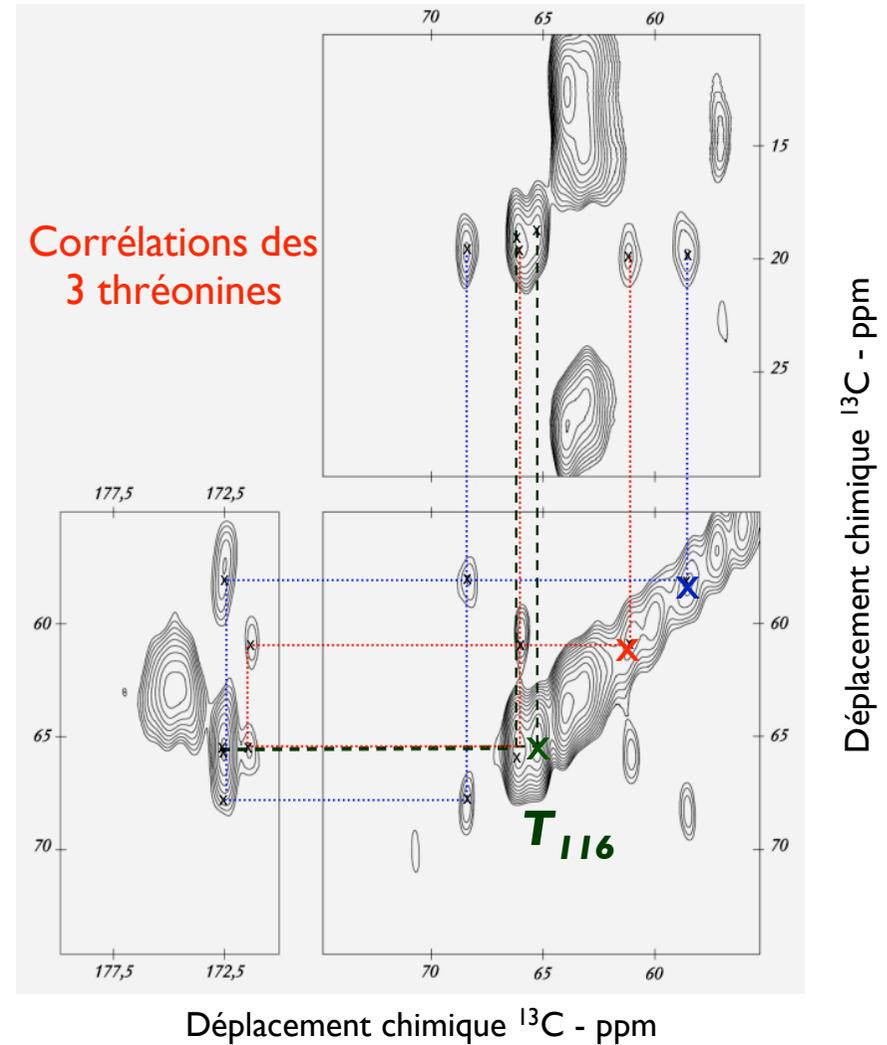
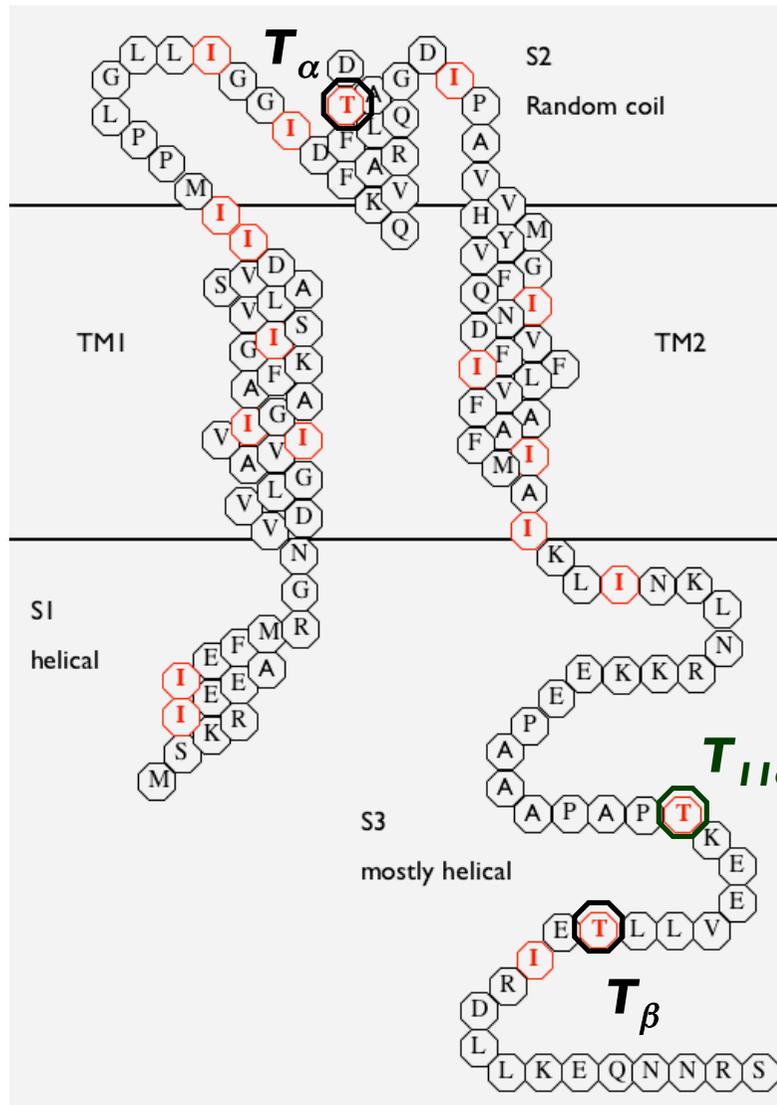
Déplacement chimique ^{13}C - ppm

2D- ^{13}C - ^{13}C DARR
 Temps d'acquisition 14 h
 Température 248 K
 Temps de mélange 20 (a) et 50 (b) ms

Identification de 8 Ile (/16)
 Identification des 3 Thr
 Temps de mélange 10 ms - 1 s

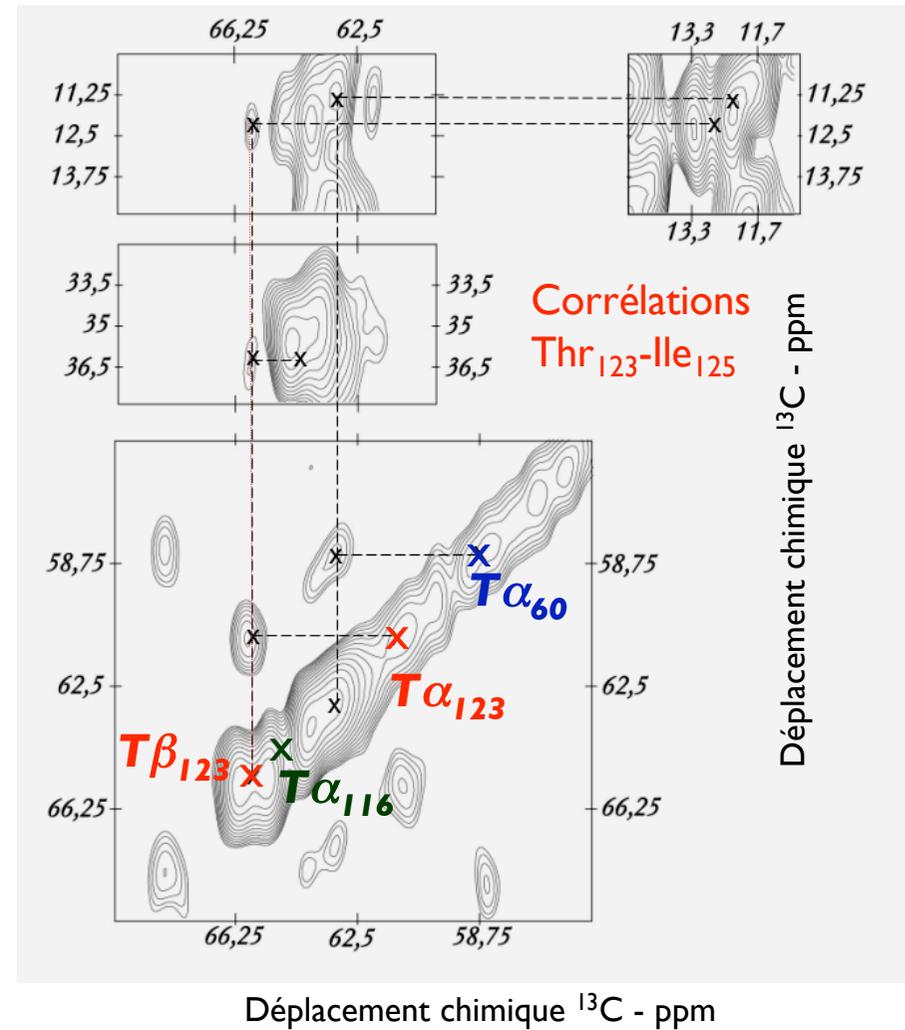
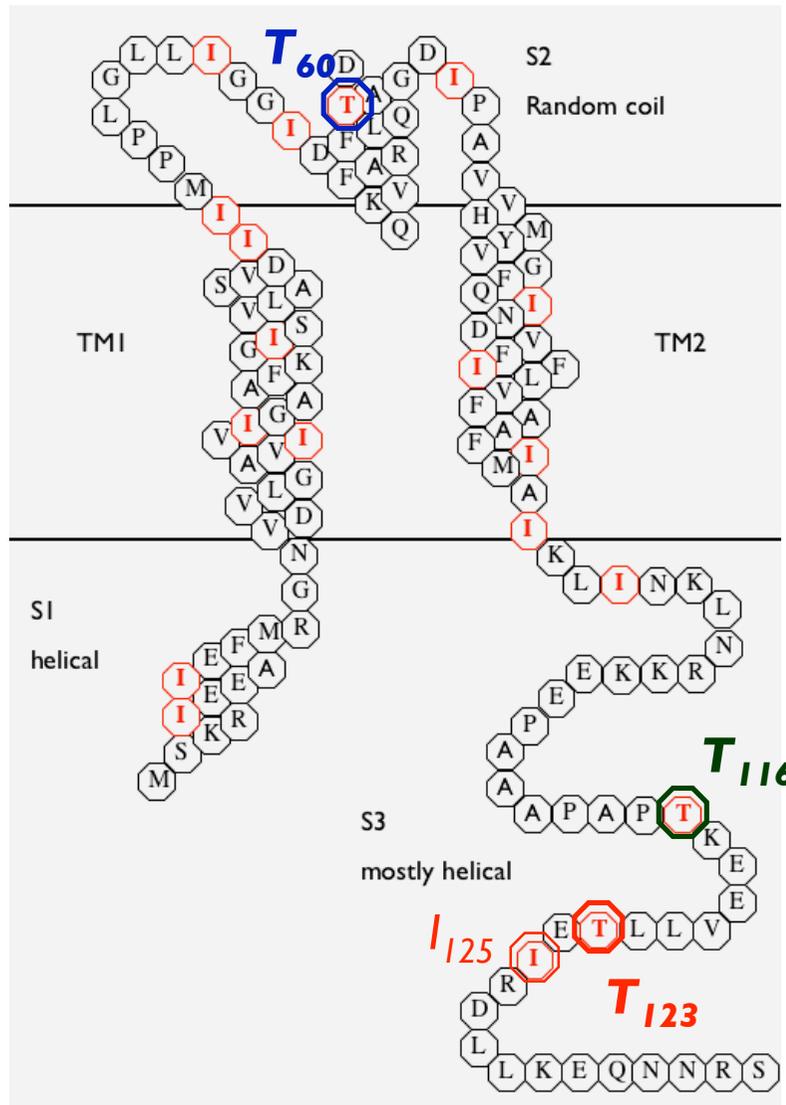


$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Ile₁₆, Thr₃)-Ec-MscL



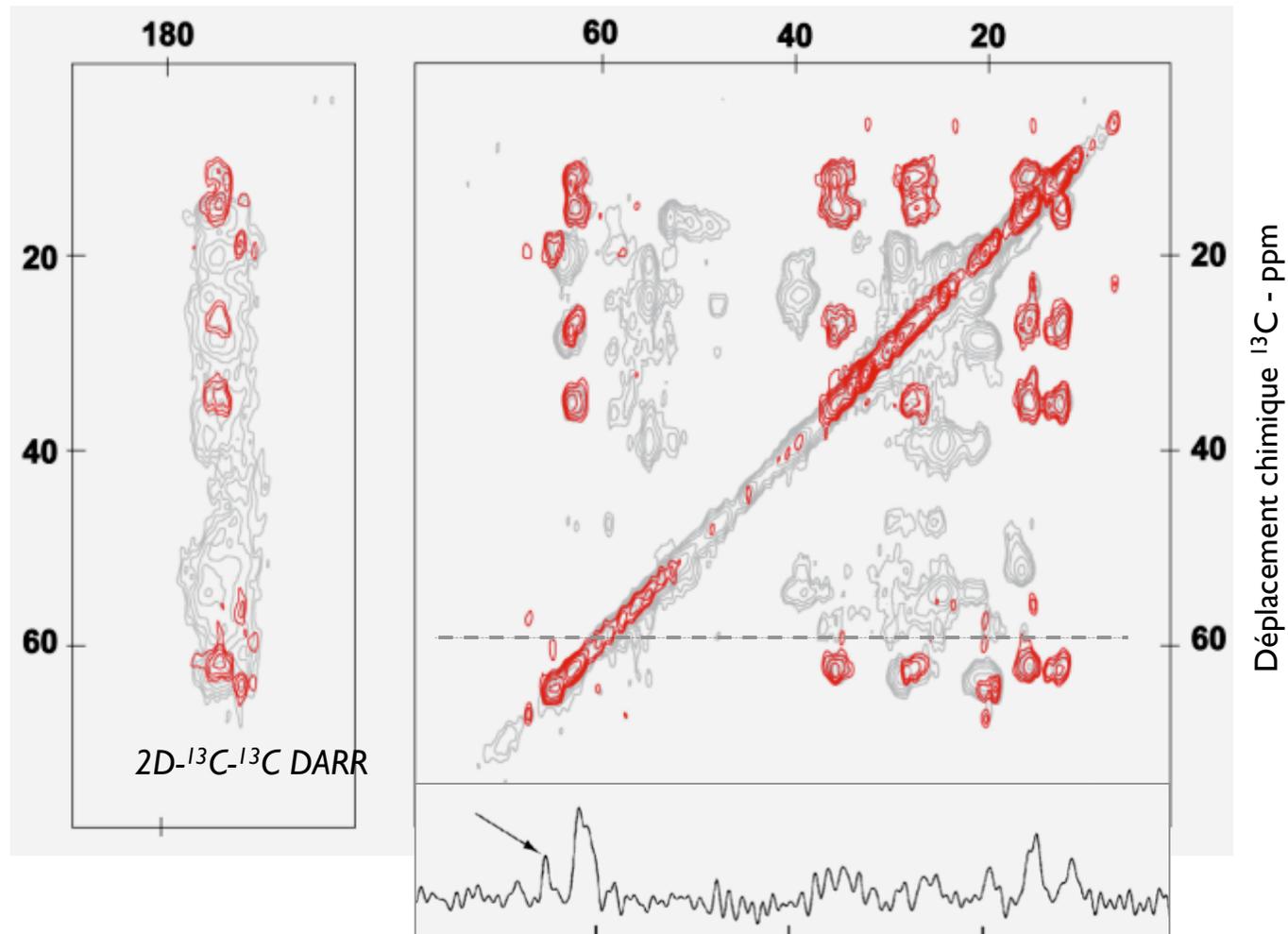
Contraintes à courte portée
Attribution des Thréonines

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}-(\text{Ile}_{16}, \text{Thr}_3)\text{-Ec-MscL}$



Contraintes à longue portée
Corrélations Ile-Thr

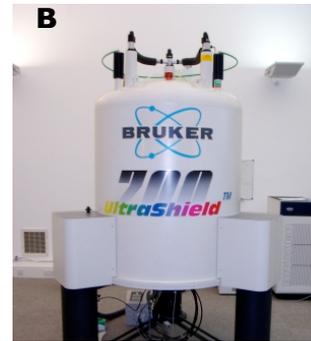
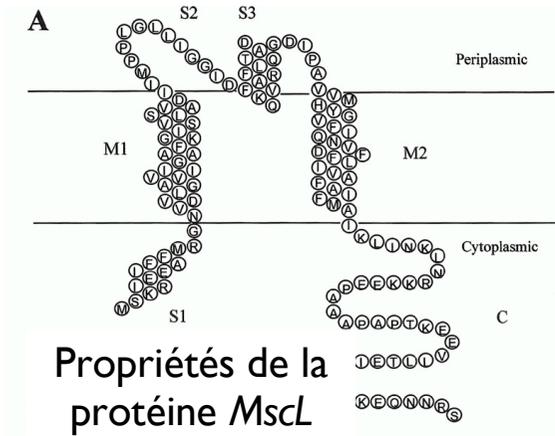
Contribution de la synthèse *in vitro*



