

**THÈSE** présentée par :

**Lucile GUYOT**

soutenue le : 28 janvier 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biotechnologie

**Évaluation de polymères amphiphiles pour  
l'extraction, la purification et la  
caractérisation de protéines membranaires  
d'intérêt thérapeutique**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr WAGNER Renaud**

Ingénieur de Recherche CNRS, UMR7242, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr ZOONENS Manuela**

Chargée de Recherches CNRS, UMR 7099, Paris

**Dr BANERES Jean-Louis**

Directeur de Recherches CNRS, UMR5247, Montpellier

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Dr GRUTTER Thomas**

Directeur de Recherches CNRS, UMR 7199, Strasbourg

**INVITÉS :**

**Dr BEY Gilbert**

Responsable de la valorisation et du développement technologique,  
NovAliX



# REMERCIEMENTS

Après ces tout juste 3 ans de thèse, je termine ces 3 mois d'écriture avec les tant attendus remerciements. J'espère avoir encore assez de neurones disponibles pour n'oublier personne ...

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Manuela Zoonens et Jean-Louis Banères d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail. Je suis certaine que les discussions que nous pourrons avoir seront très enrichissantes. Merci également à Jean-Louis, d'avoir participé, avec Isabelle Schalk, à mon comité de suivi de thèse. Vos remarques et conseils m'auront été bien utiles. Merci également à toi Manuela de m'avoir donné la possibilité de travailler avec les CyclAPols et pour ces discussions intéressantes. Je remercie aussi Thomas Grutter d'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur interne.

Un immense merci à Renaud, pour ta disponibilité de tous les instants, pour ta bonne humeur et ton éternel optimisme. Merci pour tes conseils et pour la confiance que tu m'as accordé pour ce projet et plus généralement au laboratoire. J'espère que tous les chefs que j'aurais dans mes prochains emplois seront à ton image. On avait convenu à mon arrivée que je sois le témoin de l'évolution de ta mémoire (in)faillible, et je dois t'avouer que le bilan n'est pas très bon... Mais il est encore temps de travailler un peu moins sur A<sub>2</sub>A et un peu plus sur le D2DR !

Je remercie chaleureusement tous mes collègues de NovAliX pour leur accueil. En particulier, merci à Denis Zeyer d'avoir permis à ce projet d'exister et d'avoir suivi autant que possible ce travail. Merci également à Xavier Espanel. Un remerciement tout particulier va à Gilbert Bey, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. J'ai également une pensée reconnaissante pour mes collègues sans qui ce travail n'aurait certainement pas la même allure ! Merci à Gautier d'avoir coulé les fondations du projet TRPV4, à Heddy pour ton temps, tes explications et ton aide pour la microscopie électronique et à Henry et l'équipe SPR, Louis et Christina, d'avoir trouvé des disponibilités pour passer mes échantillons malgré un emploi du temps plus que rempli. Merci pour vos explications. Le monde de la biophysique et de la biologie structurale est un peu moins flou à mes yeux grâce à vous tous. Je remercie également les équipes de chimistes de NovAliX et en particulier Nathalie Trouche et Steffen Weidner d'avoir consacré du temps à la préparation des SMA si cruciaux pour ce projet.

Pendant ces 3 années, j'ai eu la chance de discuter avec divers collaborateurs ce qui a permis d'enrichir mes connaissances. Merci à Sarah Cianférani du LSMBO et de ses équipes, Evolène et Jérôme, j'ai apprécié travailler avec vous - même si ce petit TRPV s'est montré bien récalcitrant ! Merci également à Claire Demesmay et Vincent Dugas, de l'ISA, pour ces discussions sur la nano-WAC. Cette fois, ce sont les SMA qui se sont malheureusement montrés récalcitrants...

Merci à Georges Orfanoudakis de m'avoir fait confiance pour reprendre les travaux pratiques de Bioproduction à l'ESBS. Encore merci à Renaud, avec qui j'ai partagé cet enseignement, de m'avoir fait pleinement confiance pour gérer seule des groupes d'étudiants. Un grand merci à l'équipe de EASE, Constance Perrot, Mahboubi Harkat et Manon Schuh pour leur accueil et leurs conseils. Un merci tout particulier à toi Manon, de m'avoir fait découvrir un pan de la Bioproduction qui m'était jusqu'alors étranger. Les TPs ne se seraient pas si bien déroulés sans ton aide et ton expertise. J'ai énormément apprécié d'évoluer dans ce milieu particulier et pouvoir transmettre ma petite expertise à des étudiants.

Un très grand merci à tous les membres passés et actuels du bureau D327 et la plateforme IMPReSs, Valérie, Gabrielle, Lina, Lucie, Stan, Dorothée et tous les autres, cette thèse n'aurait pas été pareille sans l'énergie qui émane du bout du couloir. Lina, je sais qu'avec Renaud vous attendiez au moins 1 page chacun mais même une page ne serait pas suffisante pour te dire tout ce que j'ai sur le cœur. Merci pour tout, pour ton aide de tous les instants, pour ton soutien, pour ces « ah mais je t'ai pas raconté », pour les messages envoyés alors que nous étions toutes les deux dans le bureau (pour ne pas déranger Gabrielle et Valérie – j'espère que votre calme et votre discréction n'auront pas trop été dérangés par mes éclats de rires), pour les multiples déménagements de bureau et de labos, pour ces moments partagés au GDR sans voir la lumière du jour, j'en passe et des meilleurs. Merci également aux stagiaires que j'ai pu encadrer pour leur travail et en particulier à Alizée.

Je remercie également toute l'équipe « RCPG, Douleur et Inflammation » pour votre écoute en labmeeting et votre aide au besoin. Un grand merci aux « RCPG addicts » qui êtes devenues, vous le savez, bien plus que de simples collègues. Juliette, je te remercie surtout parce que mes plantes sont retenues en otage dans ton bureau depuis le début de ma rédaction, bon aussi parce que tu as été une très belle rencontre. Tes robes fleuries (même en hiver) et tes peintures colorées auront égayées le 3<sup>ème</sup>. Rosine, tu m'auras transmis ta passion pour la couture et mon compte

bancaire et mes placards ne te remercient pas. Manon, tes bananes noires et ta malchance caractérisée (le Riveétoile en porte les traces ...) m'auront beaucoup fait rire. Cloé, toi aussi tu es devenue une addicte de la couture, je ne comprends d'ailleurs toujours pas où tu trouves le temps pour coudre tous les tissus que tu achètes ... Vous aurez largement contribué à rendre ces 3 années très agréable, j'attends avec impatience les prochaines sorties champignons, les soirées raclettes ou les après-midi jeux. Je suis certaine que mes « y » finiront par vous manquer. Les groupes de discussion « les reines du shopping en ligne », « la couture pour les nuls » ou « RCPG addicts » ont encore de beaux jours devant eux. Un grand merci à Steph, pièce rapportée de ce petit groupe, pour cette magnifique couverture. Toute ressemblance avec des personnages existants dans la réalité n'est pas fortuite.

Merci également aux membres de l'UMR 7242 et plus particulièrement au comité des fêtes et à tous les docs et posts, pour les WIP, les soirées pour la terrasse du 4<sup>ème</sup>, les vins chauds de dernière minute en extérieur ou encore les tournois de Mölky, entre deux confinements et autres interdits. Une pensée particulière pour toi Marion, j'attendais ma photo d'Emilien Jacquelin (qui gagne quasiment au même moment où j'écris ses mots), mais bon, on ira au Grand-Bo ensemble l'année prochaine !

Une pensée pour les copains et copines, toujours précieux dans les moments plus compliqués ; les copines de l'ESBS, Camcam, Toto, Alice, Anaïs, Albi, Solange et Mathilde, la team Strasbourgeoise Toto (encore) et Anto et les copains Bourguignons, Camoune, Bas et Mél, Clément et Sarah ; mon retour définitif dans la plus belle région de France sera peut-être encore retardé mais ça arrivera bientôt.

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille, mes parents et grands-parents, mes sœurs, mais aussi mes tantes et oncles et cousins/cousines. Merci de votre soutien et de faire semblant de comprendre ce sur quoi je travaille. Je serais curieuse de savoir comment vous expliquer tout ça à vos collègues et amis ! Et enfin, merci à toi Amaury, de me supporter depuis toutes ces années et surtout ces derniers temps, je crois que je n'ai pas été très facile à vivre mais je me rattraperai ! Tu me dis en ce moment même que je pourrais quand même remercier les beagles et Oasis, je finirai donc là-dessus en espérant n'avoir oublié personne.





A ma mamie,  
Pour qui j'étais « chercheuse contre le cancer » alors même que je n'étais qu'en  
stage d'école d'ingénieur.  
Je pense fort à papy et toi.

## Préface

Les protéines membranaires (PMs) sont des constituants essentiels de toutes les cellules vivantes. Localisées à l'interface entre le cytosol et le milieu extracellulaire, elles sont la porte d'entrée des cellules et elles constituent des intermédiaires cruciaux dans la transmission des signaux. Ainsi, elles sont impliquées dans des processus biologiques clés et dans un large panel de dysfonctionnements associés. Elles représentent donc des voies thérapeutiques de choix, avec plus de 60% des médicaments actuellement sur le marché ciblant ces PMs.

Deux familles de protéines membranaires présentent un intérêt particulier. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de protéines membranaires, avec plus de 800 membres identifiés chez l'Homme. Les RCPG sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme, où ils sont activés par des ligands très variés. Ils constituent donc une cible thérapeutique majeure, comme en témoigne le large nombre de médicaments sur le marché agissant sur cette classe de protéines. Les canaux ioniques représentent également une large famille de protéines membranaires, avec plus de 300 membres. Ils sont exprimés dans tous les tissus et tous les types de cellules et ils ont des fonctions physiologiques variées. Les canaux ioniques constituent ainsi la 2<sup>ème</sup> cible des médicaments après les RCPG.

La compréhension de la structure atomique et du fonctionnement à l'échelle moléculaire de ces protéines revêt donc un intérêt scientifique majeur, à la fois sur le plan fondamental mais aussi médical. L'obtention de telles données est cependant fortement ralentie par de nombreuses difficultés expérimentales inhérentes à la nature de ces protéines et à la nécessité de les maintenir dans un environnement hydrophobe. En particulier, les étapes d'extraction, de purification et de maintien des PMs en solution font traditionnellement intervenir des molécules amphiphiles de type détergent dont le choix est critique pour allier capacité d'extraction, stabilité des protéines et compatibilité avec les méthodes d'analyses structurales et fonctionnelles. Le développement récent de polymères amphiphiles capables d'isoler des nanoparticules lipidiques directement à partir de membranes biologiques présente une alternative particulièrement attrayante à l'utilisation de détergents pour l'étude de protéines membranaires en solution. Ce travail de thèse a précisément pour objectif d'évaluer l'efficacité de ces polymères et la qualité des particules générées à partir d'échantillons modèles étudiés au laboratoire.

# TABLE DES MATIERES

Préface .....	1
ABREVIATIONS .....	6
TABLE DES FIGURES .....	9
TABLE DES TABLEAUX .....	11
INTRODUCTION .....	13
1. Les protéines membranaires intégrales comme cible privilégiée des médicaments .....	14
1.1. Généralités .....	14
1.2. Les RCPG, cible n°1 des médicaments .....	15
1.2.1. Généralités.....	15
1.2.2. Généralités structurales.....	15
1.2.3. Classification .....	16
1.2.4. Mécanisme d'activation des RCPG .....	19
1.2.5. <i>Importance thérapeutique</i> .....	21
1.3. Les canaux ioniques .....	23
1.3.1. Généralités.....	23
1.3.2. Membrane et potentiel de repos.....	24
1.3.3. Les canaux voltage-dépendants .....	25
1.3.4. Les canaux ligand-dépendants .....	29
1.3.5. <i>Intérêt thérapeutique des canaux ioniques</i> .....	33
2. L'intérêt de l'étude des PMs en solution .....	36
2.1. La recherche pharmaceutique sur les PMs.....	36
2.1.1. <i>Le processus de découverte de médicament</i> .....	36
2.1.2. <i>Les techniques de criblage des molécules</i> .....	38
2.2. L'étude des PMs par des méthodes biophysiques .....	45
2.3. Les études structurales.....	47
2.3.1. <i>La cristallographie et les méthodes pour stabiliser les protéines</i> .....	47
2.3.2. <i>L'essor de la cryo-microscopie électronique</i> .....	49
2.3.3. <i>Les autres techniques</i> .....	51
2.4. Les études d'interaction .....	53
3. Les systèmes mimétiques de membranes pour l'étude des PMs .....	57
3.1. Les détergents comme composés mimétiques de la membrane .....	57
3.1.1. <i>Une méthode plébiscitée depuis de nombreuses années</i> .....	57