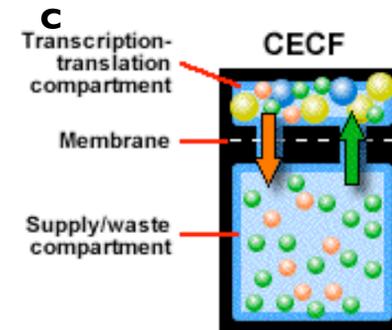
Moins de recouvrement
Résolution inchangée : 0,5-0,6 ppm
Rapport signal sur bruit amélioré

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Ile, Thr-Ec-MscL
 $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -uniforme-Ec-MscL

Contraintes de distance à courte et longue portées

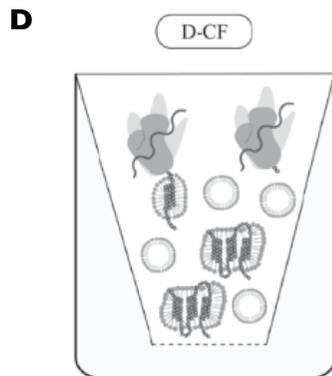


Résonance magnétique nucléaire en phase solide

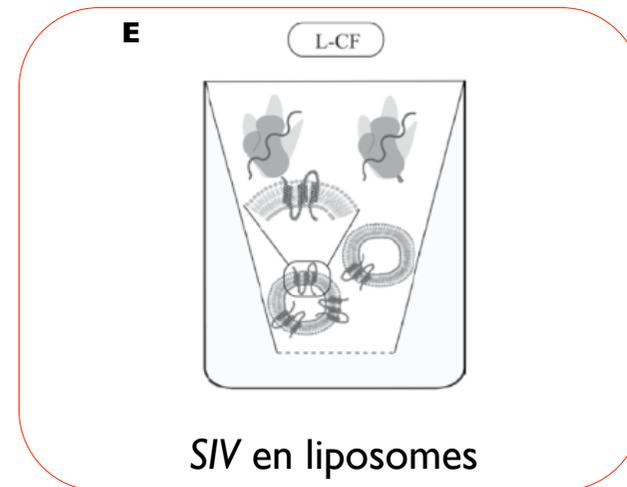


Synthèse *in vitro*

Synthèse *in vitro* de la protéine *MscL* en liposomes Développement de nouvelles stratégies de marquage



SIV en micelles de détergent



SIV en liposomes

Synthèse *in vitro* et marquage sélectif

Synthèse *in vitro* SIV de la protéine *Ec-MscL*

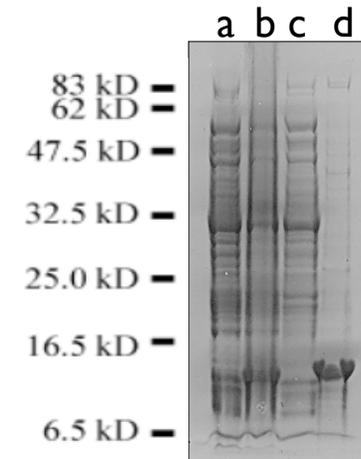
Le gène identifié *mscL* est seul responsable de l'activité mécanosensible dans *E. coli*²⁸

SIV de *Ec-MscL* en présence de différents détergents (RTS-500)²⁹

SIV de *Ec-MscL* (RTS-9000) en micelles de triton-x-100 et incorporation d'acides aminés marqués aux ¹³C, ¹⁵N, puis reconstitution en liposomes^{30,31}

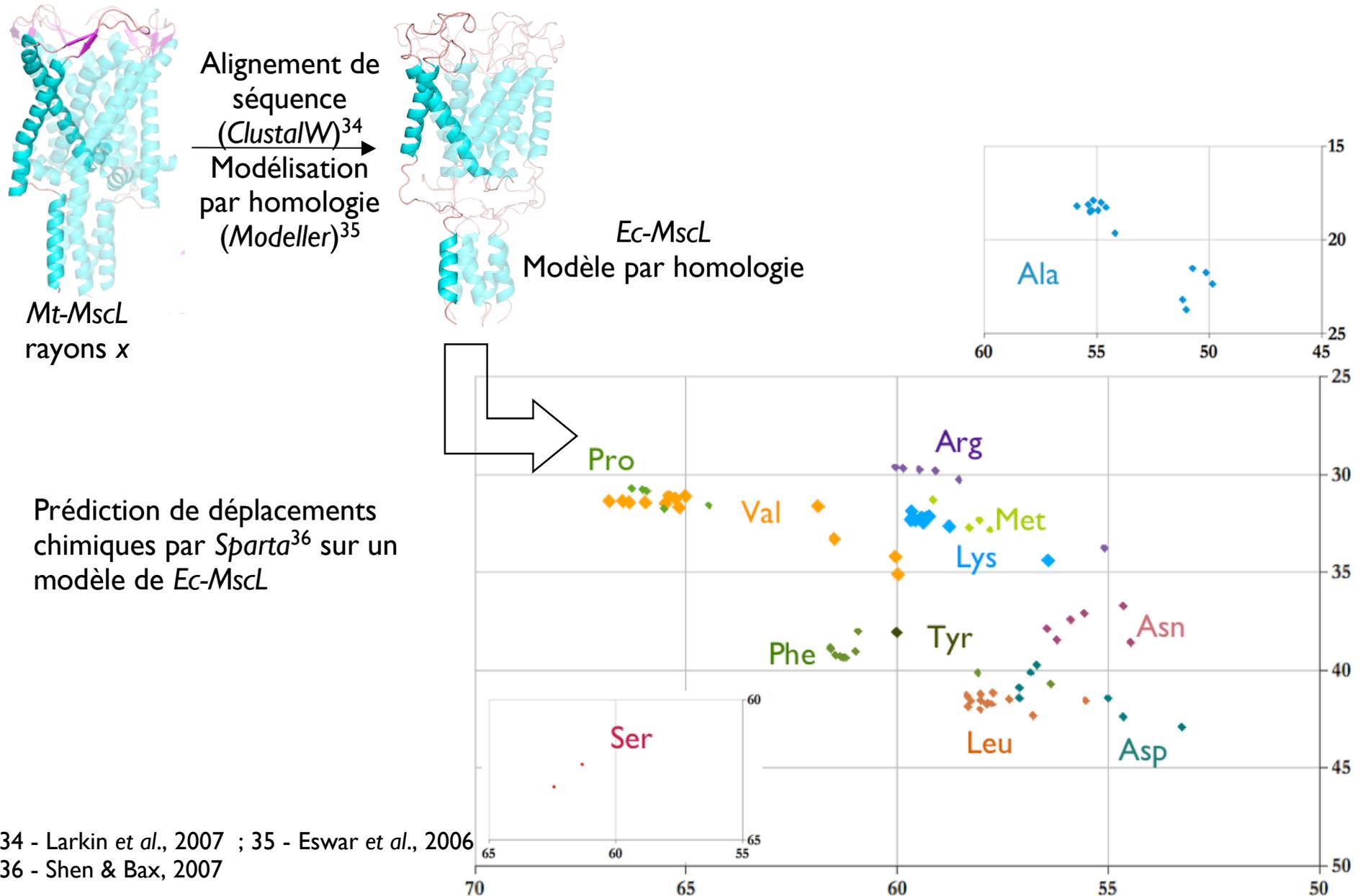
SIV de *Ec-MscL* directement en liposomes (RTS-500)³²

SIV de *Ec-MscL* (RTS-9000) directement en liposomes de DOPC et incorporation d'acides aminés marqués aux ¹³C, ¹⁵N³³



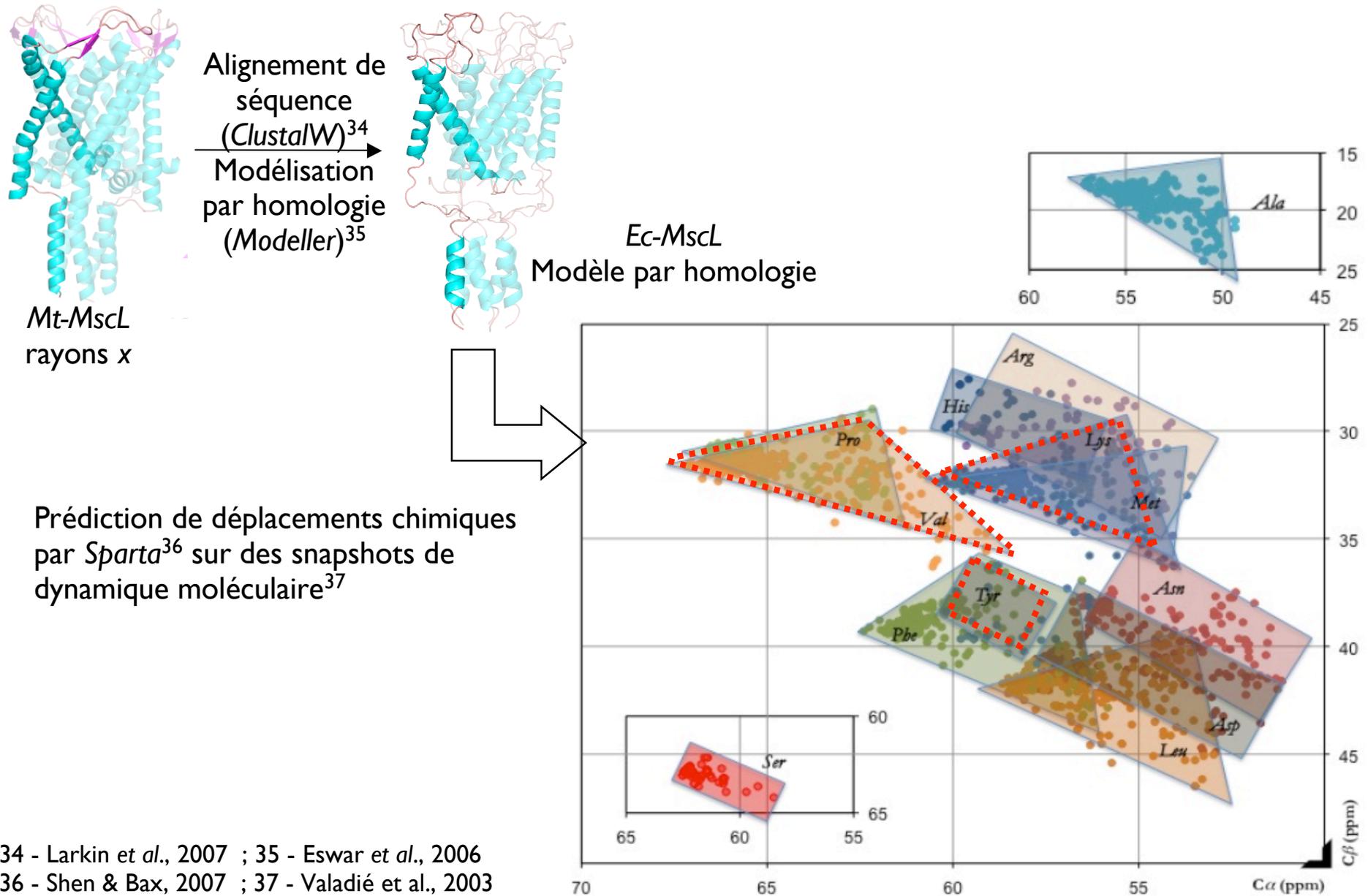
RTS-9000 MscL :
avant synthèse (a),
après synthèse (b),
surnageant (c) et
culot (d) après
ultra-centrifugation

Marquage sélectif - Prédiction des déplacements chimiques



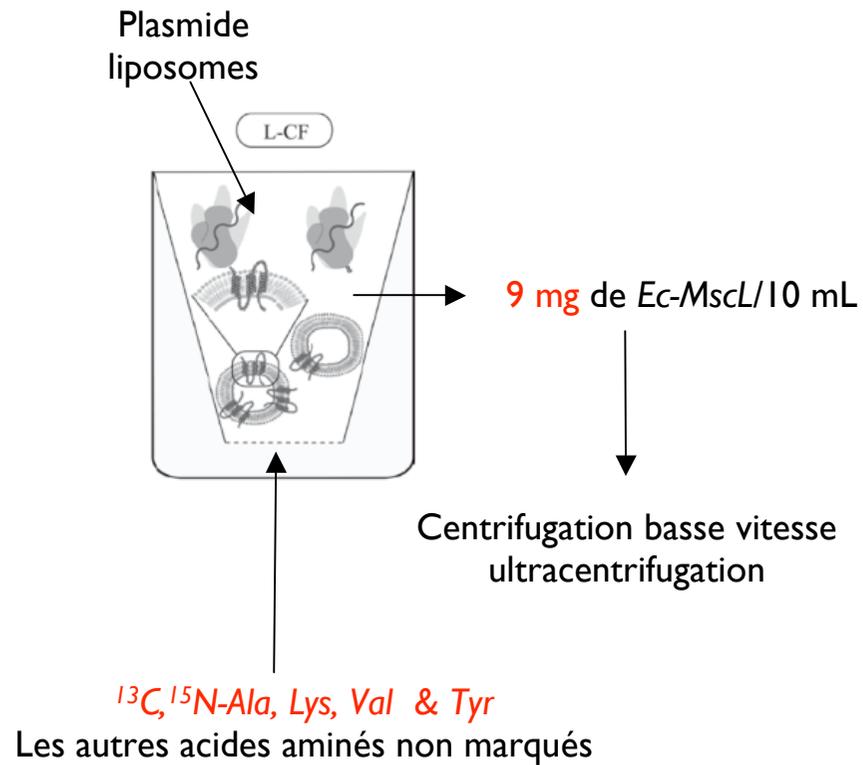
34 - Larkin *et al.*, 2007 ; 35 - Eswar *et al.*, 2006
36 - Shen & Bax, 2007

Marquage sélectif - Prédiction des déplacements chimiques

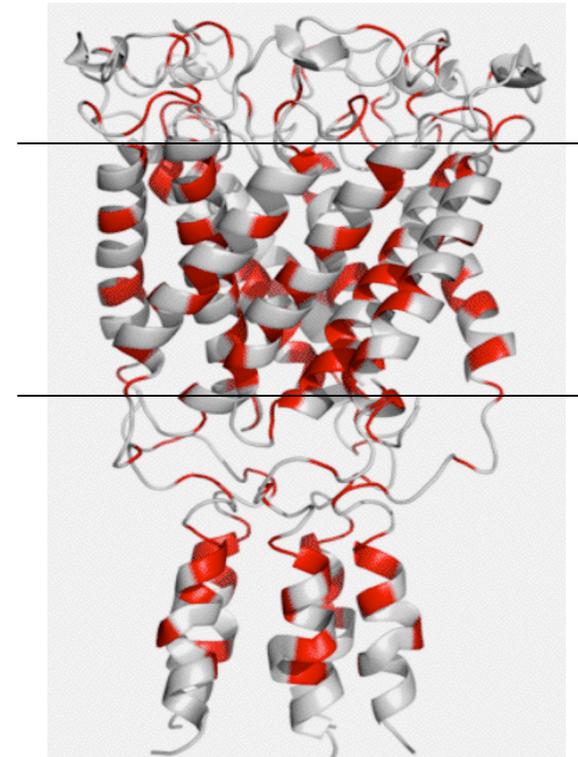


34 - Larkin et al., 2007 ; 35 - Eswar et al., 2006
36 - Shen & Bax, 2007 ; 37 - Valadié et al., 2003

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Ala₁₅, Lys₉, Val₁₃, Tyr₁)-Ec-MscL



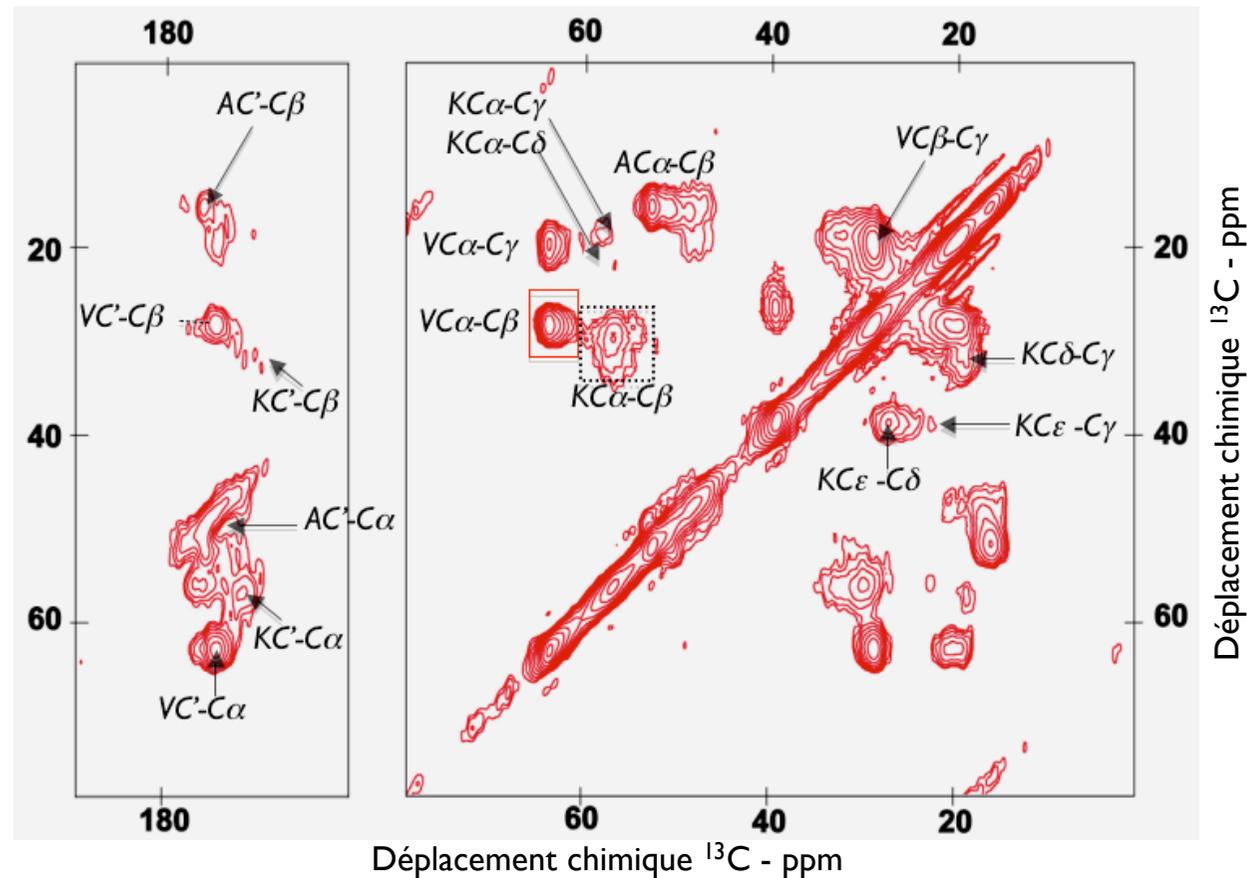
Ec-MscL sélectivement marqué (+His-tag) :
16,4 kDa



Modèle par homologie de Ec-MscL
Résidus Ala, Lys, Val et Tyr en rouge

Composition de l'échantillon RMN : 18 mg H₂O - 6 mg lipides - 3 mg MscL

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Ala₁₅, Lys₉, Val₁₃, Tyr₁)-Ec-MscL



Temps d'acquisition 14 h
Température 248 K
Temps de mélange 20 ms

Pas de recouvrement entre groupes d'acides aminés

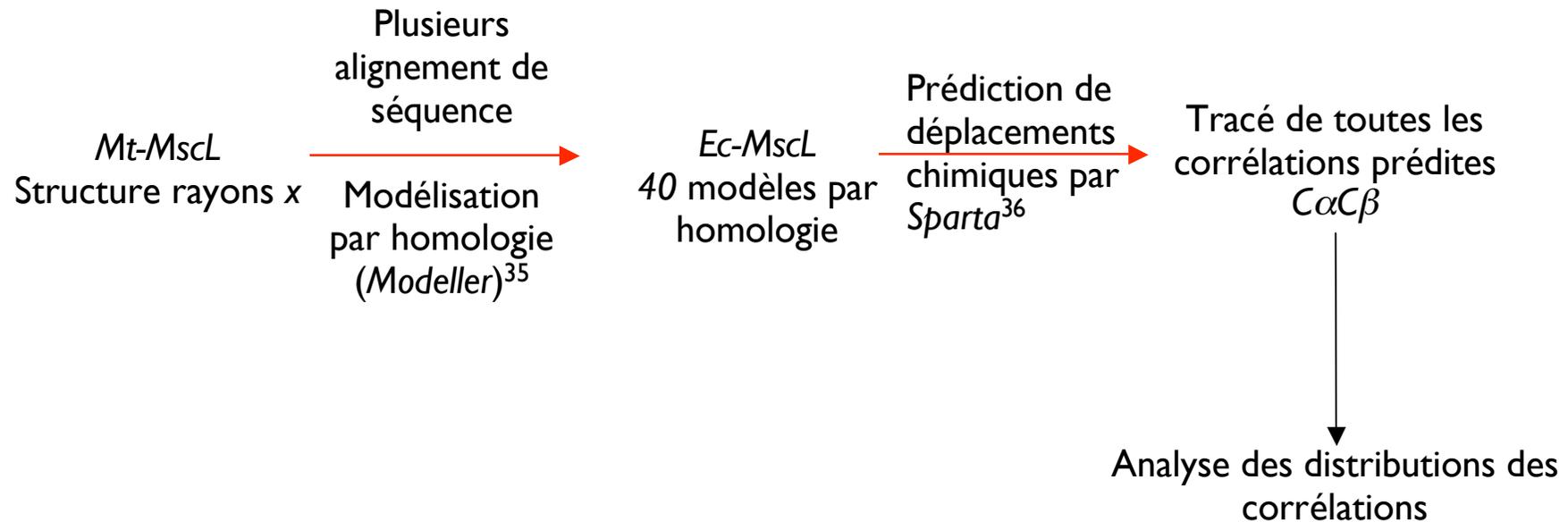
Aucune séparation au sein du même groupe

Ex. 13 Val mais un seul pic

Marquage sélectif - Prédiction des déplacements chimiques

Prédiction efficace - résultats fiables

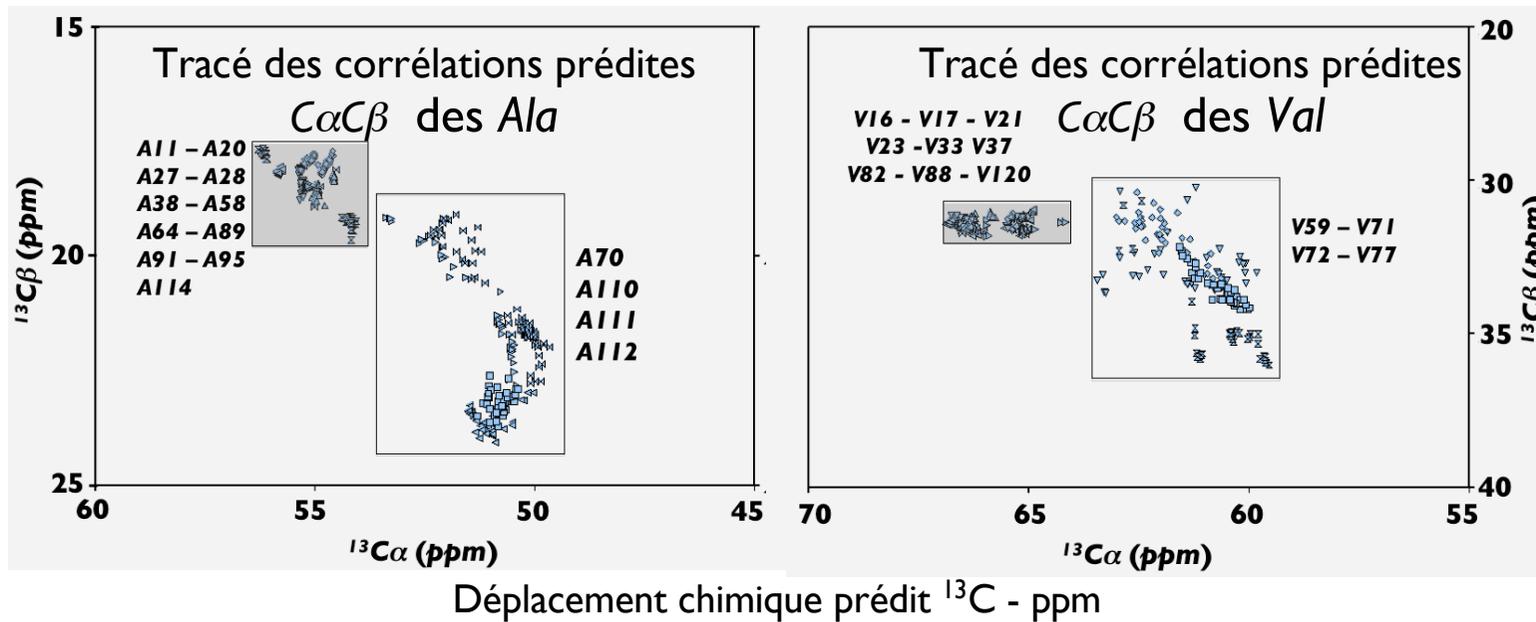
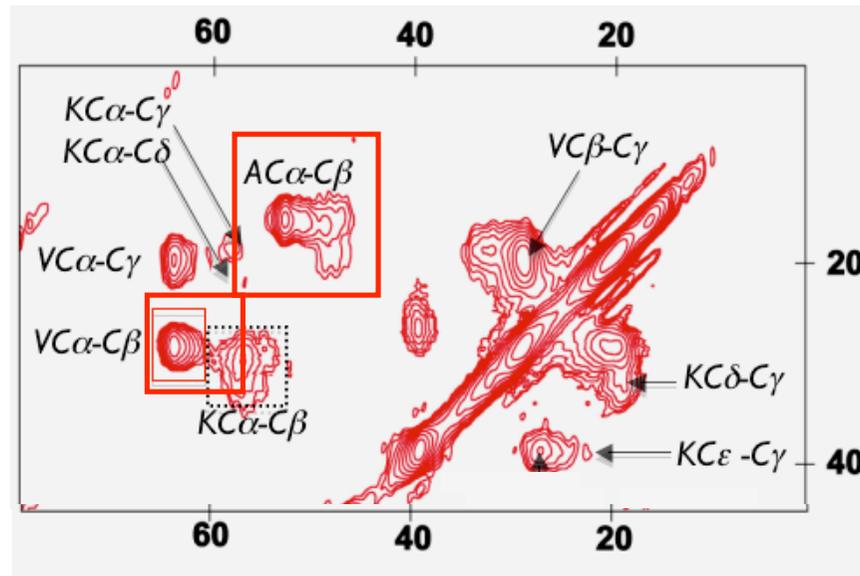
Détailler la prédiction pour un meilleur choix d'acides aminés



35 - Eswar et al., 2006

36 - Shen & Bax, 2007

Analyse des distributions des corrélations prédites



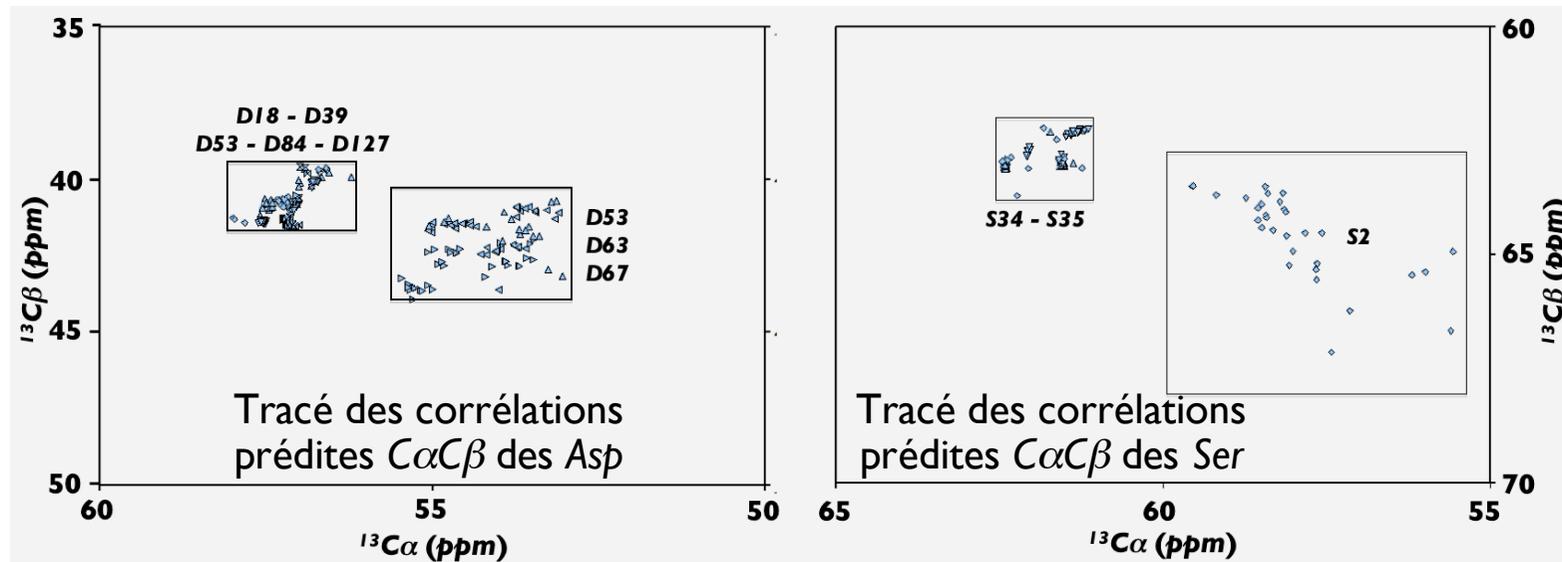
Déplacement chimique prédit ^{13}C - ppm

Analyse des distributions des corrélations prédites

Prédiction efficace - résultats fiables

Détailler la prédiction pour un meilleur choix d'acides aminés

Asp et Ser : plus de dispersion



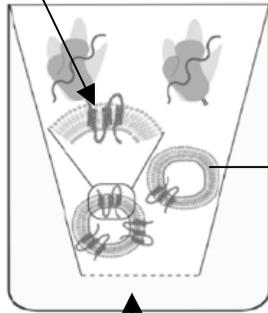
Déplacement chimique
prédit ^{13}C - ppm

Déplacement chimique prédit ^{13}C - ppm

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Asp₇, Gly₉, Leu₁₃, Ser₃)-Ec-MscL

Plasmide liposomes

L-CF



6 mg de Ec-MscL/10 mL

Centrifugation basse vitesse
ultracentrifugation

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Asp, Gly, Leu & Ser

Les autres acides aminés non marqués

MGIIKEFREF AMRGNVVDLA VGVIIGAAFG KIVSSLVADI
IMPPLGLLIG GIDFKQFAVT LRDAQGDIPA VVMHYGVFIQ
NVFDFLIVAF AIFMAIKLIN KLNRRKEEPA AAPAPTKEEV
LLTEIRDLLK EQNNRSPGGG SHHHHHH

Composition de l'échantillon RMN : 18 mg H₂O - 6 mg lipides - 3 mg MscL

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Asp₇, Gly₉, Leu₁₃, Ser₃)-Ec-MscL