3.1.2. ... mais qui a des limites .....	58
3.2. Le développement d'approches « native-like » .....	59
3.2.1. Les vésicules <i>lipidiques</i> ( <i>liposomes</i> ).....	59
3.2.2. Les bicelles.....	61
3.2.3. Les <i>amphipols</i> (APols) .....	63
3.2.4. Les <i>nanodisques</i> .....	67
3.2.5. Les copolymères de styrène et acide maléique.....	71
3.2.6. Les méthodologies plus récentes .....	73
<b>4. L'utilisation de copolymères SMA et dérivés pour l'étude de PMs .....</b>	<b>77</b>
4.1. Le panel de SMA et polymères dérivés décrits.....	77
4.2. Complexes protéine/SMA et les études fonctionnelles associées.....	79
4.2.1. <i>Les informations disponibles avant 2019</i> .....	79
4.2.2. <i>Les études parues après 2019</i> .....	82
4.3. Études structurales des SMALPs .....	85
4.3.1. <i>L'état de l'art avant le commencement du projet</i> .....	85
4.3.2. <i>Depuis 2019</i> .....	85
<b>5. Présentation du projet .....</b>	<b>88</b>
5.1. En quelques mots.....	88
5.2. La levure <i>Pichia pastoris</i> comme système d'expression.....	88
5.3. Les protéines modèles .....	89
5.3.1. <i>Le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A</i> .....	89
5.3.2. <i>Le canal calcique TRPV4</i> .....	94
5.4. La stratégie mise en œuvre .....	97
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>101</b>
<b>1. Préparation des protéines membranaires .....</b>	<b>102</b>
1.1. Expression des PMs dans la levure <i>Pichia pastoris</i> .....	102
1.2. Préparation des membranes totales de levures de <i>Pichia pastoris</i> .....	103
1.3. Extraction et purification des protéines à l'aide de détergents .....	104
1.3.1. <i>Ciblage de détergents</i> .....	104
1.3.2. <i>Solubilisation</i> .....	104
1.3.3. <i>Chromatographie d'affinité sur nickel</i> .....	105
1.3.4. <i>Chromatographie d'exclusion stérique</i> .....	106
1.4. Extraction et purification des protéines à l'aide de polymères amphiphiles .....	106
1.4.1. <i>Préparation des polymères</i> .....	106
1.4.2. <i>Ciblage des polymères</i> .....	106
1.4.3. <i>Solubilisation par les SMA</i> .....	107
1.4.4. <i>Solubilisation par le CyclAPol C6-C2-50</i> .....	108
1.4.5. <i>Chromatographie d'affinité sur nickel (IMAC)</i> .....	108
1.4.6. <i>Chromatographie d'affinité sur résine anti-flag</i> .....	108

1.4.7. Séparation sur gradient de glycérol.....	109
1.4.8. Dialyse et concentration des échantillons.....	109
<b>2. Analyses biochimiques.....</b>	<b>110</b>
2.1. Dosage protéique/Quantification des protéines .....	110
2.2. Electrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et immunodétection	110
2.3. Test de liaison de radioligand (récepteur A <sub>2</sub> A) .....	112
2.3.1. Courbes de saturation.....	112
2.3.2. Courbes de déplacement .....	113
<b>3. Analyses biophysiques.....</b>	<b>114</b>
3.1. Microscopie électronique à transmission .....	114
3.1.1. Coloration négative .....	114
3.1.2. Cryo-microscopie .....	114
3.2. Résonance plasmonique de surface.....	115
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>117</b>
<b>1. Purification du récepteur A<sub>2</sub>A par des polymères amphiphiles et caractérisation par des études de liaison ligand/récepteur.....</b>	<b>119</b>
1.1. Constructions recombinantes du récepteur et clonage dans la levure.....	119
1.2. Production et préparations membranaires de levures .....	121
1.3. Purification en détergent.....	121
1.3.1. Caractérisation de l'activité du récepteur par radiobinding (courbes de saturation).....	125
1.4. Mise au point d'un protocole de purification à partir de polymères amphiphiles sur le récepteur à l'adénosine A <sub>2</sub> A.....	127
1.4.1. Criblage de différents polymères .....	127
1.4.2. Solubilisation et purification en SMA 2000 et SMA 3000.....	131
1.4.3. Détermination de la concentration des fractions de SMALPs purifiées.....	135
1.4.4. Test de saturation par radiobinding.....	137
1.4.5. Solubilisation et purification par le CyclAPol C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -50 .....	139
1.5. Caractérisation fonctionnelle des SMALPs-A <sub>2</sub> A .....	143
1.5.1. Étude de la stabilité de la liaison dans le temps.....	143
1.5.2. Caractérisation pharmacologique par des tests de compétition.....	145
1.5.3. Étude par résonance plasmonique de surface.....	147
<b>2. Études structurales du canal TRPV4 purifié par des polymères amphiphiles</b>	<b>151</b>
2.1. Constructions recombinantes du récepteur et clonage dans la levure.....	151
2.2. Production et préparations membranaires de levures .....	151
2.3. Purification en détergent.....	153
2.3.1. Criblage de détergents.....	153
2.3.2. Solubilisation et purification en détergent.....	153

2.3.3. Caractérisation structurale par microscopie électronique .....	159
2.4. Purification en polymères amphiphiles .....	161
2.4.1. Criblage de polymères.....	161
2.4.2. Purification par le SMA 2000.....	161
2.5. Analyse des SMALPs-TRPV4 par microscopie électronique.....	165
<b>3. Discussion générale des résultats et perspectives.....</b>	<b>166</b>
3.1.1. Purification des protéines par des détergents .....	166
3.1.2. Criblage et purification par des polymères amphiphiles .....	168
3.1.3. Caractérisations fonctionnelle et structurale des particules purifiées.....	171
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>175</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>177</b>
Publication 1. ....	179
Publication 2. ....	181
Publication 3. ....	183
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>184</b>

# ABREVIATIONS

- β1AR /β2AR** : récepteur bêta 1/2 adrénnergique
- μOR** : récepteur mu aux opioïdes
- 5-HT<sub>3</sub>** : 5-hydroxytryptamine
- AA** : acide aminé
- A<sub>2</sub>A** : récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A
- AASTY** : copolymère de styrène et d'acide acrylique
- Ach** : acétylcholine
- ADMETox** : étude d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité
- AGRG3** : récepteur couplé aux protéines G d'adhésion G3
- ApoA-1** : apolipoprotéine A1
- APols** : amphipols
- ASIC1** : Acid-sensing ion channel 1
- ATD** : domaine amino-terminal
- AUC** : ultracentrifugation analytique
- BCA** : bicinchoninic acid assay
- BLT2** : récepteur 2 au leukotriène B<sub>4</sub>
- BMGY** : milieu riche à base de glycérol
- BMMY** : milieu riche à base de méthanol
- BPCO** : bronchopneumopathie chronique obstructive
- BRET** : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*
- BRIL** : apocytochrome b<sub>562</sub>RIL
- CADD** : découverte de médicaments assistée par ordinateur (*computer-aided drug discovery*)
- CB1** : récepteur cannabinoïde 1
- CD** : dichroïsme circulaire
- CFTR** : *cystic fibrosis conductance regulator*
- CHS** : cholesteryl hemisuccinate
- CMC** : concentration micellaire critique
- CNG/HCN** : canaux régulés par les nucléosides
- Cryo-EM** : cryo-microscopie électronique
- CTD** : domaine carboxy-terminal
- C-ter** : extrémité C-terminale
- CV** : volume de colonne (column volume)
- CXCR1** : récepteur à la chimiokine 1
- D1DR/D2DR** : récepteur à la dopamine D1/D2
- DDM** : N-Dodecyl-β-D-Maltoside
- DEER** : *double electron-electron resonance*
- DLS** : diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*)
- DMPC** : dimyristoylphosphatidylcholine
- DMSO** : DiMéthylSulfOxyde
- DPCPX** : Dipropylcyclopentylxanthine
- DSF** : *differential scanning fluorimetry*
- DTT** : Dithiothréitol
- EDTA** : Acide EthylèneDiamineTétraAcétique

**EPR** : résonance paramagnétique électrique  
**ESI** : ionisation par électronébulisateur (*electron spray ionization*)  
**FBDD** : découverte de medicament basée sur les fragments (*fragment-based drug design*)  
**FDA** : Food and Drug Administration  
**FRET** : *Förster Resonance Energy Transfer*  
**FSC** : spectroscopie de corrélation de fluorescence (*fluorescence correlation spectroscopy*)  
**FSC** : corrélation de Fourrier (*Fourrier Shell Correlation*)  
**FT** : non retenu (*Flow Through*)  
**GABA** : acide  $\gamma$ -amino-butyrique  
**GABA<sub>B</sub>R** : récepteur gabaergique de type B  
**GHSR1a** : récepteur à la ghréline 1a  
**GlyR** : récepteur à la glycine  
**GnRH** : récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines  
**GRK** : kinase couplée aux RCPG (*G protein-coupled receptor kinase*)  
**GUVs** : vésicules unilamellaires géantes  
**HDL** : lipoprotéines de haute densité  
**HDX-MS** : spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium  
**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
**HRP** : peroxydase de raifort (*Horseradish peroxidase*)  
**HTS** : criblage à haut débit (*high throughput screening*)  
**iGluR** : récepteur ionotropique du glutamate  
**IP3** : inositol triphosphate  
**IUPHAR** : *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*  
**K<sub>2</sub>P** : canaux potassiques à 2 domaines P  
**K<sub>Ca</sub>/K<sub>Na</sub>** : canaux potassiques activés par les Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> cytosoliques  
**K<sub>ir</sub>** : canal potassique de rectification entrante  
**KPi** : tampon phosphate  
**K<sub>V</sub>** : canaux potassiques dépendants du voltage  
**LBD** : domaine de liaison du ligand  
**LCP** : cristallographie en phase lipidique cubique (*Lipidic Cubic Phase*)  
**LFA** : essais de flux sur liposomes (*liposome flux assay*)  
**LGICs** : canaux ligands-dépendants (*ligand-gated ion channels*)  
**LMNG** : lauryl maltose neopentyl glycol  
**LUVs** : vésicules unilamellaires larges  
**mAchR** : récepteur muscarinique à l'acétylcholine  
**MALDI** : ionisation par désorption laser assistée par matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)  
**MAPK** : *mitogen-activated protein (MAP) kinase*  
**MAS-NMR** : RMN à l'angle magique (*Magic Angle Spinning NMR*)  
**MD** : modélisation moléculaire (*molecular dynamics*)  
**mGluR** : récepteur du glutamate  
**MLVs** : vésicules multi-lamellaires  
**MRP** : multidrug-resistance protein  
**MS** : spectrométrie de masse  
**MSP** : *membrane scaffold protein*  
**MST** : *microscale thermophoresis*

**MT1** : récepteur à la mélatonine 1  
**MWCO** : seuil de coupure (*Molecular Weight Cut Off*)  
**nAChR** : récepteur nicotinique à l'acétylcholine  
**Nav** : canaux sodiques dépendants du voltage  
**NECA** : 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine  
**N-ter** : extrémité N-terminale  
**NTSR1** : récepteur à la neurotensine 1  
**OD<sub>600</sub>** : densité optique à 600 nm  
**PBS** : tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)  
**PM(s)** : protéine(s) membranaire(s)  
**PMSF** : Fluorure de phénylméthylsulfonyle  
**RCPG** : récepteur(s) couplé(s) aux protéines G  
**REES** : *red edge excitation shift*  
**RMN** : résonnance magnétique nucléaire  
**RU** : relative unit  
**SapA** : saposine A  
**SBDD** : *structure-based drug design*  
**SDS** : dodecylsulfate de sodium  
**SDS PAGE** : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS  
**SEC** : chromatographie d'exclusion stérique  
**SEC-MALS** : chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angle de la lumière (*size exclusion chromatography multi-angle light scattering*)  
**SMA** : copolymère de styrène et d'acide maléique  
**SMALP** : particule lipidique de SMA  
**SMI** : copolymère de styrène et de maléimide  
**SMILP** : particule lipidique de SMI  
**SPA** : *Scintillation Proximity Assay*  
**SPR** : résonance plasmonique de surface  
**SRCD** : CD utilisant le rayonnement synchrotron (*synchrotron radiation circular dichroism*)  
**SUVs** : petites vésicules unilamellaires  
**T4L** : lysozyme T4  
**TM** : segment transmembranaire  
**TMD** : domaine transmembranaire  
**TPC** : canaux à deux pores (*Two Pore channels*)  
**TRP** : *transient receptor potential*  
**TSA** : thermal shift assay  
**ULVs** : vésicules unilamellaires  
**V1aR/V2R** : récepteur à la vasopressine 1a/2  
**VSD** : domaine sensible au voltage (*voltage-sensing domain*)  
**YNB** : Yeast Nitrogen Base  
**YPG** : milieu extrait de levure, peptone et glucose  
**XAC** : xanthine amine congener