2D- ^{13}C - ^{13}C DARR

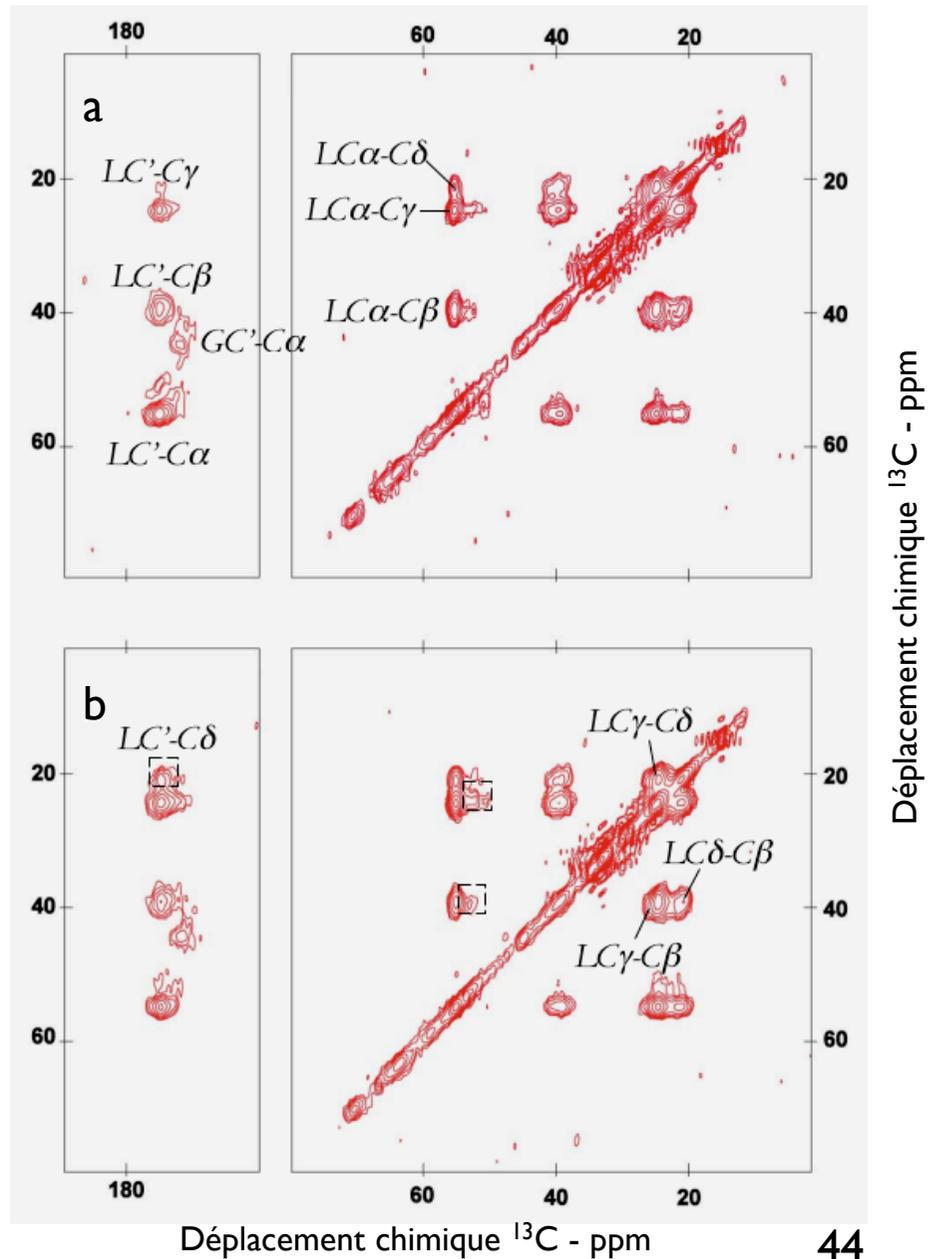
Temps d'acquisition 56 h

Température 248 K

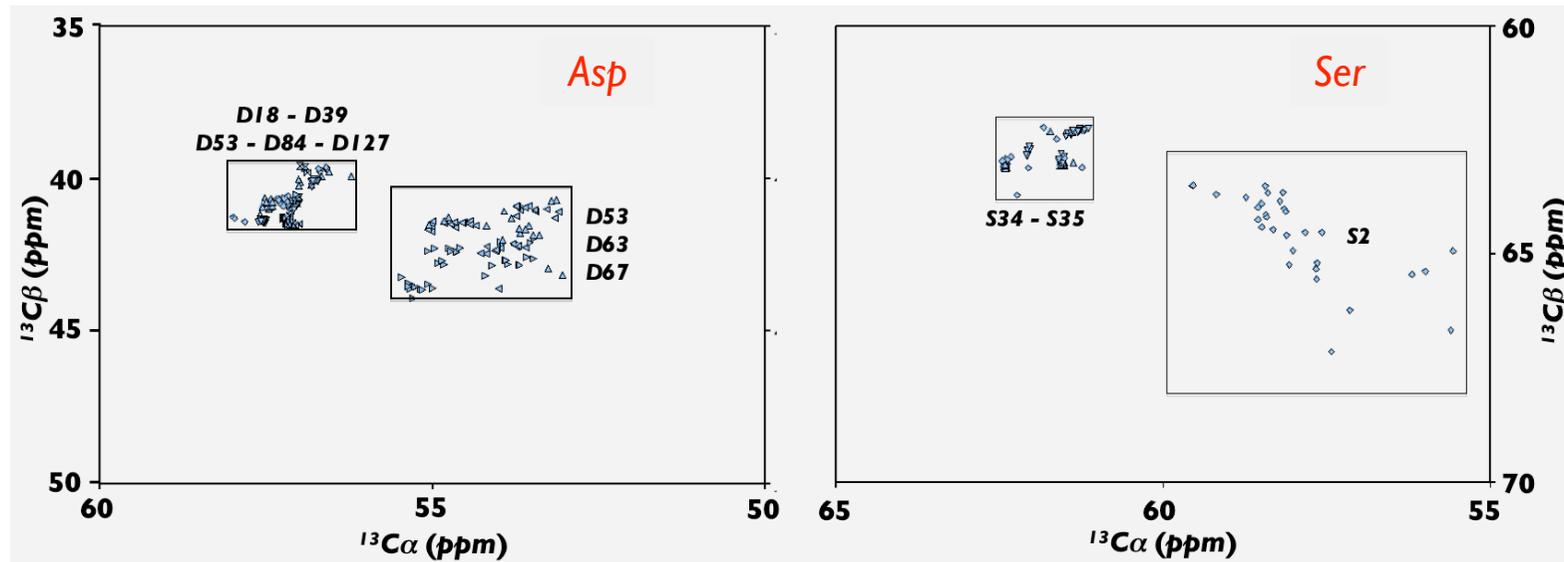
Temps de mélange 20 (a) et 100 (b) ms

Bonne résolution 0,8 ppm

Absence de corrélations pour Asp et Ser



$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Asp₇, Gly₉, Leu₁₃, Ser₃)-Ec-MscL



Dispersion / fluctuations

Mouvements intermédiaires : aucune variation en modifiant la température (233-263 K)

Variation de la composition lipidique : en projet

Brouillage de marquage

Marquage sélectif - Analyse de la séquence

MGI¹⁵IK EFREF A¹⁶M¹⁰R⁴G⁶N VVDLA VGVII GAAFG KIVSS LVADI IMPPL GLLIG
 GIDFK QFAVT I¹²R⁴D⁷A¹⁵Q GDIPA VVMHY GVFIQ NVFDF LIVAF AIFMA IKLIN
 KLN⁹RK KEEPA AAPAP TKEEV I¹²L¹³T³E⁸I RDLLK EQNNR SPGGG SHHHH HH

Marquage isotopique double combinatoire³⁸

68 paires isolées

Marquage sélectif des acides aminés selon leur abondance dans la protéine³⁹

<i>Ile (I)</i>	16	10,80%	<i>Pro (P)</i>	7	4,70%
<i>Ala (A)</i>	15	10,20%	<i>Arg (R)</i>	6	4,00%
<i>Leu (L)</i>	13	8,80%	<i>Asn (N)</i>	6	4,00%
<i>Val (V)</i>	13	8,80%	<i>Met (M)</i>	5	3,40%
<i>Gly (G)</i>	12	8,10%	<i>Ser (S)</i>	5	3,40%
<i>Phe (F)</i>	10	6,80%	<i>Gln (Q)</i>	4	2,70%
<i>Lys (K)</i>	9	6,10%	<i>Thr (T)</i>	3	2,00%
<i>Glu (E)</i>	8	5,40%	<i>Tyr (Y)</i>	1	0,10%
<i>Asp (D)</i>	7	4,70%	<i>Cys (C)</i>	0	0,00%
<i>His (H)</i>	7	4,70%	<i>Trp (W)</i>	0	0,00%

I par catégorie

I-2 par catégorie

38 - Sobhanifar et al., 2010

39 - Ozawa et al., 2006

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Phe₁₀, Ile₁₆, Met₅, Pro₆, Arg₆)-Ec-MscL

MGI**I**K E**F**REF A**M**RG**N** VVD**L**A VGV**I**I GAA**F**G KIV**S**S LVAD**I** **I**MP**P**L GLL**I**G
 GID**F**K Q**F**AVT LR**D**QA GD**I**PA VVM**H**Y GV**F**I**O** NV**F**DE L**I**V**A**F **A**I**F**MA **I**KL**I**N
 KL**N**RK KE**E**PA AA**P**AP **T**KEEV LL**T**E**I** **R**DLLK EQ**N**NR SPGGG SHHHH HH

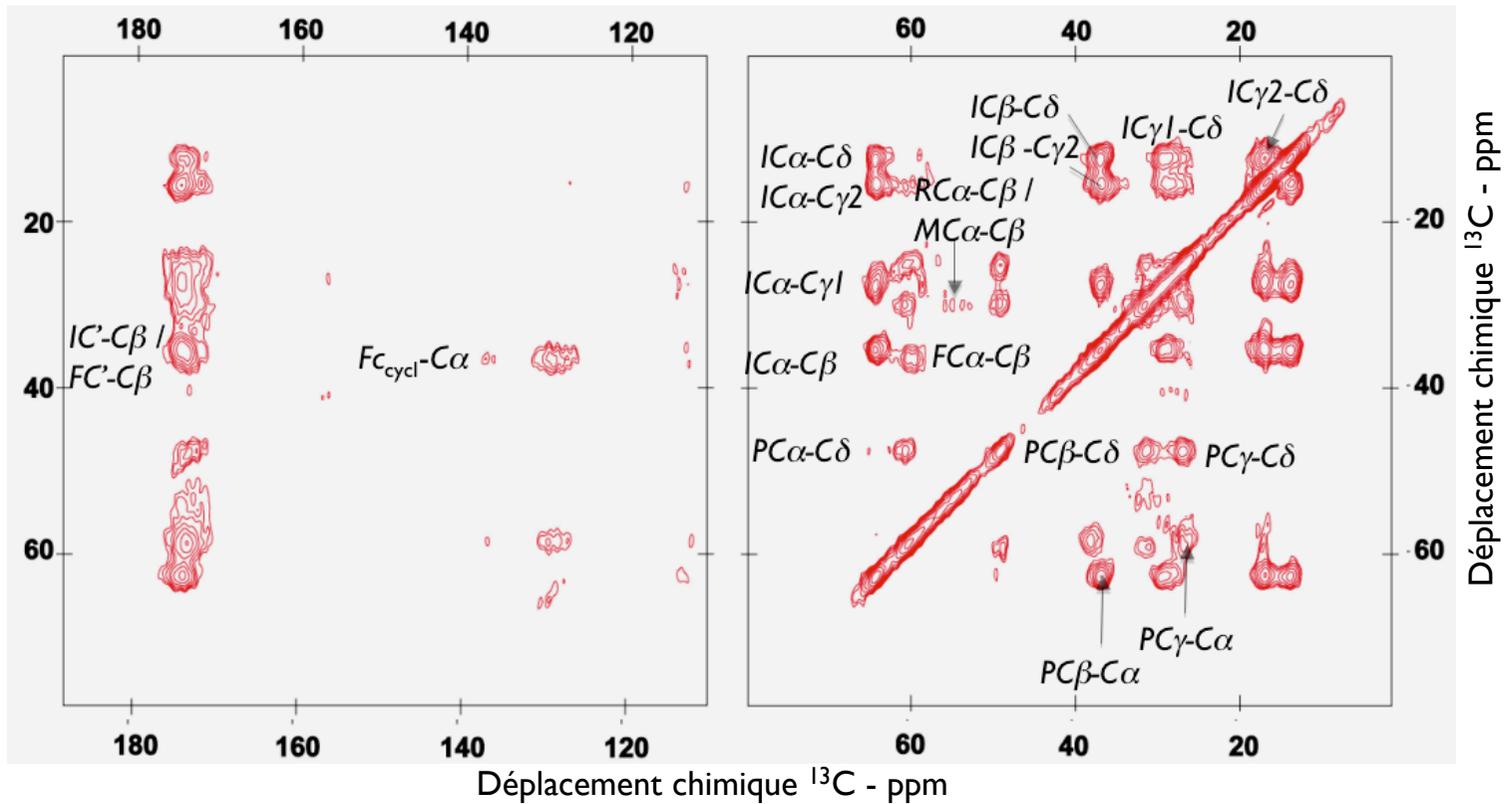
9 paires isolées

Marquage de 30% de la protéine

<i>Ile (I)</i>	16	10,80%	<i>Pro (P)</i>	7	4,70%
<i>Ala (A)</i>	15	10,20%	<i>Arg (R)</i>	6	4,00%
<i>Leu (L)</i>	13	8,80%	<i>Asn (N)</i>	6	4,00%
<i>Val (V)</i>	13	8,80%	<i>Met (M)</i>	5	3,40%
<i>Gly (G)</i>	12	8,10%	<i>Ser (S)</i>	5	3,40%
<i>Phe (F)</i>	10	6,80%	<i>Gln (Q)</i>	4	2,70%
<i>Lys (K)</i>	9	6,10%	<i>Thr (T)</i>	3	2,00%
<i>Glu (E)</i>	8	5,40%	<i>Tyr (Y)</i>	1	0,10%
<i>Asp (D)</i>	7	4,70%	<i>Cys (C)</i>	0	0,00%
<i>His (H)</i>	7	4,70%	<i>Trp (W)</i>	0	0,00%

Composition de l'échantillon RMN : 18 mg H₂O - 6 mg lipides - 3 mg MscL

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Phe₁₀, Ile₁₆, Met₅, Pro₆, Arg₆)-Ec-MscL



2D- ^{13}C - ^{13}C DARR

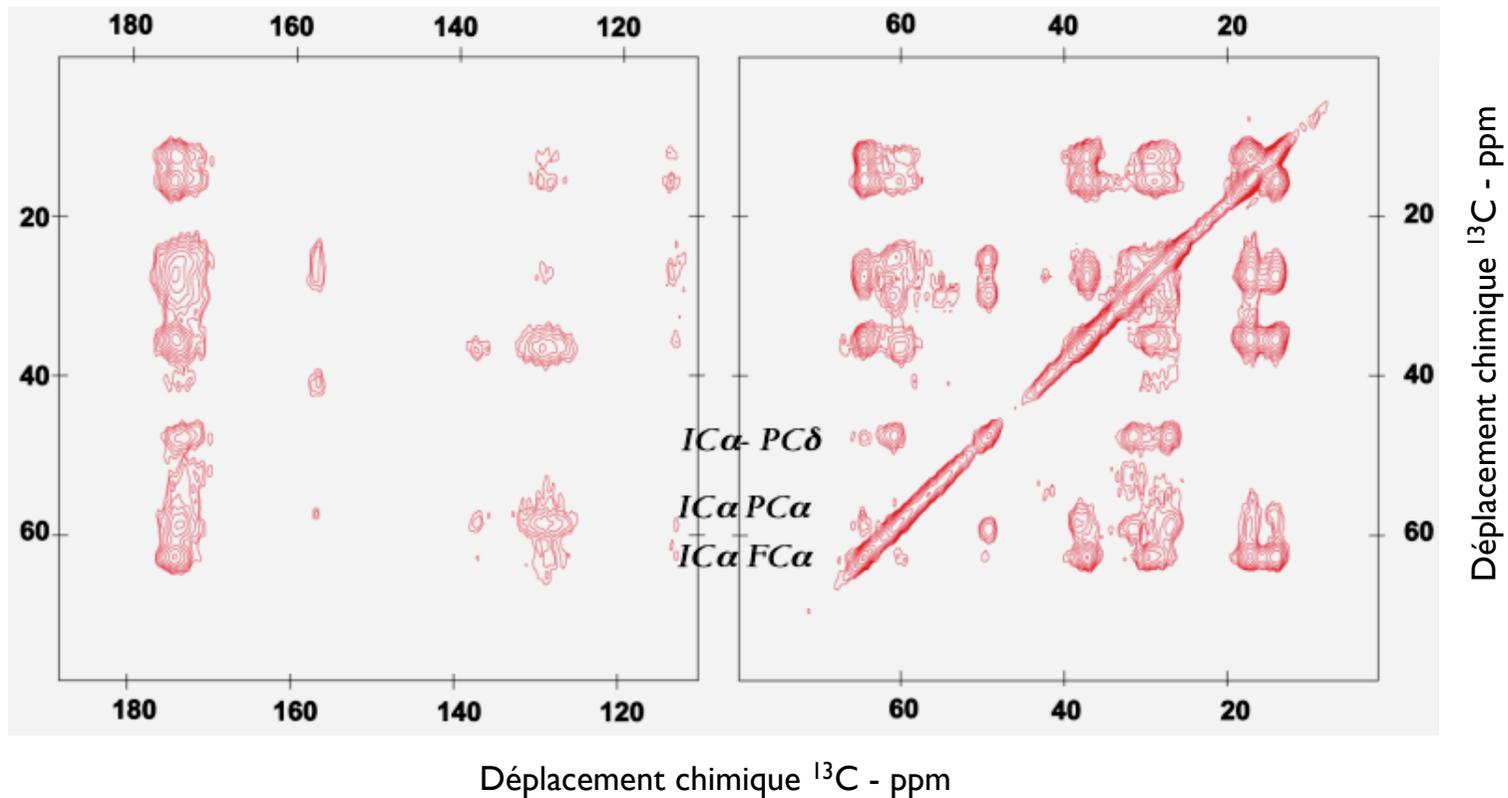
Temps d'acquisition 56 h

Température 248 K

Temps de mélange 50 ms

Bonne résolution 0,7-0,8 ppm

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Phe₁₀, Ile₁₆, Met₅, Pro₆, Arg₆)-Ec-MscL



2D- ^{13}C - ^{13}C DARR

Temps d'acquisition 56 h

Température 248 K

Temps de mélange 200 ms

Bonne résolution 0,7-0,8 ppm
Peu de corrélations inter-résiduelles

Marquage sélectif - Analyse de la séquence

(Phe, Ile, Met, Pro, Arg) = 30% de la protéine marqué

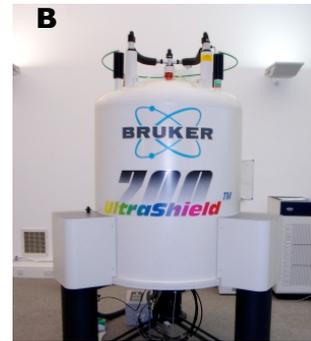
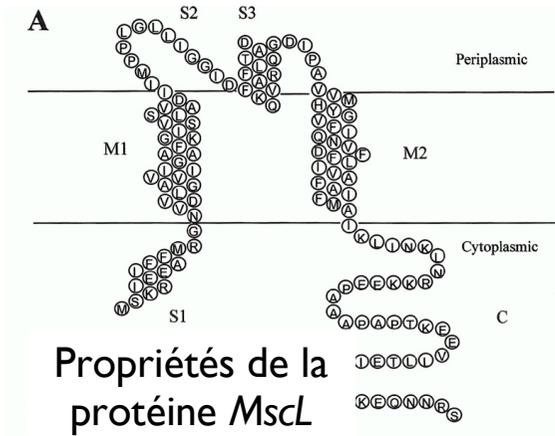
Même stratégie :

(Asp, Gly, Phe, Arg) = 23% de la protéine - 4 paires uniques (en cours)

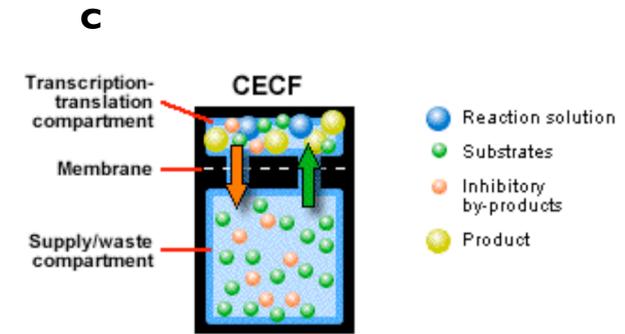
```
MGIIKE[FREF] AM[RG]NVVDLA VGVIIGAA[FG] KIVSSLVADI
IMPPLGLLIG GID[FKQ]FAVT LRDAQGDIPA VVMHYGV[FIQ]
NV[FDF]LIVAF AIFMAIKLIN KLN[RK]KEEPA AAPAPTKEEV
LLTEI[RD]LLK EQNNR[SP]GGG SHHHHHH
```

(Glu, Phe, Lys, Thr) = 20% de la protéine - 3 paires uniques informations sur les thréonines connues

```
MGIIKE[FREF] AMRGNVVDLA VGVIIGAA[FG] KIVSSLVADI
IMPPLGLLIG GID[FKQ]FAVT LRDAQGDIPA VVMHYGV[FIQ]
NV[FDF]LIVAF AIFMAIKLIN KLN[RK]KEEPA AAPAPT[TK]EEV
LL[TE]IRDLLK EQNNR[SP]GGG SHHHHHH
```

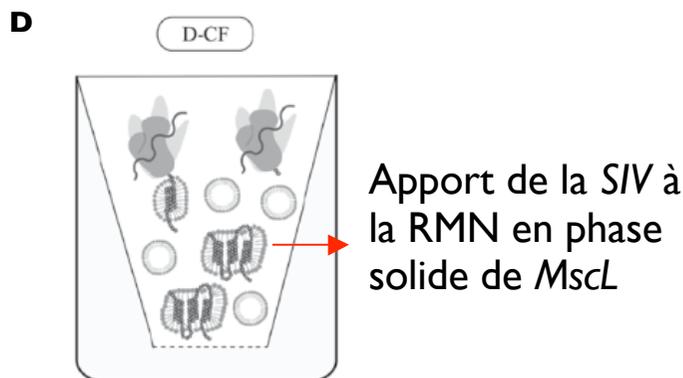


Résonance magnétique nucléaire en phase solide

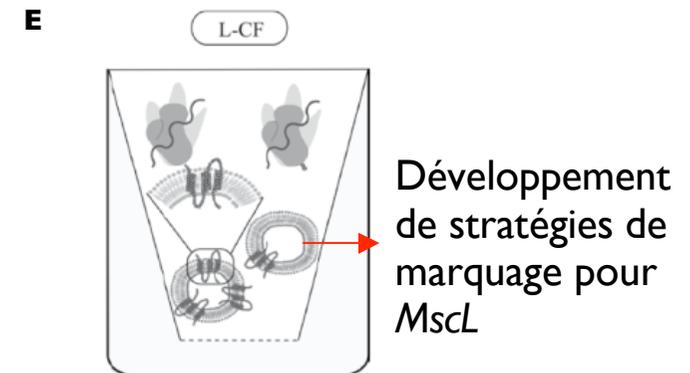


Synthèse *in vitro*

Développement et applications de protocoles de synthèse *in vitro* du canal mécanosensible bactérien à large conductance, pour son étude structurale par résonance magnétique nucléaire en phase solide



SIV en micelles de détergent



SIV en liposomes

Conclusion

Nécessité d'étudier *Ec-MscL* en bicouche lipidique : RMN en phase solide

Marquage uniforme de *Ec-MscL* :

- Difficulté d'obtention des informations structurales

Synthèse *in vitro* en échange continu :

- Taux d'expression élevé
- Purification simplifiée
- Synthèse directement en liposomes
- Efficacité du marquage sélectif

Marquage sélectif de *Ec-MscL* :

- Réduction du recouvrement sur les spectres 2D
- Stratégies pour faciliter le marquage et l'attribution

Davantage d'informations sont nécessaires pour l'attribution

Approches transposables à d'autres protéines

Perspectives

Effet de la température - composition lipidique - pH - force ionique

Établissement de protocoles pour la spectrométrie de masse

De nouveaux échantillons - marquage de résidus importants dans la fonction

Test des approches de prédiction de déplacement chimique sur des protéines modèles

Attribution de la protéine - résolution de la structure - mécanisme d'ouverture

Remerciements

Collaborations

Eric Guitet
Carine van-Heijenoort



Dror Warschawski



Alexandre Ghazi
Catherine Berrier



Kyu-Ho Park
Michiel Verhoeven

Catherine Etchebest



Daniel Lévy



MINISTÈRE DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE

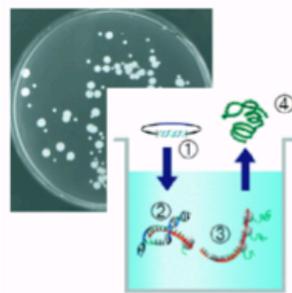


Remerciements

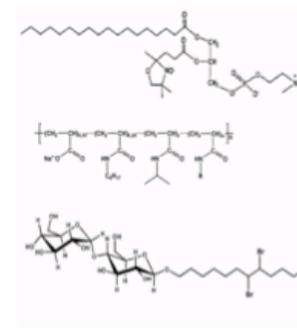
L'ensemble de l'UMR 7099

Emmanuelle Billon-Denis
Laurent Catoire
Paul-Emile Fauquet
Justine Fayet
Fabrice Giusti
Edith Godard
Oana Ilioaia
Audrey Le Bas
Christel Le Bon
Sandrine Masscheleyn
Bruno Miroux
Karine Moncoq
Milena Opacic
Daniel Picot
Noelya Planchard
Elodie Point
Jean-Luc Popot
Maya Salhi
Dror Warschawski
Francesca Zito
Manuela Zoonens

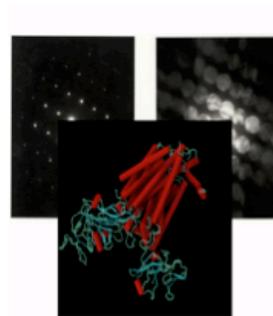
Expression *in vivo* et *in vitro*



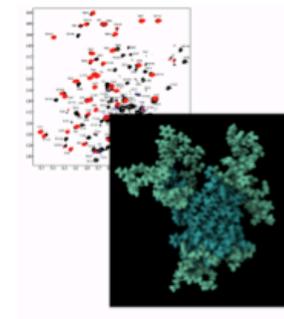
Chimie et biochimie des ligands et tensioactifs



Cristallographie des protéines membranaires



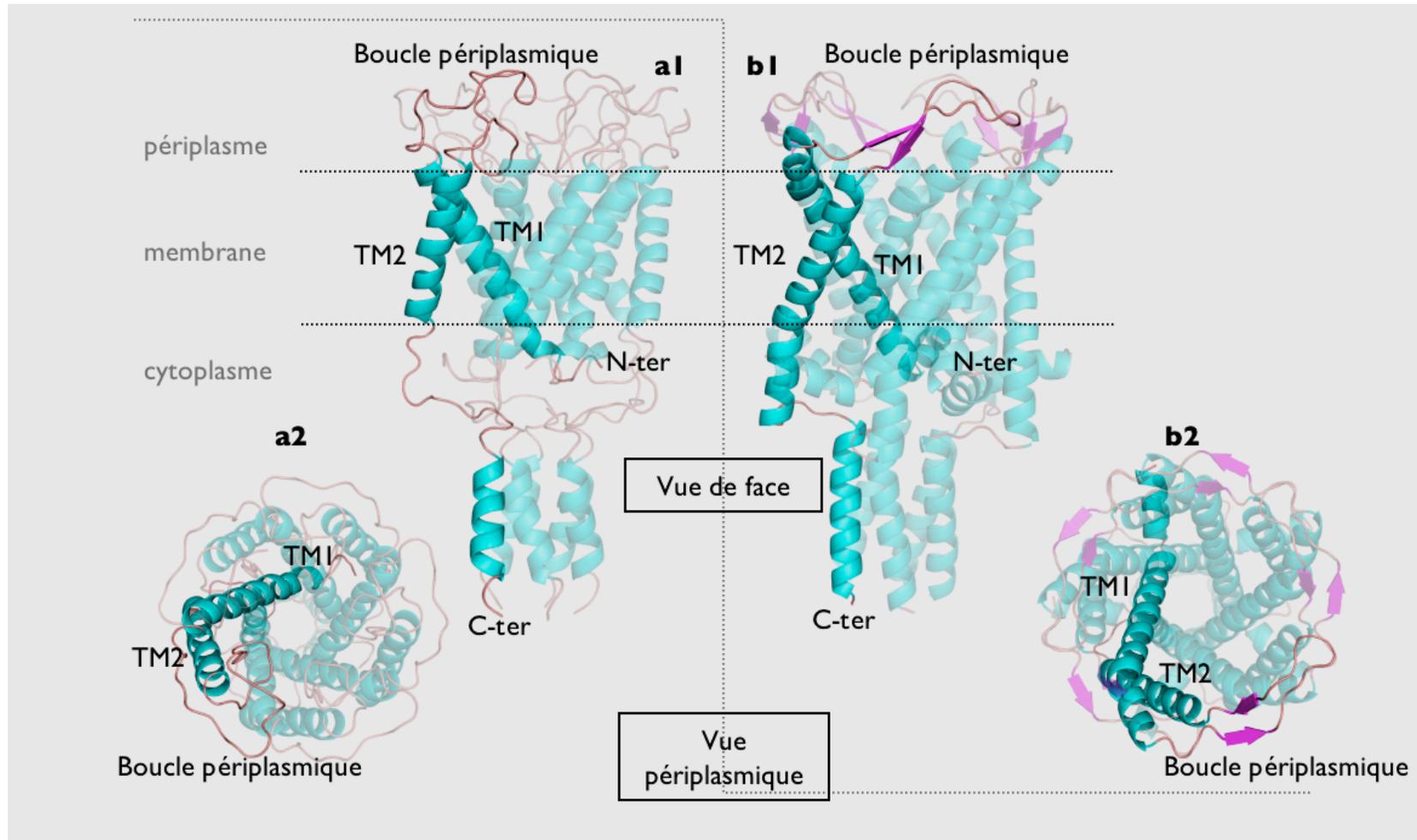
Structure et dynamique par RMN solide et liquide



Merci

Annexes

MscL de *Mycobacterium tuberculosis*



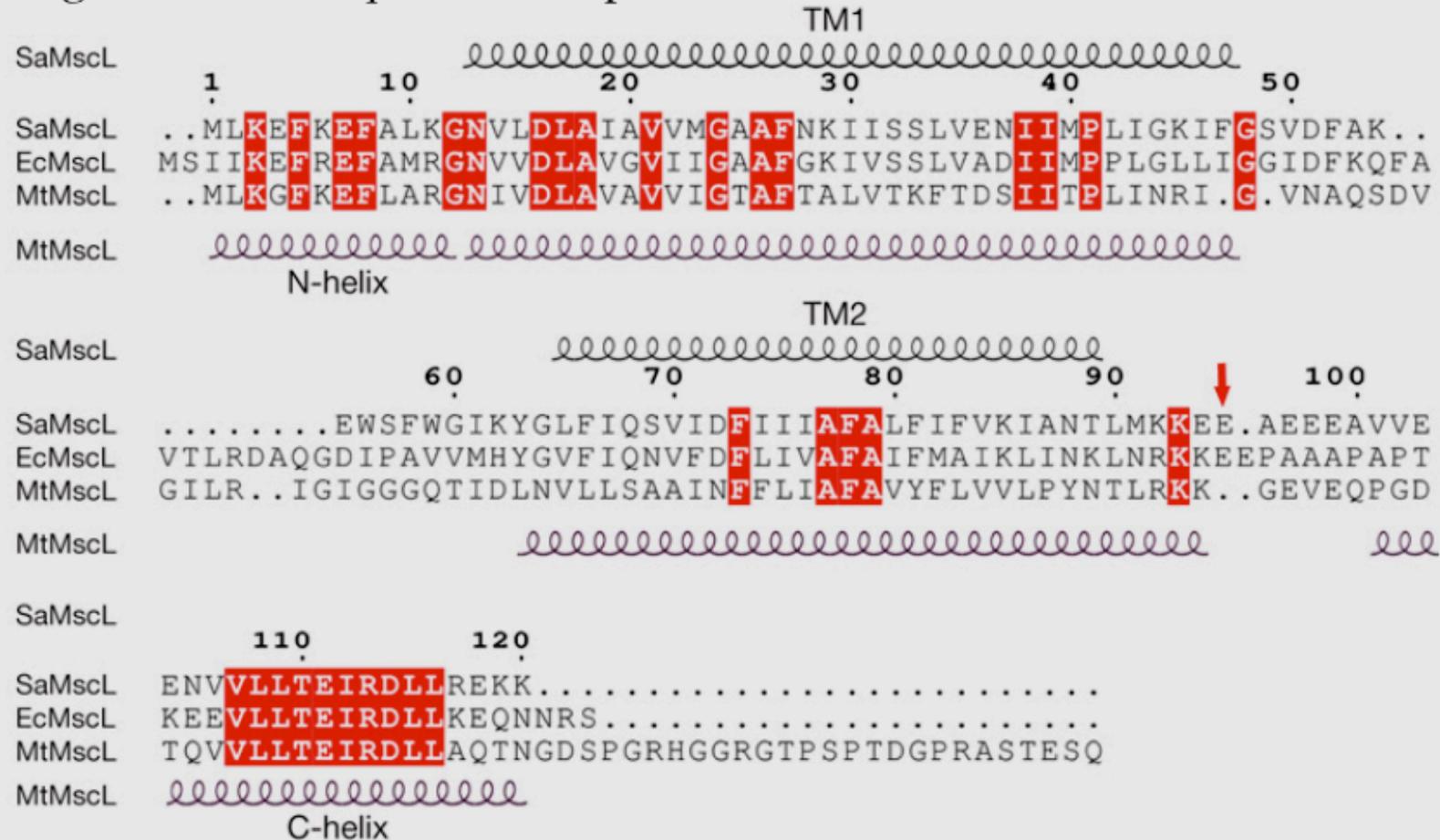
Structure de la protéine issue de *M. tuberculosis*^{5,6}

5 - Chang *et al.*, 1998; code PDB: 1msl

6 - Steinbacher *et al.*, 2007; code PDB: 2oar

Ec-MscL, *Mt-MscL* & *Sa-MscL*

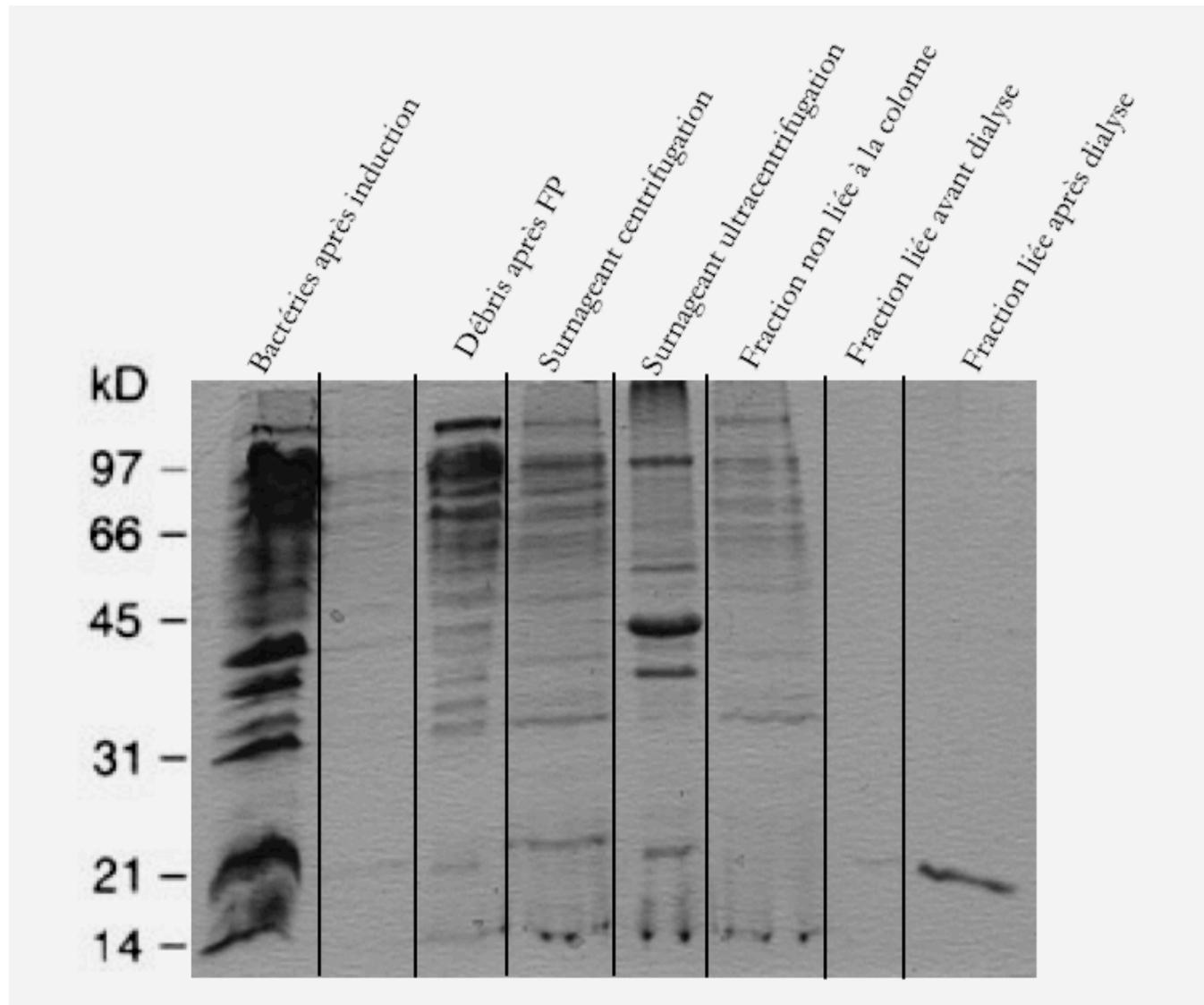
Alignement de séquences des protéines *Ec-MscL*, *Mt-MscL* et *Sa-MscL*