# TABLE DES FIGURES

Figure 1. Représentation de la fonction générale des RCPG.....	15
Figure 2. Topologie générale des RCPG.....	16
Figure 3. Représentation schématique des structures de RCPG selon leur famille... ..	18
Figure 4. Voies de signalisation des RCPG.....	20
Figure 5. Transition entre les différents états d'un canal ionique.....	24
Figure 6. Topologie générale des canaux-voltage dépendants.....	28
Figure 7. Structure schématique générale des récepteurs à l'acétylcholine nAChR. ..	30
Figure 8. Structure et organisation des domaines des récepteurs ionotropiques au glutamate.....	30
Figure 9. Structure d'une sous-unité des récepteurs P2X en forme de dauphin.....	33
Figure 10. Le processus de développement d'un nouveau médicament. ..	37
Figure 11. Tests <i>in vitro</i> de HTS sur des RCPG. ..	39
Figure 12. Les différentes méthodes employées pour la découverte de médicaments ciblant des canaux ioniques <sup>52</sup> . ..	40
Figure 13. Comparaison entre le patch clamp conventionnel et le patch clamp automatisé. ..	40
Figure 14. Comparaison entre HTS et FBDD. ..	44
Figure 15. L'essor de la cryo-EM. ..	50
Figure 16. Les méthodes utilisées pour la détermination de structures uniques selon les différentes familles de protéines membranaires. ..	50
Figure 17. Principe de la SPR.....	54
Figure 18. Tendances dans l'utilisation des détergents pour la solubilisation de PMs dont les structures uniques ont été résolues entre 2010 et 2019. ..	56
Figure 19. Composition et représentation schématique de bicelles.....	62
Figure 20. Représentation schématique de l'amphipol A8-35 et de ses dérivés.....	63
Figure 21. Représentation schématique d'un nanodisque.....	68
Figure 22. Structure chimique des CyclAPols.....	74
Figure 23. Les différents types de polymères utilisés pour extraire des protéines membranaires et leurs caractéristiques associées. ..	76
Figure 24. Structure chimique des ligands agonistes et antagonistes du récepteur A <sub>2</sub> A utilisés au cours de ce projet. ..	90

Figure 25. Métabolisme de l'adénonine et transport dans le milieu intra- et extracellulaire.....	91
Figure 26. Structure cristalline du récepteur à l'adénosine A <sub>2</sub> A en complexe avec le ZM241385.....	93
Figure 27. Structure du canal TRPV4 obtenue par cryo-EM.....	96
Figure 28. Représentation schématique des construits recombinants de la protéine A <sub>2</sub> A exprimée dans la levure <i>Pichia pastoris</i> .....	118
Figure 29. Purification du récepteur A <sub>2</sub> A_Rant21_MP3 .....	120
Figure 30. Purification du récepteur A <sub>2</sub> A_MP2 .....	122
Figure 31. Courbe de saturation de la protéine A <sub>2</sub> A_MP2 par le ligand radioactif [ <sup>3</sup> H]-ZM241385 .....	124
Figure 32. Test de solubilisation de A <sub>2</sub> A_MP2 avec différents polymères .....	126
Figure 33. Purification de A <sub>2</sub> A_MP2 avec le SMA 2000.....	130
Figure 34. Purification de A <sub>2</sub> A_MP2 avec le SMA 3000.....	130
Figure 35. Mise au point d'un protocole de gradient de glycérol .....	132
Figure 36. Application du protocole de gradient de glycérol à des protéines A <sub>2</sub> A_MP2 purifiées par le SMA 3000 .....	134
Figure 37. Détermination de la concentration des SMALPs purifiées. ....	134
Figure 38. Courbes de saturation du [ <sup>3</sup> H]-ZM241385 de la protéine A <sub>2</sub> A_MP2 purifiée en SMALPs 2000 et SMALPs 3000. ....	136
Figure 39. Purification du récepteur A <sub>2</sub> A_MP2 par le CyclAPol C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -50.....	138
Figure 40. Purification anti-flag du récepteur A <sub>2</sub> A_MP2 par le CyclAPol C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -50. 140	140
Figure 41. Étude de la stabilité du récepteurA <sub>2</sub> A purifié en SMALPs 2000 ou en SMALPs 3000.....	142
Figure 42. Caractérisation pharmacologique du récepteur A <sub>2</sub> A_MP2 par des tests de compétition. ....	144
Figure 43. Immobilisation de la protéine A <sub>2</sub> A_MP2 purifiée en SMALP 2000 sur une puce de SPR.....	146
Figure 44. Sensorgrammes de l'étude cinétique de l'interaction de différents ligands avec le récepteur A <sub>2</sub> A purifié en SMA 2000. ....	148
Figure 45. Représentation du construit recombinant de la protéine TRPV4 exprimée dans la levure <i>Pichia pastoris</i> .....	150
Figure 46. Test de solubilisation de TRPV4 par différents détergents .....	150
Figure 47. Purification du canal TRPV4 en DDM. ....	152

Figure 48. Purification du canal TRPV4 en LMNG/CHS.....	154
Figure 49. Clichés de microscopie électronique à coloration négative obtenus selon différentes conditions de purification .....	156
Figure 50. Cryo-microscopie électronique sur le canal TRPV4 purifié en détergent .....	158
Figure 51. Test de solubilisation du canal TRPV4 avec différents polymères.....	160
Figure 52. Purification du canal TRPV4 par le SMA 2000 par IMAC.....	162
Figure 53. Purification du canal TRPV4 sur un gradient de glycérol.....	162
Figure 54. Clichés de microscopie électronique à coloration négative de SMALPs-TRPV4 .....	164

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples de polymorphismes ou de maladies associées à la mutation d'un RCPG .....	22
Tableau 2. Concentration et potentiel électrochimique des principaux ions localisés de part et d'autre de la membrane plasmique.....	25
Tableau 3. Les différentes familles de canaux ioniques ligand-dépendants. ....	28
Tableau 4. Canalopathies provenant de la dégradation de la fonction d'un canal. Tableau modifié d'après.....	34
Tableau 5. Les protéines eucaryotes étudiées <i>in vitro</i> à l'aide de polymères de SMA et dérivés. ....	78
Tableau 6. Composition des tampons de purification en détergent pour A <sub>2</sub> A et TRPV4. ....	105
Tableau 7. Composition des tampons pour la purification des protéines par les polymères. ....	107
Tableau 8. Liste et caractéristiques des anticorps utilisés .....	111
Tableau 9. Composition des tampons de liaison pour les expériences de déplacement.....	113
Tableau 10. Constantes d'inhibition (K <sub>i</sub> ) de différents ligands sur la protéine A <sub>2</sub> A .	144
Tableau 11. Valeurs des constantes de dissociation à l'équilibre (K <sub>D</sub> ) obtenues par SPR sur les SMALPs purifiés.....	148



# **INTRODUCTION**

## 1. Les protéines membranaires intégrales comme cible privilégiée des médicaments

### 1.1. Généralités

Selon l'article L. 5111.1 du Code de la santé publique, un médicament est défini comme une « substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant [...] corriger ou modifier les fonctions physiologiques [de l'homme et de l'animal] en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique »<sup>a</sup>. Parmi les milliers de médicaments sur le marché, il existe à l'heure actuelle environ 1 200 molécules actives qui se partagent environ 330 cibles parmi lesquelles des enzymes ciblées par 25 % des molécules actives, des récepteurs nucléaires visés par environ 10 % des molécules mais surtout des protéines membranaires ciblées par environ 55% des molécules actives<sup>1,2</sup>.

Il n'est pas surprenant que les protéines membranaires soient des cibles thérapeutiques si importantes. Elles sont en effet impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques incluant le cancer, les maladies auto-immunes, respiratoires, neurologiques, métaboliques, etc. Les familles de protéines membranaires présentant le plus grand intérêt comme cible thérapeutique comportent les récepteurs, les pompes et transporteurs ainsi que les canaux ioniques.

Parmi les récepteurs, les **récepteurs couplés aux protéines G** (RCPG) sont sans aucun doute la plus grande famille avec plus de 800 membres et représentent à eux seuls la cible de près de 30% des médicaments<sup>3,4</sup>. Ils seront présentés plus en détail dans une partie à part entière ci-après (paragraphe 1.2. Les RCPG, cible n°1 des médicaments). Les **canaux ioniques** constituent également une cible thérapeutique majeure puisqu'ils représentent la deuxième cible des médicaments, après les RCPG. Ils font l'objet d'une partie détaillée au paragraphe 1.3. Les canaux ioniques.

---

<sup>a</sup> [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000006689867/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689867/)

## 1.2. Les RCPG, cible n°1 des médicaments

### 1.2.1. Généralités

Les RCPG, également appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires au vu de leur topologie commune, représentent sans équivoque, avec plus de 800 membres, la plus grande famille de récepteurs chez l'Homme. Les RCPG ont été nommés ainsi de par leur capacité à s'associer avec les protéines G hétérotrimériques ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) et ainsi transmettre un signal à l'intérieur de la cellule via l'activation ou l'inhibition d'effecteurs intracellulaires (Figure 1<sup>5</sup>). Les stimuli capables d'activer ces récepteurs sont extrêmement variés et incluent des photons, des molécules odorantes ou gustatives, des ions, des neurotransmetteurs, des acides aminés, des nucléotides, des peptides, des protéines, des lipides, des acides gras, des stéroïdes ou encore des hormones<sup>6</sup>.

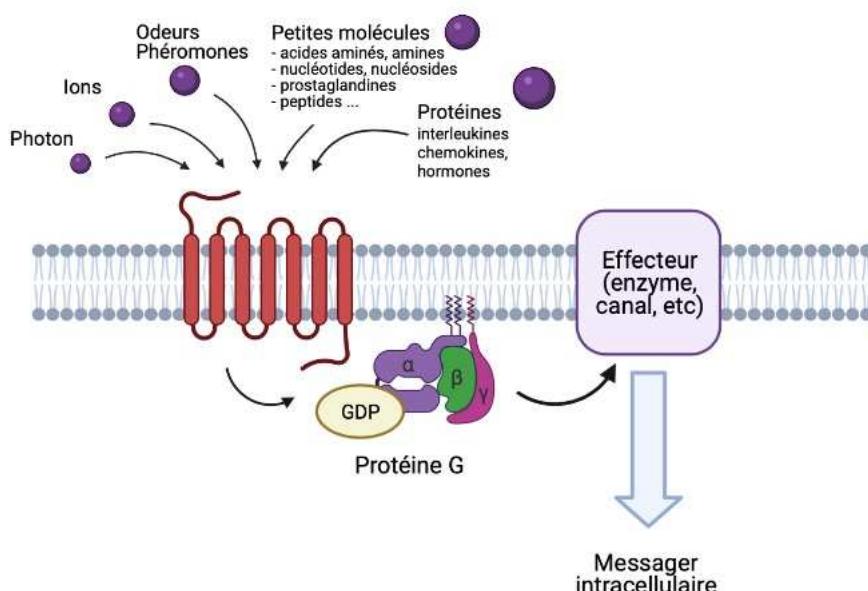


Figure 1. Représentation de la fonction générale des RCPG. Figure modifiée d'après<sup>5</sup>.

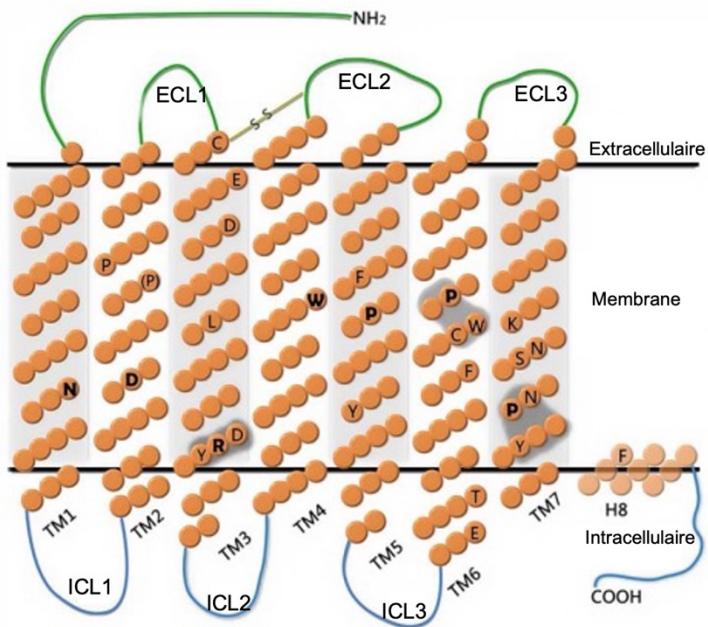
### 1.2.2. Généralités structurales

Les RCPG ont été regroupés dans cette grande famille car ils possèdent tous une topologie commune (Figure 2). Ils sont constitués d'une extrémité N-terminale (N-ter) extracellulaire, plus ou moins longue selon les récepteurs, de sept hélices  $\alpha$  hydrophobes transmembranaires, communément appelées TM 1 à 7, très conservées, et d'une extrémité C-terminale (C-ter) intracellulaire.

Les domaines transmembranaires, organisés dans le sens antihoraire si l'on se place du côté extracellulaire, sont reliés par trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2

et ICL3) et trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3) de tailles variables. Deux cystéines sont retrouvées dans la plupart des RCPG dans les boucles ECL1 et ECL2, formant un pont disulfure stabilisant.

Enfin, la majorité des RCPG ont également une quatrième boucle intracellulaire ou hélice H8 du côté C-ter après le TM7, positionnée parallèlement à la surface interne de la membrane plasmique<sup>7</sup>, avec une cystéine palmitoylée s'ancrant dans la membrane.



**Figure 2. Topologie générale des RCPG.** L'emplacement des résidus indiqués est basé sur le récepteur CXCR4; en gras sont représentés les résidus les plus conservés dans chaque TM. ECL: boucle extracellulaire, ICL : boucle intracellulaire, TM : domaine transmembranaire, H8 : hélice 8. Figure modifiée d'après<sup>8</sup>

### 1.2.3. Classification

Malgré la large diversité de ces protéines, certaines possèdent des points de similitude ayant permis de les regrouper en plusieurs familles. Bien que plusieurs systèmes de classification aient été proposés - certains basés sur l'homologie de séquence<sup>9</sup>, la phylogénie ou le mode de liaison du ligand<sup>5</sup> - c'est le système établi en 1994 par Kolakowski<sup>10</sup> qui est aujourd'hui le plus fréquemment utilisé pour classer les RCPG.

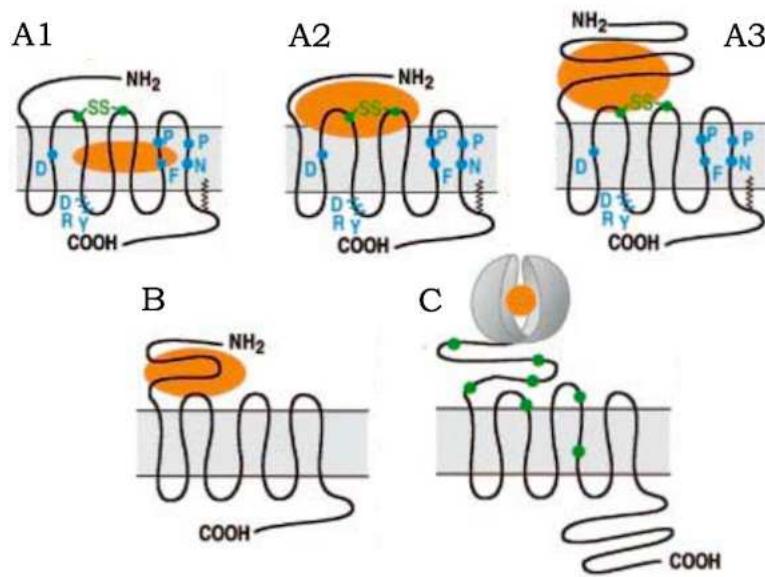
Cette classification, basée sur l'homologie de séquence et la similarité fonctionnelle des différents récepteurs, définit six classes de récepteurs, de A à F. La **classe A**, regroupant les récepteurs « rhodopsin-like », constituent la plus vaste et la plus diverse classe de récepteurs<sup>6,10,11</sup> avec 719 membres<sup>12</sup> soit plus de 90 % des RCPG. Cette famille est sous-divisée en 3 catégories qui se distinguent selon la localisation de leur site d'interaction avec le ligand : entre les hélices

transmembranaires pour le premier groupe (Figure 3A1), au niveau de l'extrémité N-ter, ECL1 et ECL2 pour le deuxième groupe (Figure 3A2) et au niveau de l'extrémité N-ter pour le troisième groupe (Figure 3A3).

La **classe B** est divisée en 2 sous-familles : les récepteurs apparentés à celui de sécrétine ou « *secretin-like* » (B1) et la famille des récepteurs d'adhésion (B2).

Les membres « *secretin-like* », au nombre de 15 chez l'Homme, sont caractérisés par une extrémité N-ter d'environ 60 à 80 acides aminés (AA), sur lesquels les ligands (principalement de grosses hormones peptidiques comme le glucagon ou l'hormone parathyroïdienne) vont se lier (Figure 3B). Les cystéines conservées formant des ponts disulfures sont d'ailleurs particulièrement importantes pour la liaison de leurs ligands<sup>9,13</sup>.

Les RCPG appartenant à la famille des récepteurs d'adhésion sont au nombre de 33. Ils constituent donc la 2<sup>ème</sup> plus grande famille de récepteurs mais sont relativement peu décrits dans la littérature. Nombre de ces récepteurs sont d'ailleurs toujours orphelins et seule la structure du récepteur AGRG3 (*Adhesion G protein-coupled receptor G3*, aussi appelé GPR97) a été résolue en 2021<sup>14</sup>. Les points communs de ces récepteurs d'adhésion résident dans leur longue mais toutefois diverse extrémité N-terminale qui est probablement hautement glycosylée et qui formerait une structure rigide à la surface des cellules. De même, ces récepteurs joueraient un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire car ils contiennent des domaines aussi retrouvés dans des protéines d'adhésion, de reconnaissance ou de migration comme la cadhérine, la lectine, la laminine, les immunoglobulines ou l'olfactomédine<sup>13</sup>.



**Figure 3. Représentation schématique des structures de RCPG selon leur famille.** (A1-A3) Structures des différents sous-groupes de la famille des récepteurs similaires à la rhodopsine. (B) Structure des récepteurs de la famille des récepteurs de la sécrétine et d'adhésion. (C) Structure des récepteurs métabotropiques. Figure modifiée d'après<sup>5</sup>

La **classe C** comprend les récepteurs du glutamate et contient 22 membres dont les récepteurs du glutamate (mGluR) et les récepteurs gabaergiques de type B (GABA<sub>B</sub>R), les récepteurs au calcium ainsi qu'un groupe de récepteurs de phéromones. Ces récepteurs possèdent tous un très grand domaine extracellulaire d'environ 600 AA constitué de deux lobes, séparés par une région charnière. La liaison du ligand induit la fermeture des lobes par un mécanisme comparé à celui de la Vénus tue-mouche<sup>5</sup> (Figure 3C).

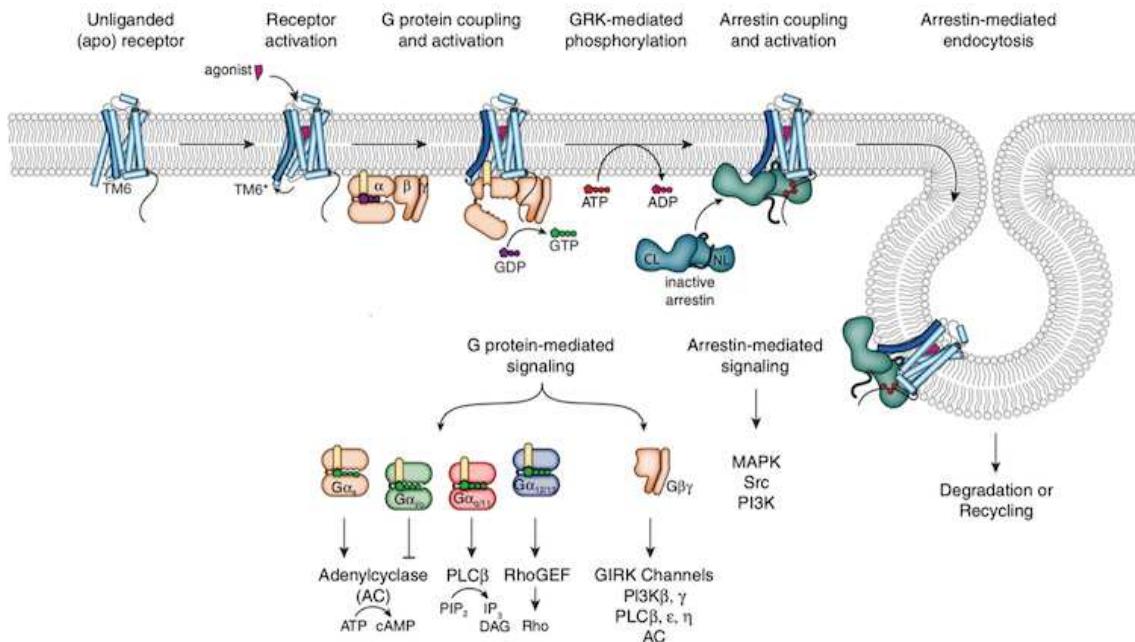
La **classe D** comprend des récepteurs de phéromones fongiques (non humains)<sup>15</sup> et la **classe E** des récepteurs à l'AMPc (non humains)<sup>16</sup>.

Enfin, la **classe F** comprend les récepteurs *Frizzled* et *Smoothened* (24 membres) impliqués dans le développement embryonnaire chez les animaux. Ces récepteurs contiennent un domaine extracellulaire composé d'un domaine riche en cystéines et d'un domaine de liaison, en plus des 7 TM et du domaine intracellulaire<sup>17</sup>. Leur identité de séquence avec les autres RCPG est toutefois relativement faible, et la classification des récepteurs SMO comme RCPG reste controversée.

#### 1.2.4. Mécanisme d'activation des RCPG

Les mécanismes d'activation des RCPG sont complexes et impliquent de nombreux effecteurs.

Les protéines G représentent les principaux effecteurs des RCPG. Elles sont composées de 3 sous-unités G $\alpha$ , G $\beta$  et G $\gamma$ . Lorsque le récepteur n'est pas activé, la sous-unité G $\alpha$  du trimère  $\alpha\beta\gamma$ , qui comprend un domaine GTPasique, lie une molécule de GDP. Lors de la liaison d'un agoniste sur le récepteur, l'affinité du GDP va diminuer entraînant sa dissociation, et va rapidement être remplacé par une molécule GTP, présent en grande concentration dans la cellule. Le changement de conformation de la sous-unité G $\alpha$  induit par la fixation du GTP va entraîner la dissociation des sous-unités G $\beta\gamma$ . Les sous-unités G $\alpha$ , classées selon leur similarité de séquences en 4 familles (G<sub>s</sub>, G<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub>, G<sub>12/13</sub>), et G $\beta\gamma$  vont moduler l'activité de différentes protéines effectrices, comme l'adénylate cyclase (AC) ou la phospholipase C, et donc induire des réponses cellulaires différentes (Figure 4). Ces différentes voies ne seront volontairement pas développées ici mais sont accessibles dans différentes revues<sup>18,19</sup>.



**Figure 4. Voies de signalisation des RCPG.** Les mécanismes d'activation des RCPG impliquent deux voies de signalisation majeures, l'une médiée par les protéines G et l'autre indépendante des protéines G. La signalisation des GPCR est initiée par la liaison d'un agoniste sur le récepteur qui va induire des changements conformationnels dont un mouvement extérieur du TM6 (en bleu foncé). L'activation du récepteur va induire le recrutement d'une protéine G hétérotrimérique composée des sous-unités G $\alpha$ , G $\beta$  et G $\gamma$  (en orange), l'échange du GDP pour le GTP, puis la dissociation de la sous-unité G $\alpha$  d'une part et de la sous-unité G $\beta\gamma$  d'autre part. Les 2 sous-unités peuvent interagir avec différents effecteurs. Selon l'isoforme, la sous-unité G $\alpha$  peut activer (G $\alpha_s$ ) ou inhiber (G $\alpha_i/o$ ) l'adénylyl cyclase (AC), activer la phospholipase C (PLC)  $\beta$  (G $\alpha_q$ ) ou le Rho guanine exchange factor (RhoGEF) (G $\alpha_{12/13}$ ). La sous-unité G $\beta\gamma$  peut interagir avec les canaux GIRK, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), et certaines PLCs ou encore l'AC. Le cycle est terminé par l'hydrolyse du GTP et la réassocation du trimère G $\alpha$ /G $\beta\gamma$  inactif. Dans la voie indépendante aux protéines G, l'activation du RCPG va induire le recrutement des GRK qui vont stimuler le recrutement et l'activation de l'arrestine. Le couplage de l'arrestine conduit à l'activation d'autres effecteurs cellulaires comme les MAP kinases ainsi qu'à l'internalisation du récepteur en vue de sa dégradation dans les lysosomes ou de son recyclage à la membrane. ATP, adenosine triphosphate; cAMP, AMP cyclique; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate; DAG, diacylglycérol. Figure modifiée d'après<sup>18,19</sup>

L'autre voie d'activation des RCPG, indépendante des protéines G, va impliquer des kinases couplées aux RCPG (GRK, *G protein-coupled receptor kinases*). Ces protéines cytosoliques, comprenant 7 membres chez les mammifères - GRK1 à 7 -, sont recrutées au niveau de la membrane plasmique et vont phosphoryler les RCPG au niveau de leur extrémité C-ter et de leurs boucles intracellulaires. Cette phosphorylation va favoriser l'interaction des RCPG à l'arrestine. Les arrestines sont des protéines cytosoliques d'environ 45 kDa dont il existe quatre isoformes différentes : l'arrestine 1 et 4, impliquées dans la vision et présentes principalement dans les yeux, et l'arrestine 2 et 3 (aussi nommée  $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2), exprimées de façon ubiquitaire. La liaison de l'arrestine cause la désensibilisation du récepteur, l'activation de kinases et d'autres protéines intracellulaires comme les MAP kinases (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*), l'internalisation des récepteurs en vue de leur dégradation ou leur recyclage. Plus de détails sur cette voie de signalisation médiée par l'arrestine sont disponibles dans différentes revues<sup>18,20</sup>.