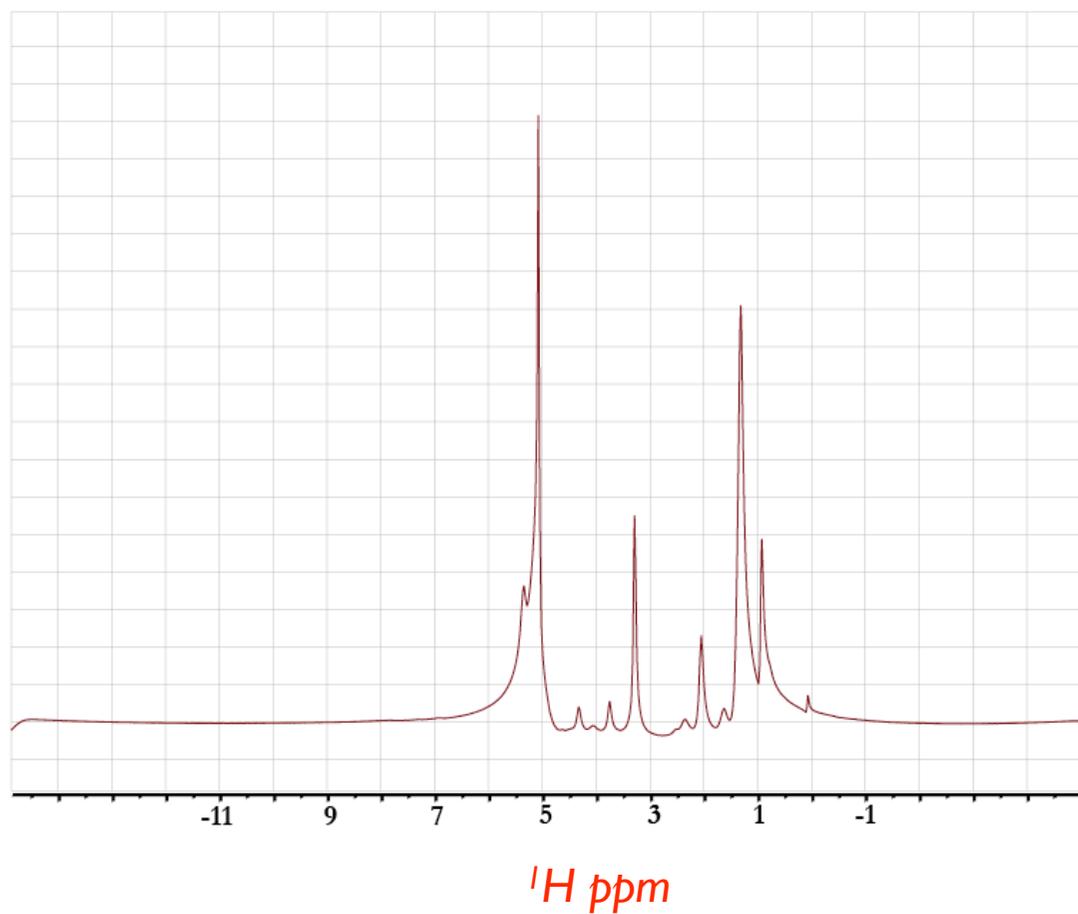
Poids moléculaire des échantillons synthétisés

Échantillon	Poids moléculaire	Atomes marqués	+ His-tag
$U\text{-}^{12}\text{C}, ^{14}\text{N}\text{-MscL}$	14 947		16 143
$(\text{Ile, Thr})\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-MscL}$	15 074	108 C - 19 N	16 270
$(\text{Asp, Gly, Leu, Ser})\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-MscL}$	15 116	136 C - 33 N	16 321
$(\text{Ala, Lys, Val, Tyr})\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-MscL}$	15 167	173 C - 47 N	16 363
$(\text{Ala, Gly, Lys, Val, Tyr})\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-MscL}$	15 194	191 C - 56 N	16 372
$(\text{Phe, Ile, Met, Pro, Arg})\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-MscL}$	15 285	277 C - 61 N	16 487
$U\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-MscL}$	15 813	688 C - 175 N	17 075

Gel SDS-PAGE - $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -u-Ec-MscL (BL21-DE3)



Spectre unidimensionnel $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -u-Ec-MscL



Spectres unidimensionnels ^{13}C , ^{15}N -u-*Ec*-MscL et ^{13}C , ^{15}N -(*Ile*, *Thr*)-*Ec*-MscL

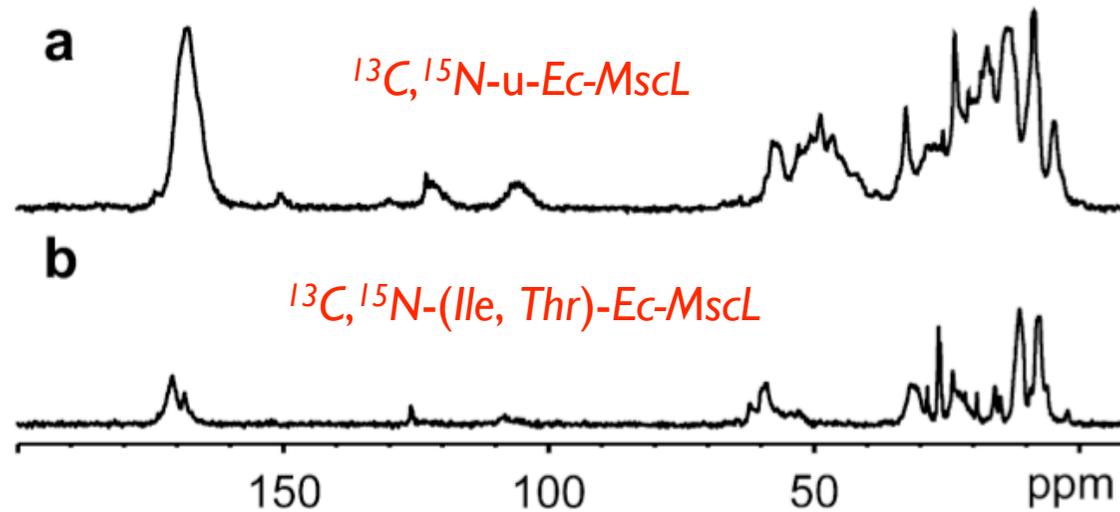
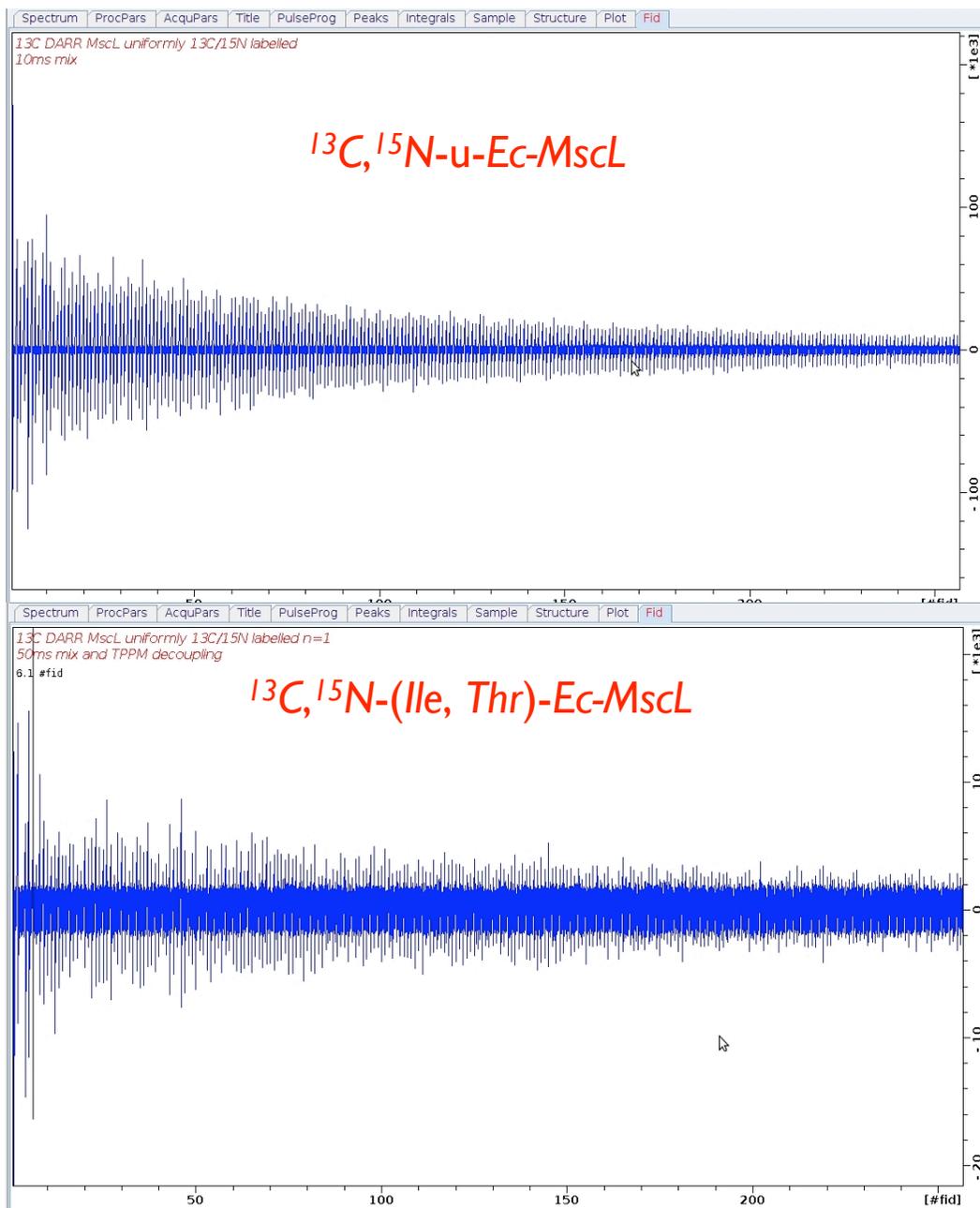
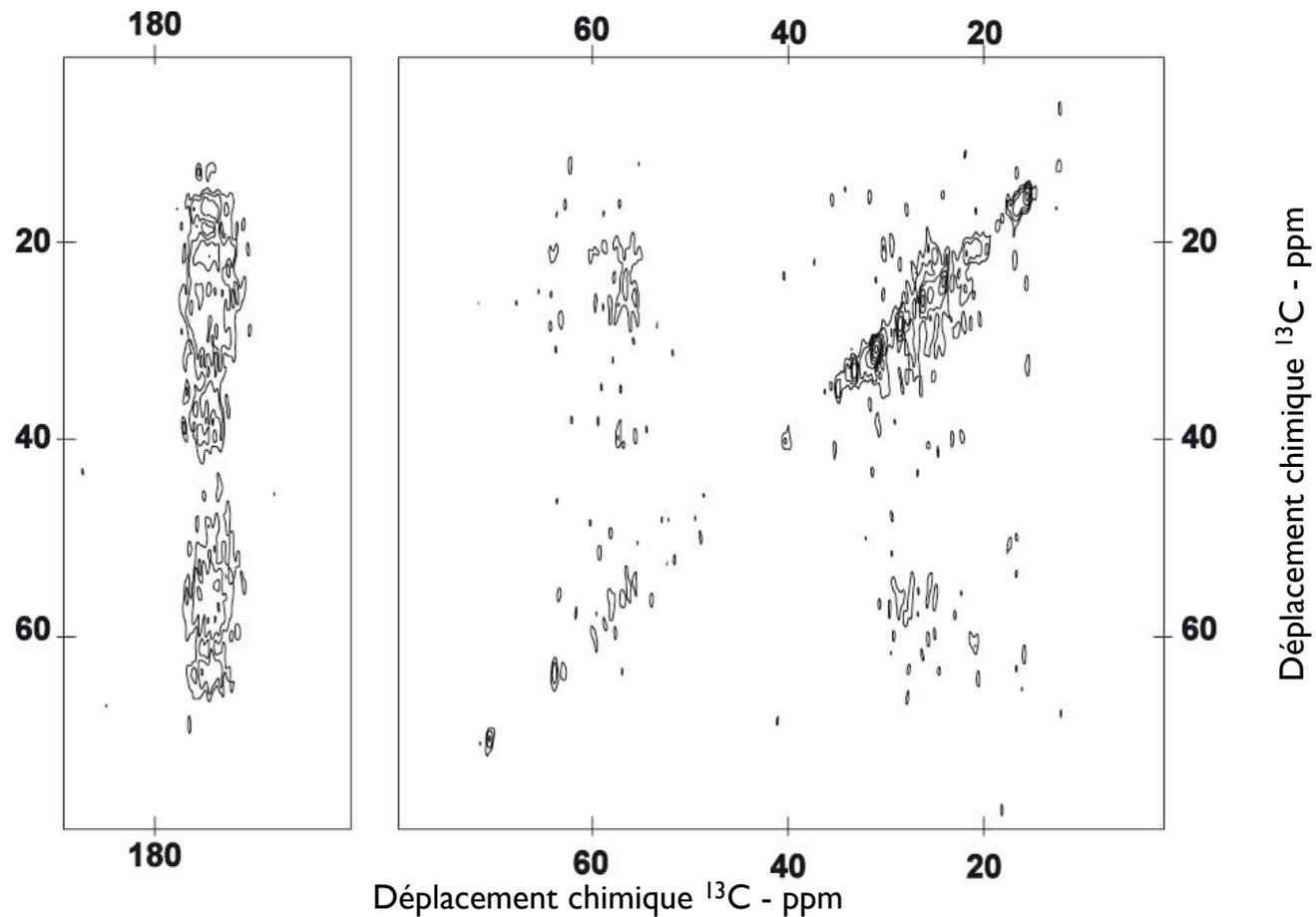


Fig. 1. 176 MHz 1D ^{13}C CP MAS NMR spectra of labeled MscL in unlabeled DOPC liposomes, spinning at 11,000 Hz and 258 K: (a) U- ^{13}C , ^{15}N labeled and (b) (*Ile*, *Thr*)- ^{13}C , ^{15}N labeled.