Bien que l'activation des RCPG ait été longtemps établie comme un simple mode *on/off* avec un état conformationnel inactif et un état actif, les données de biologie structurale ont permis d'établir que la dynamique conformationnelle des RCPG était finalement bien plus complexe. Les RCPG sont des protéines hautement dynamiques avec de multiples états conformationnels. De nombreux RCPG ont un seuil d'activité basal, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'induire un certain niveau de signalisation intracellulaire en l'absence de ligand<sup>21,22</sup>. Ensuite, la nature du ligand lui-même va influencer l'état conformationnel du récepteur à l'état actif, favorisant ainsi certaines voies de signalisation. Les agonistes totaux (*full agonist*), qui sont capables d'induire une réponse maximale du RCPG, sont opposés aux agonistes partiaux qui vont induire un niveau de réponse intermédiaire. Les agonistes inverses vont quant à eux diminuer l'activité basale du récepteur. Enfin, certains ligands sont connus comme agonistes « biaisés » c'est-à-dire qu'ils vont préférentiellement activer soit la voie des protéines G soit la voie des arrestines (Figure 4)<sup>23,24</sup>.

### 1.2.5. Importance thérapeutique

La grande diversité des RCPG et les nombreux membres faisant partie de cette famille permettent facilement d'expliquer que ces récepteurs sont des acteurs centraux dans l'élaboration des réponses cellulaires, et ce dans une large variété de processus physiologiques telle la neurotransmission, la vision, la prolifération et différentiation cellulaire, la douleur, l'inflammation, etc. De nombreuses maladies sont

Tableau 1. Exemples de polymorphismes ou de maladies associées à la mutation d'un RCPG<sup>25</sup>.

Récepteur	Maladie
CXCR4	Syndrome WHIM
Récepteur au peptide N-formyl (FPR) 1	Parodontite juvénile
Récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH)	Hypogonadisme hypogonadotrope
GPR54	Hypogonadisme hypogonadotrope
Récepteur à l'hormone folliculo-stimulante (FSHR)	Infertilité féminine
Récepteur $\beta 1$ adrénnergique ( $\beta 1$ AR)	Insuffisance cardiaque
Récepteur $\beta 2$ adrénnergique ( $\beta 2$ AR)	Hypertension, asthme
Récepteur $\beta 3$ adrénnergique ( $\beta 3$ AR)	Obésité
Récepteur à la chimiokine CC 5 (CCR5)	Progression du SIDA
Récepteur à la dopamine 2 (D2DR)	Dépression, anxiété
Récepteur à la dopamine 3 (D3DR)	Schizophrénie
Récepteur à la vasopressine (V <sub>2</sub> R)	Diabète insipide néphrogénique
Récepteur à la rhodopsine	Rétinopathie pigmentaire
Récepteur à la mélanocortine 4	Obésité
VLGR1/MASS1	Syndrome d'Usher
Récepteur au neuropeptide S	Asthme
Récepteur purinergique P2Y12	Diathèse hémorragique

donc associées à l'altération du fonctionnement d'un RCPG. Le Tableau 1 en recense quelques-unes.

Les estimations pour déterminer la contribution des RCPG comme cible des médicaments sur le marché varient selon les références, mais une étude récente a estimé, d'après l'analyse de diverses banques de données, qu'il y a environ 700 médicaments approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) dont la cible est un RCPG soit environ 35 % de l'ensemble des médicaments<sup>4</sup>. Les principales familles de RCPG ciblées incluent les récepteurs adrénnergiques, histaminiques, dopaminergiques, acétylcholinergiques, les récepteurs aux opioïdes et les récepteurs à la sérotonine. De même, les maladies les plus fréquemment traitées sont l'obésité, le diabète, les maladies du système nerveux central (Alzheimer, la dépression, la schizophrénie, Parkinson), les allergies, l'asthme ou l'hypertension. Des revues plus détaillées sont disponibles dans la littérature<sup>3,4</sup>.

Pour autant, les cibles actuelles ne représentent qu'une faible partie des cibles potentielles. En effet une centaine de récepteurs sont toujours orphelins, c'est-à-dire que leur ligand naturel n'a pas été identifié à ce jour. Leur rôle physiologique est souvent peu voire pas connu, le potentiel en termes de santé publique est donc majeur. De même, l'intérêt pour la production d'anticorps monoclonaux en tant que médicament grandit<sup>26</sup> et les récepteurs d'adhésion, avec leur longue extrémité N-terminale, pourraient être des cibles intéressantes.

### 1.3. Les canaux ioniques

#### 1.3.1. Généralités

Les canaux ioniques sont des protéines formant des pores qui permettent le passage d'ions à travers la membrane plasmique ainsi que les membranes des organelles. Ils peuvent être sélectivement perméables à un ion ou bien à plusieurs ions à la fois. A l'inverse des pompes membranaires, un canal ne peut pas transporter un ion contre le gradient électrochimique (résultant de la différence de concentration et du champ électrique), il ne fait qu'accélérer le passage des ions du milieu le plus concentré vers le moins concentré.

Les canaux ioniques représentent une large famille de protéines membranaires, avec plus de 300 membres. Ils sont nommés majoritairement selon les recommandations de l'IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical*

Pharmacology). Ici, nous traiterons des principaux canaux ioniques selon l'IUPHAR, ce qui n'inclut pas les canaux anioniques ou les aquaporines et les connexines.

Dans la majorité des cas, les canaux ioniques sont classés selon 2 critères principaux :

- selon le mécanisme d'ouverture, et dans ce cas on distingue les canaux dépendants du potentiel électrique (ou voltage-dépendants) des canaux activés par la liaison d'un médiateur (ou canaux ligand-dépendants), ou d'autres canaux ne rentrant dans aucune de ces deux catégories (comme les aquaporines ou les connexines).
- selon leur sélectivité à un ion (canaux sodiques, potassiques, chlorures, calciques ou non sélectifs).

Un canal existe dans 3 états : ouvert, fermé et inactif (Figure 5). Dans le cas des canaux ligand-dépendants, ils vont subir des changements conformationnels à la suite de la liaison d'une molécule pour switcher entre l'un des trois états en quelques millisecondes. Les canaux dépendants du potentiel vont eux changer de conformation à la suite d'une modification de potentiel de membrane.

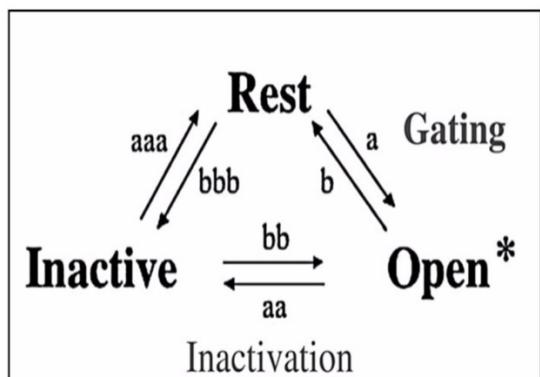


Figure 5. Transition entre les différents états d'un canal ionique.

### 1.3.2. Membrane et potentiel de repos

La distribution des ions de part et d'autre de la membrane plasmique, qui est imperméable, est inégale (Tableau 2). Les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule tandis que les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{H}^+$  sont plus concentrés à l'intérieur de la cellule. Cette différence peut exister si elle est compensée par une différence de potentiel électrique propre à chaque ion (Tableau 2). Le potentiel électrochimique de chaque composé ionique est défini par l'équation de Nernst.

Tableau 2. Concentration et potentiel électrochimique des principaux ions localisés de part et d'autre de la membrane plasmique.

Ions	Milieu intracellulaire (mM)	Milieu extracellulaire (mM)	Potentiel d'équilibre
			$E_{ion}$
Na <sup>+</sup>	14	140	+ 58 mV
K <sup>+</sup>	160	3	- 84 mV
Ca <sup>2+</sup>	10 <sup>-4</sup>	1	+ 116 mV
Cl <sup>-</sup>	14	150	- 58 mV

Le potentiel électrochimique de membrane d'une membrane plasmique lorsque la cellule est au repos est appelé potentiel de repos ( $V_m$ ). Il varie entre - 20 et - 90 mV suivant le type cellulaire mais il est plus généralement compris entre - 40 et - 60 mV<sup>1</sup>. Les canaux ioniques ont une contribution majeure dans le maintien du potentiel de repos de la cellule. Les systèmes de transport actif agissent pour la formation et le maintien des gradients de concentration mais contribuent peu au maintien du potentiel de repos.

Le potentiel de repos joue un rôle essentiel pour les cellules excitables telles que les neurones ou les cellules cardiaques. L'activation des canaux voltage-dépendants initie un potentiel d'action. L'entrée de cations et la sortie d'anions vont entraîner une dépolarisation de la cellule, le potentiel de membrane  $V_m$  va augmenter par rapport au potentiel de repos, tandis que la sortie de cations et l'entrée d'anions vont entraîner une hyperpolarisation ; le potentiel de membrane  $V_m$  va diminuer. Si l'on prend les cellules neuronales en exemple, on observe une phase de dépolarisation liée à l'entrée massive d'ions Na<sup>+</sup>, puis une phase de dépolarisation liée à la sortie d'ions K<sup>+</sup> suite à l'inactivation des canaux sodiques et enfin une phase d'hyperpolarisation plus longue qui correspond au temps nécessaire pour que les canaux potassiques se referment. L'action de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase permet également le retour au potentiel de repos<sup>1</sup>.

### 1.3.3. Les canaux voltage-dépendants

#### 1.3.3.1. Les différents membres

Les canaux voltage-dépendants constituent une large famille de protéines (Figure 6). Ils sont généralement répartis en 7 sous-familles parmi lesquelles les canaux sodiques Nav, les canaux potassiques répartis en 4 sous-familles, le canal calcique dépendant

du voltage  $\text{Ca}_v$ , les canaux Transient Receptor Potential (TRP), les canaux CatSper et les canaux à deux pores (*Two Pore channels*, TPC), les canaux régulés par les nucléotides (CNG/HCN) et le canal à proton voltage dépendant  $\text{Hv}_1$ <sup>27</sup>. Au vu de la diversité de cette famille de protéines, nous nous focaliserons ici sur celles dont l'intérêt thérapeutique est le plus important à savoir les canaux sodiques et les canaux potassiques, ainsi que les canaux TRP<sup>28</sup>.

Les **canaux sodiques  $\text{Na}_v$**  ont été découverts en 1953 par Hodgkin et Huxley<sup>29</sup>. A ce jour, on dénombre, chez les mammifères, 9 canaux  $\text{Na}_v1$  nommés  $\text{Na}_v1.1$  à  $\text{Na}_v1.9$ . Une nouvelle famille de canaux  $\text{Na}_v2$  a été découverte plus récemment<sup>30</sup> mais est peu étudiée.

Depuis le clonage du premier **canal potassique** de la drosophile en 1987<sup>31</sup>, de nombreux autres gènes codant pour les canaux potassiques ont été identifiés. Ils représentent ainsi la plus grande famille de canaux et sont exprimés de façon ubiquitaire. Les canaux potassiques sont très nombreux avec une structure et des mécanismes de régulation plus complexes que les canaux sodiques. Nous ne traiterons que des 4 principales familles, classées selon des critères génétiques et structuraux. On distingue :

- les **canaux potassiques dépendants du voltage  $\text{K}_v$**  qui constituent la plus grande famille de canaux potassiques avec une quarantaine de membres classés dans 12 familles différentes ( $\text{K}_v1$  à  $\text{K}_v12$ )

- les **canaux potassiques activés par les  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+$  cytosoliques  $\text{K}_{\text{Ca}}$  et  $\text{K}_{\text{Na}}$**  qui sont séparés en 5 familles ( $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ ,  $\text{K}_{\text{Ca}}2$  avec 3 membres,  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ ,  $\text{K}_{\text{Ca}}5.1$  et  $\text{K}_{\text{Na}}1$  avec 2 membres)

- les **canaux potassiques de rectification entrante  $\text{K}_{\text{ir}}$**  qui comptent 15 membres divisés en 4 sous-familles selon leur régulation et les protéines qui leur sont associées

- les **canaux potassiques à 2 domaines P  $\text{K}_{2\text{P}}$** , plus récemment identifiés, qui comprennent 15 membres (plus connus sous leur anciens noms TWIK, TREK, TASK, TALK, TRESK, etc) regroupés en 6 sous-familles selon leur homologie de séquence, leurs propriétés électrophysiologiques ou leur régulation.

Les **canaux TRP** sont issus chez l'homme de 27 gènes et sont divisés en 6 familles : TRPC (*canonical*), TRPV (*vanilloïd*), TRPM (*melastatin*), TRPA (*ankyrin*), TRPML (*mucolipin*), TRPP (*polycystin*). Une septième famille (TRP *NOMPC-like*) est retrouvée uniquement chez les invertébrés et les poissons. Les canaux TRP sont exprimés dans

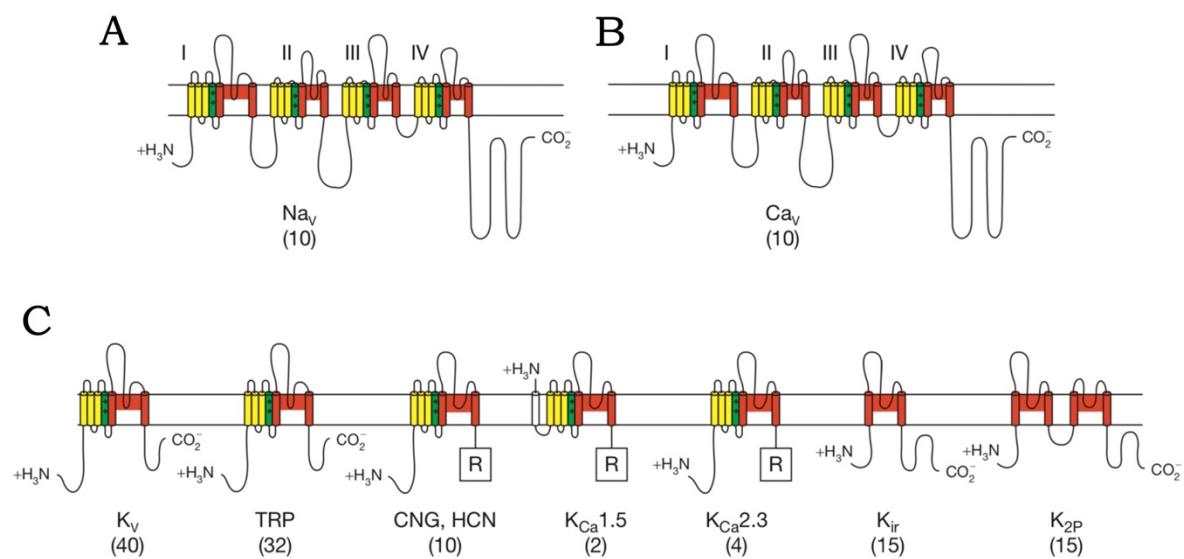
presque tous les types cellulaires, aussi bien dans les tissus excitables que non excitables. La majorité des canaux TRP présente une perméabilité cationique non sélective permettant des flux de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , seuls certains sont hautement sélectifs pour le calcium. Ils sont activés par le voltage, le calcium intracellulaire, le pH, l'osmolarité ou l'étirement mécanique. De fait de leur faible sensibilité à la dépolarisation de la membrane et de leur activation par d'autres molécules, ils sont parfois classés dans la catégorie des canaux dépendants des ligands<sup>32</sup>.

### 1.3.3.2. Motifs structurels et fonctionnels

Malgré leur diversité, les canaux voltage-dépendants ont de fortes similarités dans leurs structures (Figure 6) : des sous-unités  $\alpha$ , comprenant un nombre variable d'hélices transmembranaires selon les familles de canaux, associées à une ou plusieurs sous-unités régulatrices transmembranaires ou cytosoliques.

Les canaux sodiques  $\text{Na}_v$  sont constitués d'une grande sous-unité principale  $\alpha$  de 260-280 kDa associée à une ou deux petites sous-unité  $\beta$  de 30-40 kDa. La sous-unité  $\alpha$  est composée de 4 domaines homologues (I-IV) comprenant chacun 6 domaines transmembranaires (nommés segments S1-S6) ainsi qu'une boucle réentrant dans la membrane entre le S5 et le S6, le tout formant ainsi un motif structural commun pour la famille des canaux voltage-dépendants (Figure 6A). Le génome des mammifères contient 4 gènes qui encodent pour 5 sous-unités  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 1B$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$ ). Les sous-unités  $\beta$  consistent en un domaine extracellulaire similaire aux immunoglobulines en N-ter, un unique segment transmembranaire et un court domaine intracellulaire. Elles modulent l'activité des sous-unités  $\alpha$  et servent de molécules d'adhésion<sup>33</sup>. Le port est formé au centre d'un réseau pseudo-symétrique des 4 domaines. Les segments S1-4 forment un domaine sensible au voltage (VSD) qui est un module important dans la régulation de l'ouverture du canal lors de la dépolarisation de la membrane. Plus de détails mécanistiques sur les canaux sodiques voltage-dépendants sont disponibles dans la revue<sup>33</sup>. Les canaux calciques  $\text{Ca}_v$  ont une structure très similaire (Figure 6B).

Les canaux potassiques  $\text{K}_v$  sont composés d'un domaine homologue (semblable à ceux des canaux  $\text{Na}_v$  et  $\text{Ca}_v$ ) et s'assemblent en tétramères. Plusieurs autres canaux ont une structure similaire comme les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , CNG, et certains canaux TRP. Les canaux  $\text{K}_{\text{ir}}$  ont l'architecture structurale la plus simple de la super-famille des canaux ioniques. Ils sont formés de 4 sous-unités composées chacune de 2 segments transmembranaires nommés M1 et M2, ayant une structure et une fonction analogue



**Figure 6. Topologie générale des canaux-voltage dépendants.** (A) Canaux sodiques  $\text{Na}_V$ . (B) Canaux calcique  $\text{Ca}_V$ . (C) Autres canaux dont les canaux potassiques dépendant du voltage  $\text{K}_V$ , les canaux TRP, les canaux CNG et HNC, les canaux potassiques activés par les  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , canaux potassiques de rectification entrante  $\text{K}_{\text{ir}}$  et les canaux potassiques à 2 domaines P  $\text{K}_{2\text{P}}$ . En rouge sont représentés les segments S5-S6 formant le pore, en vert le domaine sensible au voltage chargé positivement, en jaune les segments S1 à S3. R: domaine de régulation qui lie les messagers secondaires intracellulaires. Le nombre de membres de la famille dans le génome humain est indiqué entre parenthèses. Figure modifiée d'après<sup>34</sup>.

**Tableau 3. Les différentes familles de canaux ioniques ligand-dépendants.**

Ligand	Récepteur	Sélectivité
<b>Neurotransmetteurs</b>		
Acétylcholine	AChR (musculaires et neuronaux)	Cation non sélectif
Glutamate	AMPA, kainate, NMDA	Cation non sélectif
GABA	$\text{GABA}_A\text{R}$	$\text{Cl}^-$
Glycine	GlyR	$\text{Cl}^-$
Sérotonine	Récepteur 5-HT <sub>3</sub>	Cation non sélectif
ATP	Récepteur P2X	Cation non sélectif
<b>Ligands intracellulaires</b>		
Calcium	Canaux dépendant du calcium	$\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ , non sélectif
Nucléotides cycliques	Récepteurs au cGMP et cAMP	Cation non sélectif
ATP	Canaux dépendant de l'ATP	$\text{K}^+$
IP <sub>3</sub>	Canaux libérant du calcium (récepteur de la ryanodine, RyR)	$\text{Ca}^{2+}$

avec les segments S5 et S6 des canaux sodiques, calciques et potassiques. Ce motif est répété 2 fois pour former les **canaux K<sub>2P</sub>**, comme leur nom l'indique (Figure 6C)<sup>34</sup>.

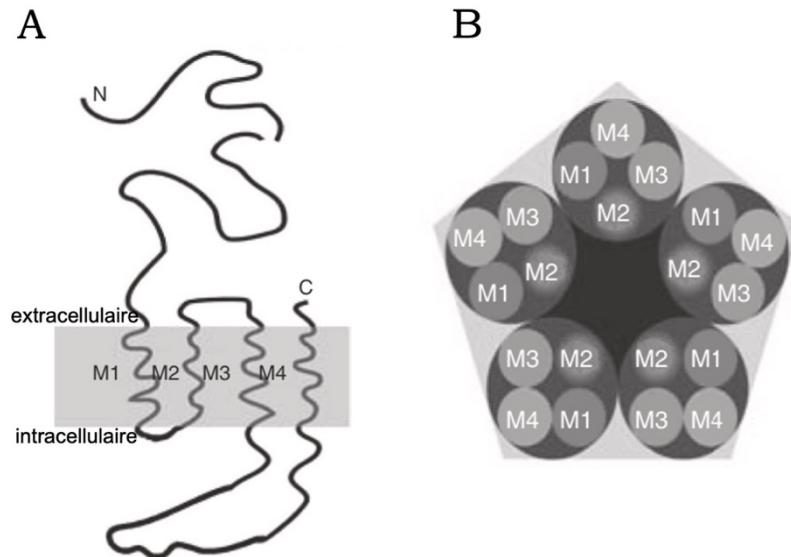
Ces différentes familles de protéines sont régulées par divers mécanismes qui ne seront que brièvement abordés ici mais qui sont détaillés dans diverses revues<sup>35,36</sup>. A titre d'exemple, les canaux Nav, Cav et Kv sont activés par le changement de potentiel de la membrane. Ils répondent au voltage grâce au segment S4 chargé positivement car riche en résidus arginines et lysines. Cette hélice se déplace vers l'extérieur sous l'influence du champ électrique de la membrane pour initier un changement de conformation qui ouvre le port. Il est admis que le changement conformationnel s'effectue dans le module sensible au voltage. Ce mouvement extérieur exerce une torsion sur les segments S6 à l'extrémité intracellulaire, forçant le port à s'ouvrir.

#### 1.3.4. Les canaux ligand-dépendants

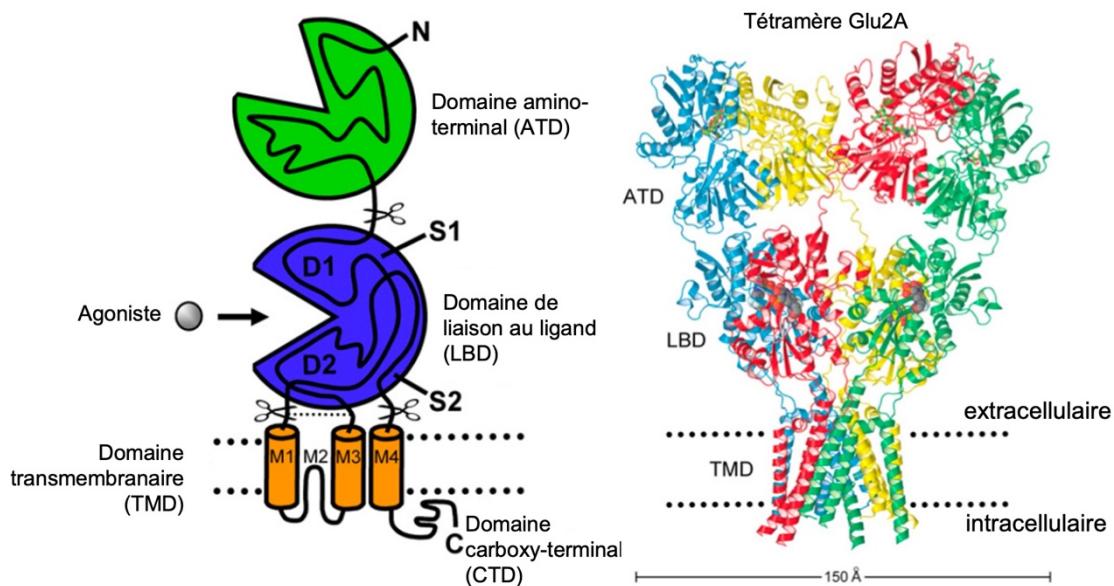
##### 1.3.4.1. Les différents membres

Les canaux ligand-dépendants (ou LGICs pour *ligand-gated ion channels*) sont des canaux activés/régulés par la liaison de molécules extra ou intracellulaires. La liaison de ces ligands sur des sites de liaison spécifiques va induire un changement conformationnel du canal qui va passer d'un état fermé à ouvert (Figure 5). Ces canaux sont présents en grande quantité dans le système nerveux central, leur ligand étant logiquement et majoritairement des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine, le glutamate, la sérotonine ou l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA). Souvent, un même neurotransmetteur peut agir sur certains RCPG ainsi que sur un LGIC comme l'acétylcholine qui agit via les récepteurs muscariniques (mAChR) et via les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChR). Les ligands intracellulaires sont, quant à eux, dans la majorité des cas, des seconds messagers comme l'inositol triphosphate (IP3), l'ATP ou le calcium (Tableau 3). Ces canaux sont impliqués dans de nombreuses fonctions comme l'anxiété, l'excitabilité des neurones, la mémoire et l'apprentissage ou la douleur<sup>32,37</sup>.