Spectres unidimensionnels ^{13}C , ^{15}N -u-Ec-MscL et ^{13}C , ^{15}N -(Ile, Thr)-Ec-MscL



Spectre bidimensionnel ^{13}C , ^{15}N -u-*Ec*-MscL



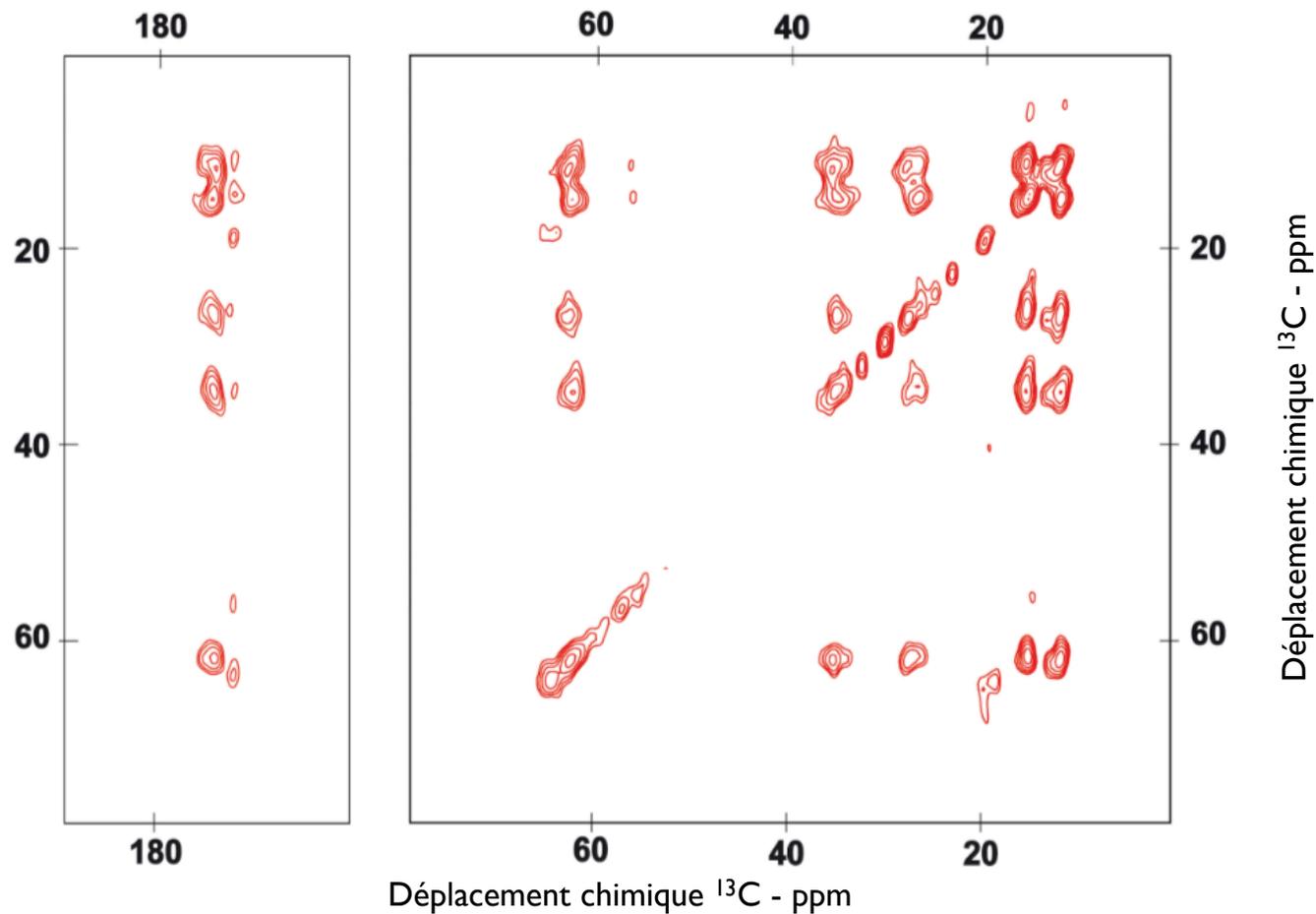
2D- ^{13}C - ^{13}C DARR

Temps d'acquisition 14 h

Température 248 K

Temps de mélange 500 ms

Spectre bidimensionnel $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -(Ile,Thr)-Ec-MscL



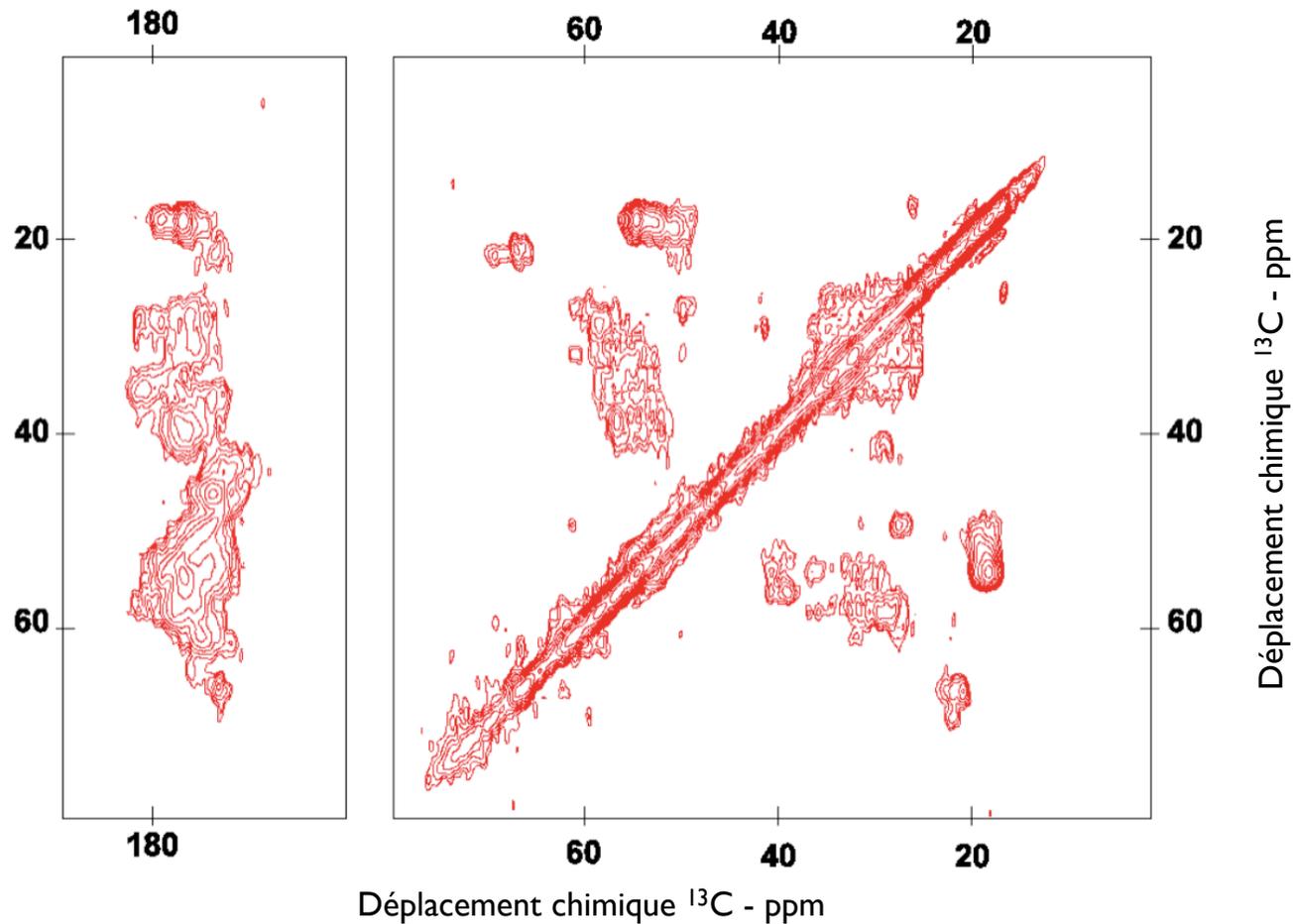
2D- ^{13}C - ^{13}C DARR

Temps d'acquisition 14 h

Température 248 K

Temps de mélange 500 ms

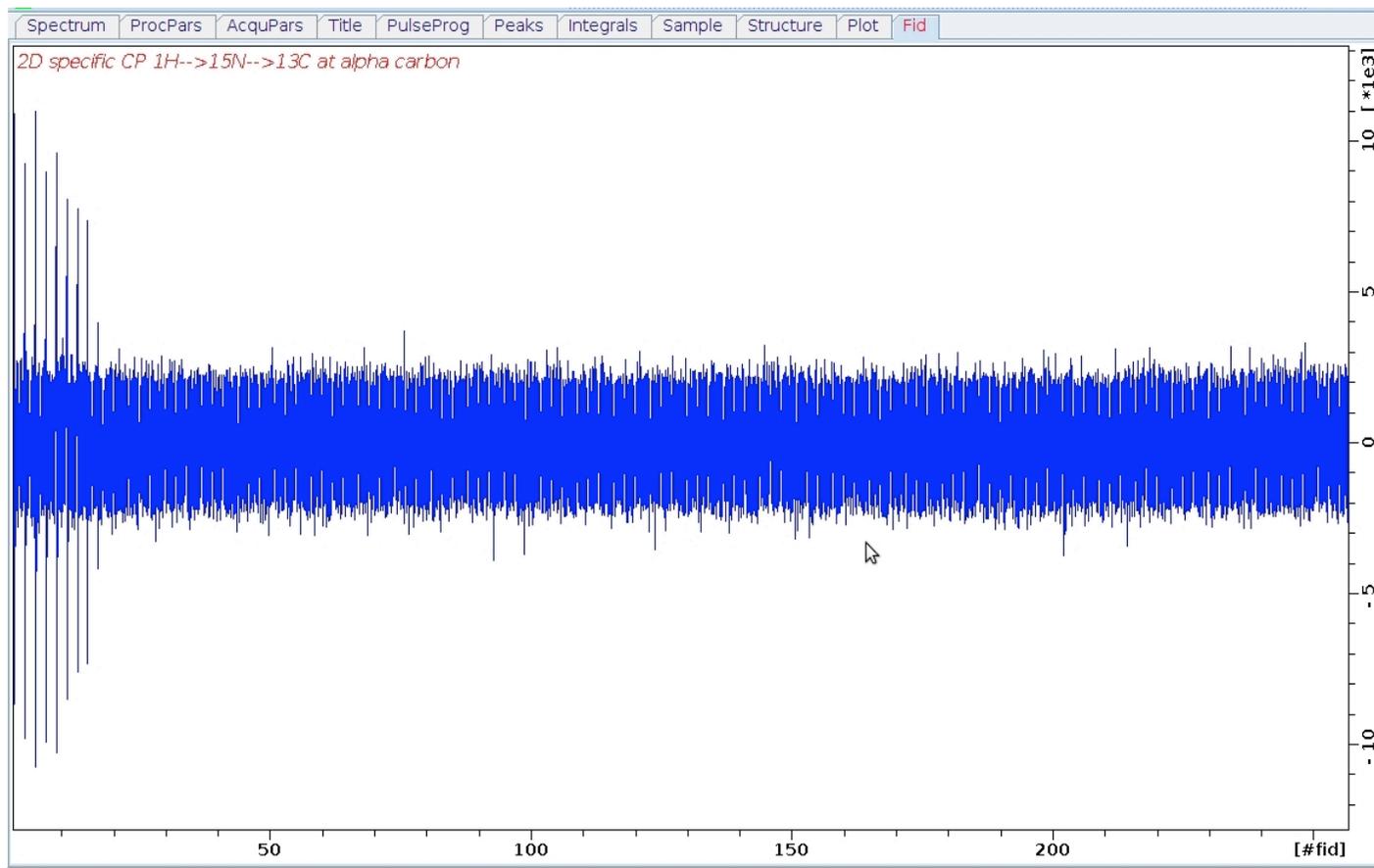
Spectre bidimensionnel ^{13}C , ^{15}N -uniforme-(-AFILVH)-Ec-MscL



2D- ^{13}C - ^{13}C DARR
Temps d'acquisition 56 h
Température 248 K
Temps de mélange 20 ms

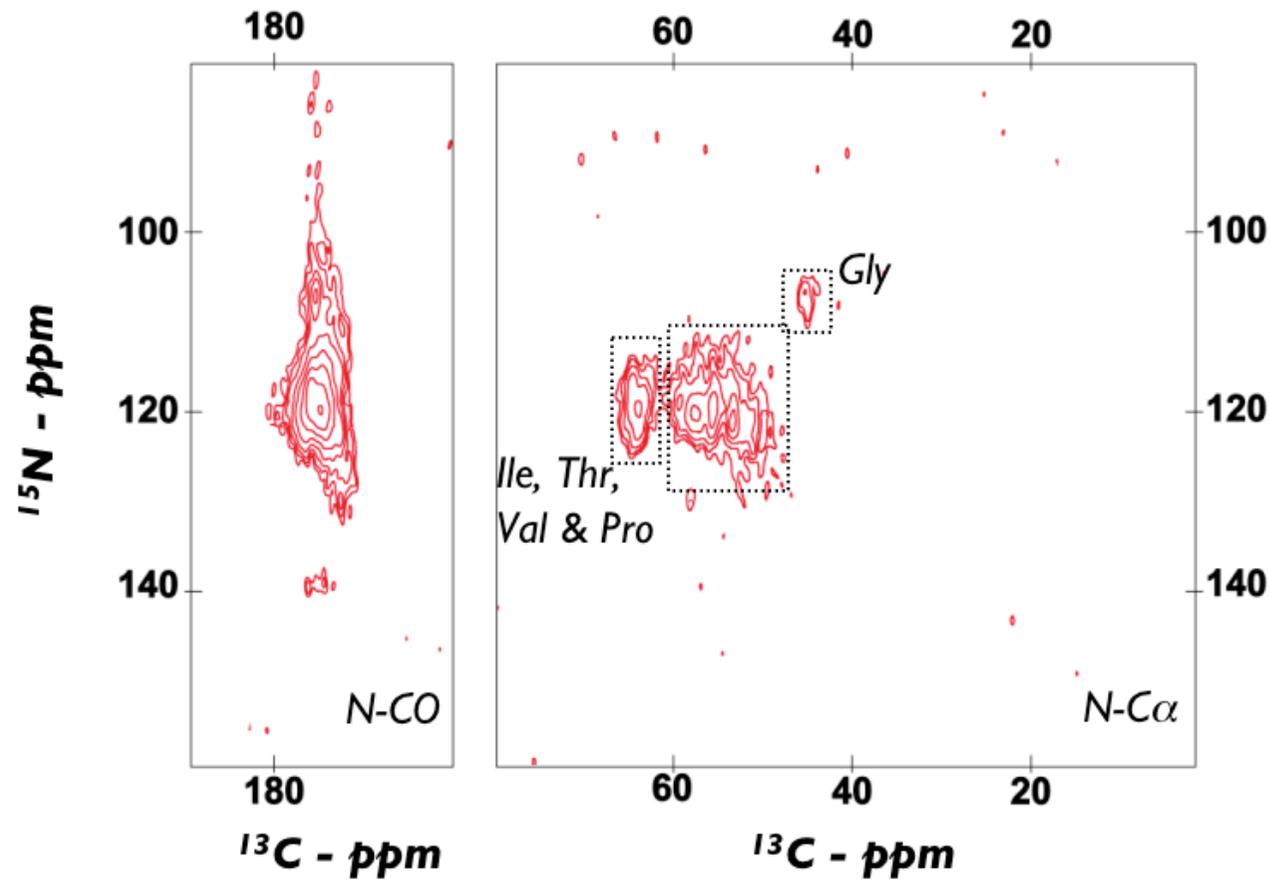
Surexpression en milieu minimum
 ^{13}C -glucose - ^{15}N H₄Cl
+ ^{12}C , ^{14}N -(Ala, Phe, Ile, Leu, Val, His)

Spectre bidimensionnel ^{15}N - ^{13}C sur ^{13}C , ^{15}N -u-Ec-MscL



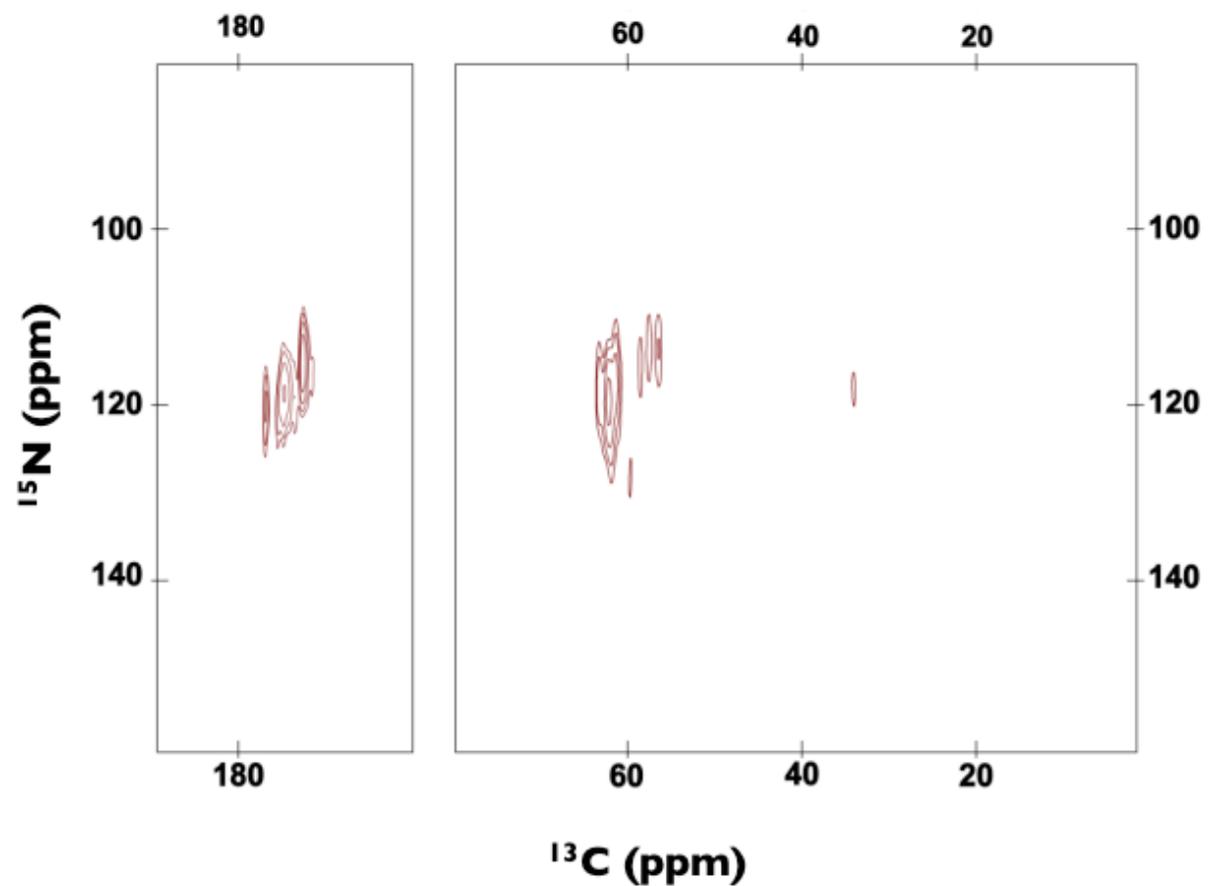
2D- ^{15}N - ^{13}C *specific-CP*
Temps d'acquisition 56 h
Température 248 K