Les LGICs activés par des ligands extracellulaires sont généralement classés en différentes familles, selon leur séquence en acides aminés et leur structure<sup>37-39</sup>. On distingue :



**Figure 7. Structure schématique générale des récepteurs à l'acétylcholine nAChR. (A)** Vue latérale. **(B)** Vue du haut du récepteur. M1 à M4 : domaine transmembranaire 1 à 4. Les nAChR sont formés de 5 sous-unités et les segments transmembranaires sont organisés de telle sorte que le domaine M2 de chaque sous-unité borde le canal<sup>40</sup>.



**Figure 8. Structure et organisation des domaines des récepteurs ionotropiques au glutamate. (A)** Représentation schématique de la topologie des sous-unités des récepteurs du glutamate, présentant une structure modulaire composée de deux grands domaines extracellulaires, l'ATD en vert et le LBD en bleu, d'un TMD en orange qui fait partie du pore du canal ionique et d'un CTD intracellulaire. Le LBD est défini par deux segments d'acides aminés appelés S1 et S2. Le module TMD contient trois hélices qui traversent la membrane (M1, M3 et M4) et une boucle rentrant dans la membrane (M2). **(B)** Structure cristalline résolue à 3,6 Å du récepteur Glu2A (code PDB 3KG2) qui forme un tétramère. Figure modifiée d'après<sup>41</sup>.

- la super-famille des « *Cys-loop* » qui inclut le nAChR, le récepteur 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>3</sub>) ou récepteur à la sérotonine, les récepteurs GABA, le récepteur à la glycine (GlyR)<sup>39</sup>

- la famille des récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR) qui inclut le récepteur AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate), le récepteur kainate et le récepteur NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), ce dernier étant le mieux connu<sup>41</sup>

- les canaux purinergiques P2X activés par l'ATP<sup>42</sup>.

#### *1.3.4.2. Motifs structurels et fonctionnels*

Pour la famille des récepteurs *Cys-loop*, nous prendrons ici l'exemple du nAChR. Les nAChR sont localisés soit sur les muscles striés squelettiques ou sur les neurones centraux et périphériques. Tous les nAChRs sont formés de 5 sous-unités homologues organisées autour d'un canal central. Il existe 17 sous-unités :  $\alpha$ 1-10,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ . Chaque sous-unité est constituée de 4 hélices transmembranaires nommées M1 à M4, d'une longue extrémité N-terminale extracellulaire d'environ 210 AA qui contient un pont disulfure formant une boucle, la « *cys-loop* », qui est caractéristique des récepteurs de cette famille, d'une courte boucle intracellulaire entre M1 et M2, d'une longue boucle (entre 110 et 270 AAs) intracellulaire entre M3 et M4 et d'une courte extrémité C-terminale de 10-20 AAs extracellulaire (Figure 7A)<sup>40</sup>. Le site de liaison de l'ACh est localisé vers le milieu du domaine extracellulaire. L'ouverture du canal se produirait à la suite de petits changements de conformation globaux de la protéine ACh, qui impliqueraient de légers changements conformationnels des sous-unités conduisant à l'ouverture du canal<sup>40</sup>.

Le canal cationique est bordé par des acides aminés provenant des domaines transmembranaires M2 (Figure 7B). La sélectivité ionique du canal est garanti par plusieurs anneaux d'acides aminés polaires ou chargés, certains de ces AAs étant essentiels pour le passage des cations à travers le canal de tous les membres de la famille des récepteurs *Cys-loop*<sup>40</sup>.

Tous les iGluR ont une structure très similaire (Figure 8)<sup>41</sup>. Ils contiennent :

- un domaine amino-terminal (ATD) extracellulaire ayant des rôles variés dont l'assemblage du récepteur,

- un domaine de liaison au ligand (LBD) extracellulaire ayant une architecture similaire à deux coquilles de palourdes (« *clamshell-like* »),

- un domaine transmembranaire (TMD) composé de 3 hélices M1, M3 et M4 qui contribuent à la formation du noyau du canal ionique et d'une boucle M2 rentrant dans la membrane,

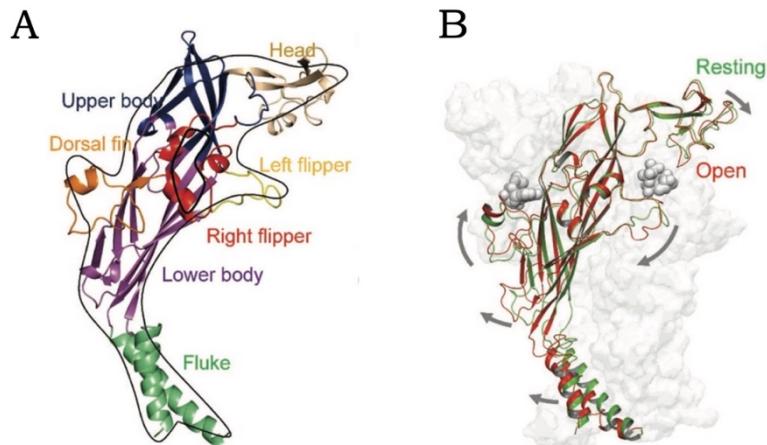
- un domaine carboxy-terminal (CTD) intracellulaire dont la séquence et la longueur est variable selon le récepteur et qui aurait un rôle dans l'adressage à la membrane, la stabilisation et l'adressage pour la dégradation du récepteur (Figure 8A).

Les premières structures obtenues par cristallographie ont permis d'observer une symétrie rotationnelle interne double et indiquent que les récepteurs du glutamate s'assemblent comme un dimère de dimères (Figure 8B). Cette symétrie diffère de la symétrie observée dans les structures d'autres canaux ioniques, tel que le récepteur nicotinique pentamérique de l'acétylcholine. Les récepteurs non-NMDA vont former des homotétramères tandis que les récepteurs NMDA forment des hétérotétramères<sup>41,43</sup>. L'étape initiale d'activation des récepteurs au glutamate est la liaison au LBD d'un agoniste comme la glycine, le D-sérine, l'aspartate ou les analogues au glutamate. Cela va induire la fermeture de la coquille du LBD, ce qui prévient la dissociation de l'agoniste, et qui va exercer des contraintes mécaniques sur les liaisons entre le LBD et le TMD résultant par l'ouverture du pore du canal ionique. De même, la dimérisation du LBD joue également un rôle clé dans l'ouverture du canal<sup>41</sup>.

Enfin, les **canaux purinergiques P2X** sont des canaux ioniques trimériques. Il existe sept sous-unités P2X différentes (P2X1-7) chez les mammifères, qui s'assemblent de manière homomérique et/ou hétéromérique. Chaque sous-unité présente plusieurs caractéristiques structurales communes : des extrémités C- et N-ter intracellulaires reliées par deux segments membranaires (TM1 et TM2) et un grand domaine extracellulaire (ectodomaine), où sont localisés les sites de liaison à l'ATP<sup>42</sup>.

La forme générale de chaque sous-unité est semblable à celle d'un dauphin, avec un corps – l'ectodomaine organisé en feuillets  $\beta$  – sur lequel s'articule une tête, une nageoire dorsale et des nageoires gauche et droite – qui sont des parties plus flexibles et une queue – les domaines transmembranaires (Figure 9).

En réponse à la liaison de l'ATP extracellulaire, des réarrangements structuraux s'effectuent au niveau du site de fixation, du corps et des domaines transmembranaires, faisant passer le récepteur d'un état fermé, de repos, à un état ouvert, conducteur (Figure 9B), permettant le flux de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane<sup>42,44</sup>.



**Figure 9. Structure d'une sous-unité des récepteurs P2X en forme de dauphin.** (A) Chaque partie du corps du dauphin est représenté d'une couleur : en doré la tête, en bleu et en violet le corps, en orange la nageoire dorsale, en rouge la nageoire droite, en jaune la nageoire gauche et en vert la queue. (B) Superposition d'une sous-unité de P2X à l'état de repos (vert) et ouvert (rouge). Les flèches grises représentent les changements conformationnels s'opérant à la suite de la liaison de l'ATP. Figure modifiée d'après<sup>44</sup>.

### 1.3.5. Intérêt thérapeutique des canaux ioniques

Les canaux ioniques constituent la 2<sup>ème</sup> cible des médicaments après les RCPG, ce qui s'explique par leur large diversité, une expression dans tous les tissus et tous les types de cellules et des fonctions physiologiques variées. Ils sont en effet impliqués dans de nombreux processus comme la relaxation nerveuse et musculaire, la cognition, la régulation de la pression sanguine, la prolifération cellulaire, etc. L'attribution du Prix Nobel de Médecine 2021 à David Julius pour ses travaux sur le canal TRPV1 et à Ardem Patapoutian pour ses travaux sur le canal mécanosensible Piezo1 témoigne d'ailleurs bien de l'intérêt thérapeutique majeur de ces protéines.

Le lien de cause à effet entre le dysfonctionnement d'un canal ionique et d'une maladie a été établi la première fois en 1989 avec l'identification du canal CFTR (*cystic fibrosis conductance regulator*)<sup>45</sup>, impliqué notamment dans la mucoviscidose. Depuis, plus de 60 maladies- souvent des maladies neuronales ou cardiaques- associées à des mutations dans ces canaux (« canalopathies ») ont été identifiées chez l'Homme. Le Tableau 4 en recense quelques-unes.

Tableau 4. Canalopathies provenant de la dégradation de la fonction d'un canal.  
Tableau modifié d'après<sup>28</sup>.

Famille	Canal	Maladie
$K_{ir}$	Kir1.1	Syndrome de Bartter (rénales)
	Kir2.1	Syndrome d'Andersen (cardiaque)
	Kir6.2	Hyperinsulinisme congénital ; Diabète néonatal
$K_v$	SUR2	Cardiomyopathie
	Kv1.1	Ataxie de type I
	Kv7.1	Syndrome du QT long/court
	Kv7.2	Encéphalopathie épileptique
	Kv7.4	Surdité
	Kv11.1 (hERG)	Syndrome du QT long/court
TRP	TRPP2	Polykystose rénale
	TRPA1	Douleurs épisodiques intenses
	TRPC6	Sclérose glomérulaire segmentaire focale
CNG	CNGA1	Rétinite pigmentaire
$K_{Ca}$	BK	Épilepsie
$Na_v$	Na <sub>v</sub> 1.1	Épilepsie
	Na <sub>v</sub> 1.5	Syndrome du QT long
	Na <sub>v</sub> 1.6	Ataxie cérébrale
	Na <sub>v</sub> 1.7	Erythromégalgie, syndrome de douleur extrême paroxystique ; insensibilité congénitale à la douleur
	Na <sub>v</sub> 2.1	Épilepsie néonatale
$Ca_v$	Ca <sub>v</sub> 1.2	Syndrome de Timothy (cardiaque)
	Ca <sub>v</sub> 2.1	Ataxie de type 2
Récepteur à la glycine	GLRA1	Maladie des sursauts exagérés (ou hyperekplexie)
GABA	GABA <sub>A</sub>	Épilepsie juvénile
AchR	CHRNa4	Épilepsie nocturne du lobe frontal

Les canaux ioniques ont la particularité d'être la cible de nombreuses toxines naturelles comme la tétrodotoxine (toxine de divers poissons, grenouilles, crabes, etc) qui inhibent certains canaux  $Na_v$  ( $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$   $Na_v1.6$  et  $Na_v1.7$ ) ou comme la batrachotoxine (toxine de grenouille) qui va les activer, comme la  $\omega$ -conotoxine GVIA (toxine du cône géographe) qui cible les canaux  $Ca_v2.1$  ou la charybtoxine, une toxine de scorpion, qui va bloquer certains canaux potassiques  $K_{Ca}$ . L'étude de la fixation de ces molécules sur les canaux ioniques a permis de mieux comprendre leur fonctionnement et a permis d'identifier des sites d'action potentiels pour développer des médicaments susceptibles de modifier leur activité<sup>33</sup>.