Spectre bidimensionnel ^{15}N - ^{13}C sur ^{13}C , ^{15}N -u-Ec-MscL



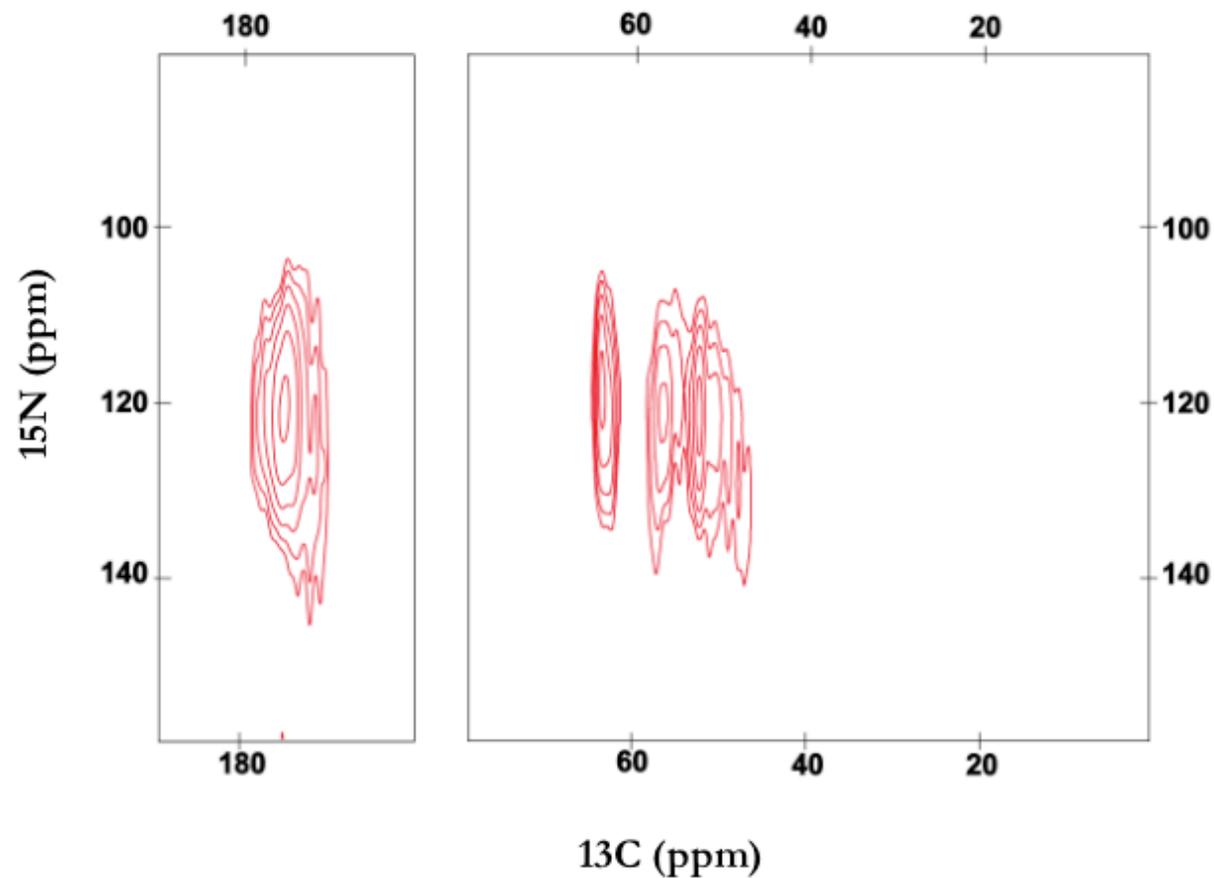
2D- ^{15}N - ^{13}C *specific-CP*
Temps d'acquisition 56 h
Température 248 K

Spectre bidimensionnel ^{15}N - ^{13}C sur ^{13}C , ^{15}N -(Ile,Thr)-Ec-MscL



2D- ^{15}N - ^{13}C *specific-CP*
Temps d'acquisition 56 h
Température 248 K

Spectre bidimensionnel ^{15}N - ^{13}C sur ^{13}C , ^{15}N -(Ala,Lys,Val,Tyr)-Ec-MscL

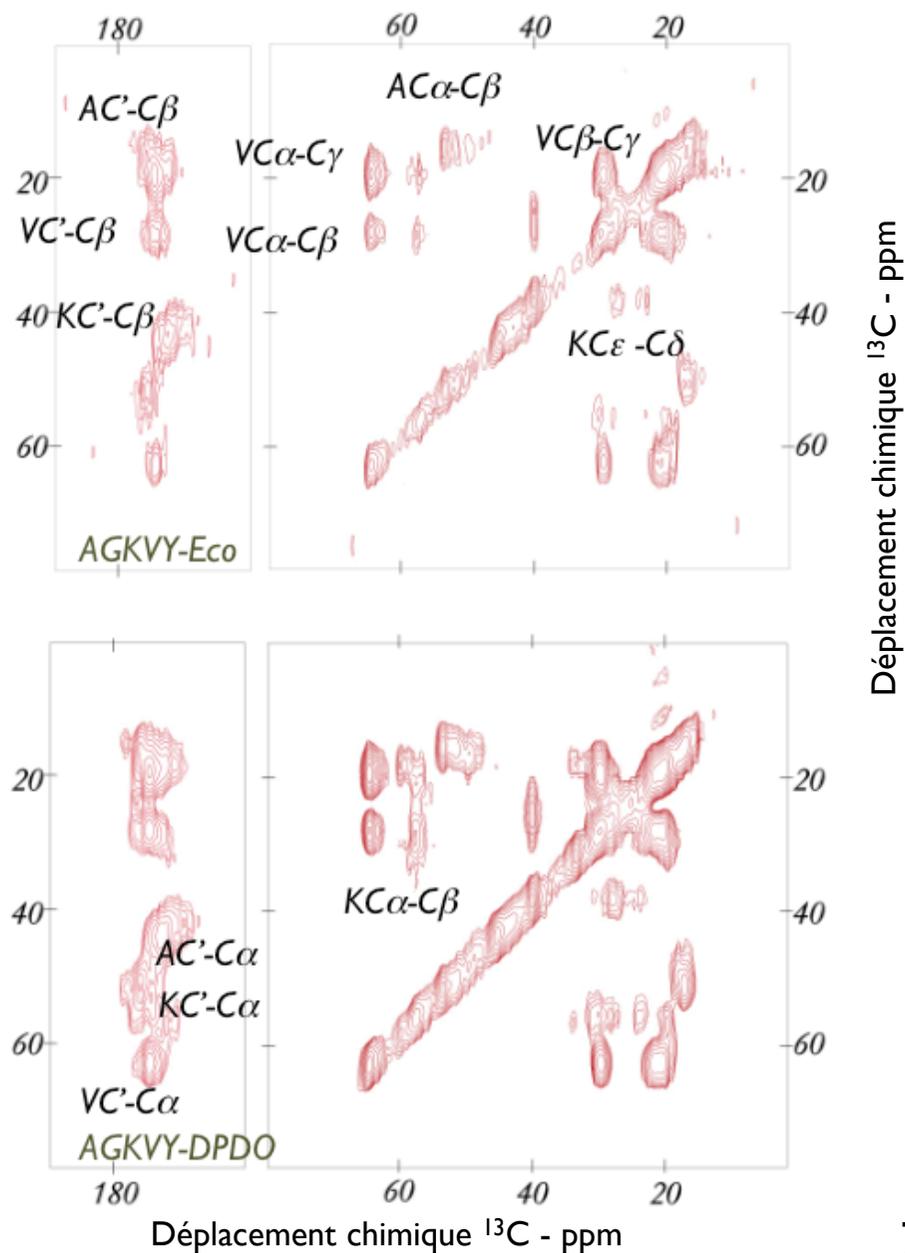


2D- ^{15}N - ^{13}C *specific-CP*
Temps d'acquisition 56 h
Température 248 K

Variation de la nature des lipides

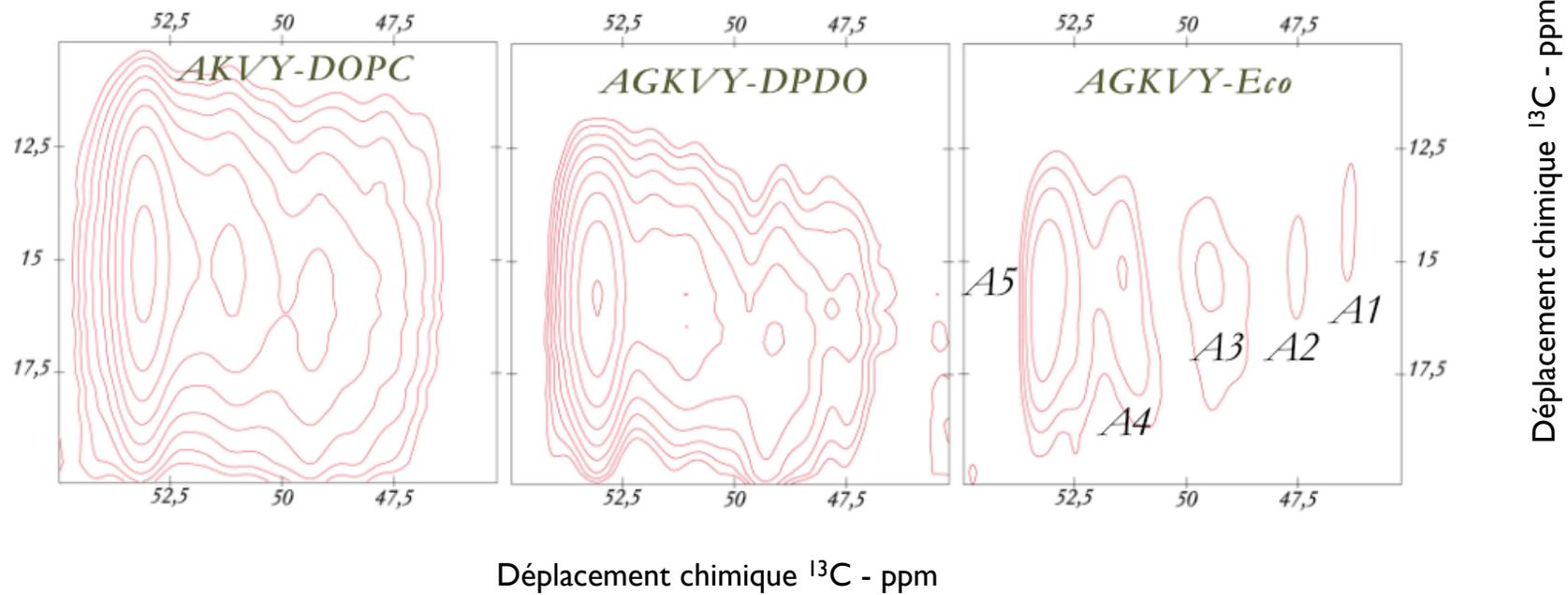
Spectres 2D obtenus sur un échantillon marqué au niveau des *Ala*, *Gly*, *Lys*, *Val* et *Tyr*.
Reconstitution en lipides d'*E. coli* -
ou dans un mélange *DOPC-DPPC*

2D- ^{13}C - ^{13}C DARR
Temps d'acquisition 14 h
Température 248 K

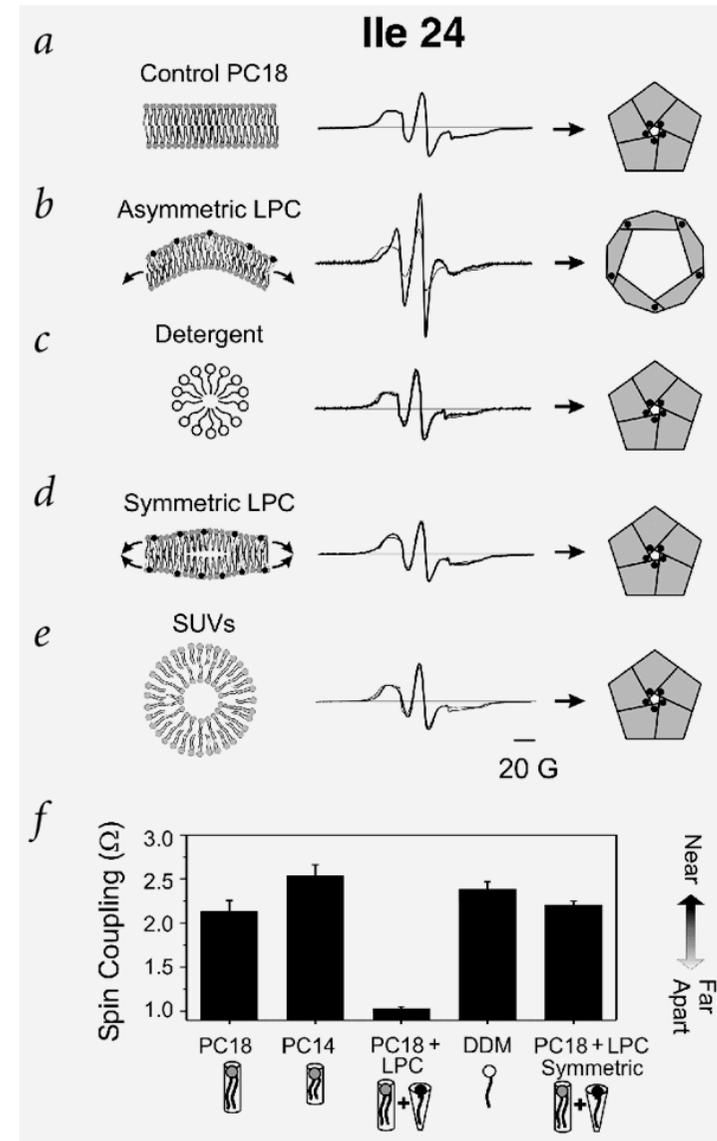
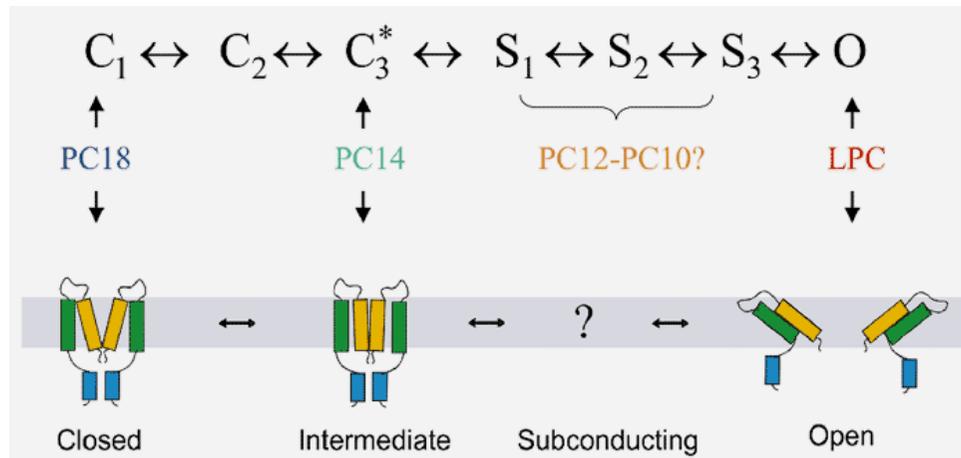


Variation de la nature des lipides

Comparaison des corrélations $C\alpha C\beta$ des *Ala* en fonction de la nature des lipides utilisé lors de la reconstitution

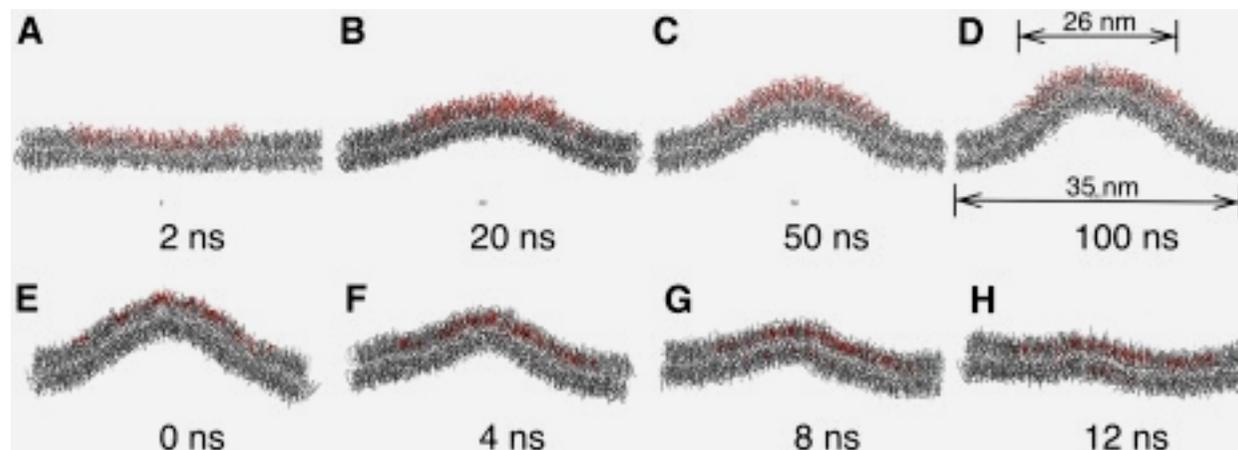


Rôle des lipides dans le mécanisme d'ouverture de *Ec*-MscL



Simulation de l'effet des lysophospholipides sur la bicouche

Comparaison de l'effet de la lysophosphocholine par rapport au cholestérol sur une bicouche préformée



Yoo & Cui, 2009

Métabolisme des acides aminés