Les canaux sont des cibles thérapeutiques importantes des anesthésiques locaux, comme la lidocaïne (Xylocaïne®), qui vont bloquer des canaux voltage-dépendants comme certains canaux potassiques ou calciques. De nombreux canaux sont localisés dans le système nerveux central ou périphérique, où ils ont notamment été identifiés comme des acteurs majeurs dans la signalisation de la nociception et de la douleur<sup>46</sup>. Un certain nombre de médicaments a donc été développé pour cibler ces maladies associées (dépression, épilepsie, maladies d'Alzheimer et de Parkinson, etc). Enfin, les canaux ioniques sont également ciblés pour le traitement de maladies cardiaques, comme le canal  $K_v11.1$  (plus connu sous le nom de hERG)<sup>28,33</sup>.

Les canaux ioniques restent toutefois largement sous exploités dans l'industrie du médicament, le nombre de canaux ciblés étant relativement faible si on considère le nombre de membres de cette large famille. Il existe donc un vivier important de cibles potentielles. De plus, de nombreuses molécules existantes sont faiblement sélectives et ont des niveaux de toxicité importants et une efficacité sub-optimale. De nombreuses nouvelles perspectives thérapeutiques sont donc envisageables.

Il apparaît donc que les RCPG et les canaux ioniques sont deux familles de protéines très importantes. De par le fort potentiel thérapeutique qu'elles présentent, elles intéressent largement la recherche et les industries pharmaceutiques où elles sont très étudiées. La partie suivante présente le processus et les différentes techniques associées à l'étude de protéines membranaires à des fins thérapeutiques.

## 2. L'intérêt de l'étude des PMs en solution

L'étude des PMs en solution sur du matériel purifié permet de simplifier les systèmes d'étude qui permettent d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues par les tests de criblage « classiques » utilisés par la recherche pharmaceutique et réalisés le plus souvent sur des systèmes complexes (comme des cellules entières). Ce point est développé dans une première partie. De même, l'utilisation de protéines purifiées est nécessaire pour la mise en œuvre de nombreuses techniques biochimiques et biophysiques permettant d'obtenir des informations précieuses sur la protéine elle-même (cet aspect fait l'objet d'une seconde partie), ouvrant alors de nouvelles opportunités d'abord pour la compréhension du fonctionnement de ces protéines et *in fine* pour la découverte de nouveaux médicaments.

### 2.1. La recherche pharmaceutique sur les PMs

Le développement d'un médicament est un processus long (de 10 à 15 ans) et extrêmement couteux (plus d'un milliard d'euros<sup>47</sup>). Historiquement, la recherche de nouveaux composés reposait sur le criblage d'un petit nombre de molécules dérivées de composés naturels actifs comme les ligands endogènes ou les molécules naturelles, sur des systèmes complexes (organes isolés ou animaux entiers). Depuis les années 80-90, cette approche a été abandonnée en faveur d'une approche à plus haut débit, plus moderne et rationnelle, basée sur des cibles moléculaires bien caractérisées<sup>48</sup>.

#### 2.1.1. Le processus de découverte de médicament

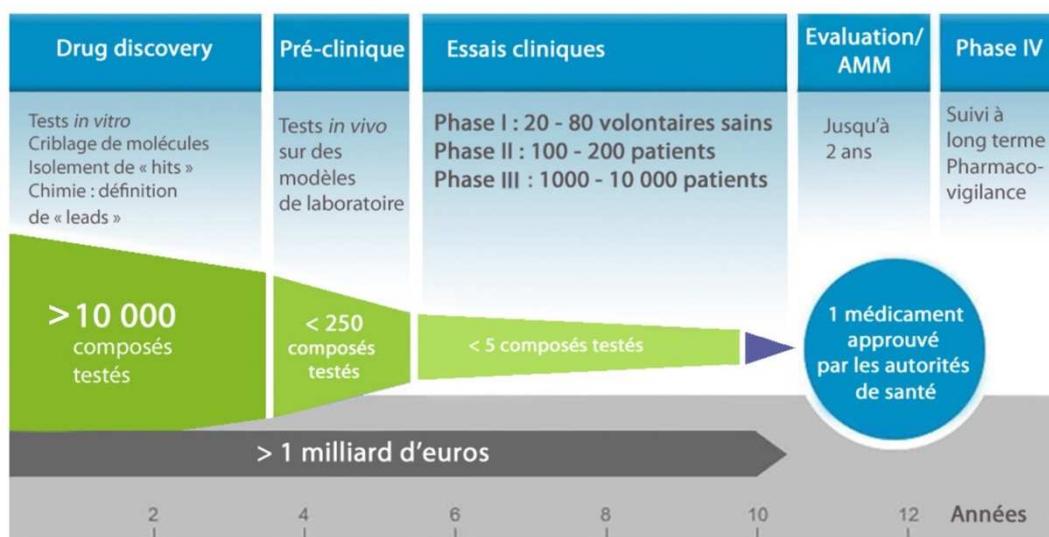
Le processus de découverte de médicament (ou *drug discovery*) est classiquement découpé en trois grandes phases : la recherche amont, le développement préclinique et le développement clinique<sup>48</sup>.

La **recherche amont** couvre de nombreux aspects impliqués aux premiers stades de la recherche de médicament. Cette phase va de la conception du projet et du choix de la cible moléculaire ou cellulaire, au développement des essais nécessaires au criblage (décris plus en détail dans le paragraphe suivant), au criblage de chimiothèques permettant l'identification de molécules actives (« *hit* ») puis à l'optimisation de ce *hit* en tête de série (« *lead* »). Ces *leads* montrent une meilleure sélectivité pour la cible, de meilleures propriétés pharmacocinétiques et une toxicité réduite par rapport aux *hits* initialement identifiés.

Le **développement préclinique** consiste en des études approfondies de pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et d'ADMETox (absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité) des *leads* sélectionnés. Ces tests sont réalisés *in vitro*, sur des lignées cellulaires adaptées et *in vivo*, chez au moins 2 espèces animales dont un non-rongeur. Ces études permettent d'évaluer les marges de sécurité du médicament résultant de la balance entre la détermination des doses toxiques ou induisant des effets secondaires et les doses ayant un effet thérapeutique. Cette étape inclut également l'optimisation des processus industriels pour la production à grande échelle, la vectorisation et la formulation du candidat médicament en vue des étapes cliniques.

Le **développement clinique** consiste à tester les candidats médicaments sélectionnés chez l'Homme selon 3 phases : la phase I, conduite chez des volontaires sains qui vise à déterminer la tolérance et la pharmacocinétique générale, la phase II qui est réalisée sur un petit groupe de patients et qui est destinée à évaluer l'efficacité de la molécule et à déterminer la dose thérapeutique optimale et enfin la phase III réalisée sur plusieurs milliers de patients, qui confirmeront la dose thérapeutique ainsi que la survenue d'éventuels effets indésirables.

Le succès dans les phases cliniques est très faible, de l'ordre de 5%, il est donc crucial d'optimiser les différentes étapes du processus. La Figure 10 reprend ces différentes étapes, en indiquant leur durée moyenne ainsi que le nombre de molécules impliquées.



**Figure 10. Le processus de développement d'un nouveau médicament.** Source : <https://www.synergielyoncancer.fr/les-enjeux/le-parcours-du-medicament>

## 2.1.2. Les techniques de criblage des molécules

Le processus du *drug discovery* repose souvent sur l'identification de composés se liant sur une cible biologique. Plusieurs outils sont actuellement utilisés par les acteurs de la recherche pharmaceutique : le criblage à haut débit (HTS, *high throughput screening*) et les approches assistées par ordinateur ou approches computationnelles incluant le développement de médicaments basé sur des données structurales (SBDD, *structure-based drug design*).

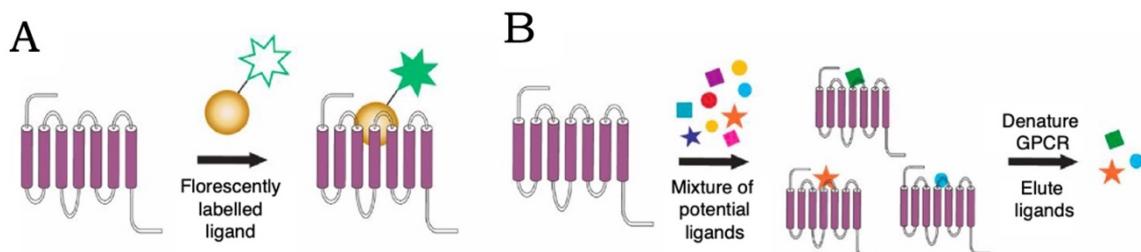
### 2.1.2.1. Le High Throughput Screening appliqué aux RCPG

Apparu au milieu des années 80, le criblage à haut débit n'a cessé d'évoluer depuis et est aujourd'hui encore une étape incontournable dans le processus de *drug discovery*. Les avancées scientifiques et technologiques majeures des années 80-90 comme l'émergence de la biologie moléculaire, la cristallographie des protéines ainsi que les avancées dans les équipements des laboratoires et en particulier les équipements automatisés de fluidique ont largement contribué à l'essor du HTS. Il fallait travailler plus vite, avec des coûts réduits et en augmentant la qualité des candidats médicaments pour étudier les multiples nouvelles cibles identifiées grâce à la biologie moléculaire.

Les éléments les plus critiques pour le succès d'une campagne de HTS sont le test mis en jeu et la qualité de la banque de composés testés. Un des challenges de l'évolution du HTS a donc été le développement de tests robustes, à haut débit et reproductibles. C'est notamment la miniaturisation des tests qui a permis de travailler dans des plaques 384, 1536 voire 3456 puits, réduisant ainsi le coût (moins de volume de réactif et moins de composés à tester par puit). Un grand nombre de tests différents sont disponibles pour les campagnes de HTS : des approches de liaisons de ligands, des tests d'activité enzymatique, l'étude d'interactions protéine-protéine, le transport d'ions ou de ligands ; le tout avec différents modes de détection : fluorescence, absorbance, luminescence, radioactivité, etc<sup>49</sup>. Quant aux banques de composés, elles n'ont cessé de se développer au fur et à mesure des années, avec des banques de plus de 2 millions de composés à l'heure actuelle. De nombreuses séries de directives et recommandations ont toutefois été éditées pour sélectionner des composés de qualité. Le concept de la « règle des cinq » publiée en 1997 par Lipinski et al.<sup>50</sup> a d'ailleurs été, et est toujours à l'heure actuelle, largement suivie pour inclure dans les banques des composés pouvant un jour devenir des médicaments actifs sur la base de critères pharmaco-chimiques (moins de 5 donneurs et moins de

10 accepteurs de liaisons hydrogènes, masse molaire inférieure à 500 g/mol et un logP (coefficient de partage octanol/eau) inférieur à 5).

Aujourd’hui, la majorité des approches HTS sur les RCPG sont basées sur des tests réalisés sur des cellules entières exprimant le récepteur de façon hétérologue. Ils reposent majoritairement sur la mesure de la concentration intracellulaire de messagers secondaires comme l’AMPc ou le calcium, qui traduit de l’activation des protéines G ou sur des tests indépendants des protéines G comme le recrutement de la  $\beta$ -arrestine<sup>51</sup>. Ces tests présentent toutefois des inconvénients et/ou limites comme l’identification de faux positifs ou de faux négatifs liés à l’environnement cellulaire complexe, pour ne citer qu’un exemple. Les tests de HTS sur récepteurs purifiés sur les RCPG sont basés majoritairement sur le criblage de ligands marqués par des molécules fluorescentes ou sur de la spectrométrie de masse d’affinité (Figure 11). Les tests *in vitro* restent toutefois compliqués et peu exploités à l’heure actuelle à cause de la faible stabilité des RCPG purifiés.



**Figure 11. Tests *in vitro* de HTS sur des RCPG.** (A) Essais basés sur des ligands marqués par un fluorophore activé lors de la liaison du ligand au récepteur. (B) Essais basés sur la spectrométrie de masse par affinité, où le RCPG est incubé avec des centaines de ligands potentiels. Les ligands liés au RCPG vont être élusés et analysés par chromatographie liquide/spectrométrie de masse. Figure modifiée d’après<sup>51</sup>.

En plus des stratégies traditionnelles cellulaires ou *in vitro*, les études *in silico* se développent de plus en plus. Ces approches de docking permettent de cibler virtuellement des millions de composés – 150 millions de molécules ont par exemple récemment été testées virtuellement sur le récepteur à la mélatonine 1 (MT1)<sup>52</sup> – pour en sélectionner un plus petit nombre pour les tests cellulaires ou biochimiques. Ces approches virtuelles sont toutefois plus efficaces lorsque la structure du RCPG est connue, ce qui est un facteur limitant étant donné que la structure de seuls 113 récepteurs a été résolue à ce jour (<https://gpcrdb.org/structure/statistics>, consulté la dernière fois le 12/11/2021).

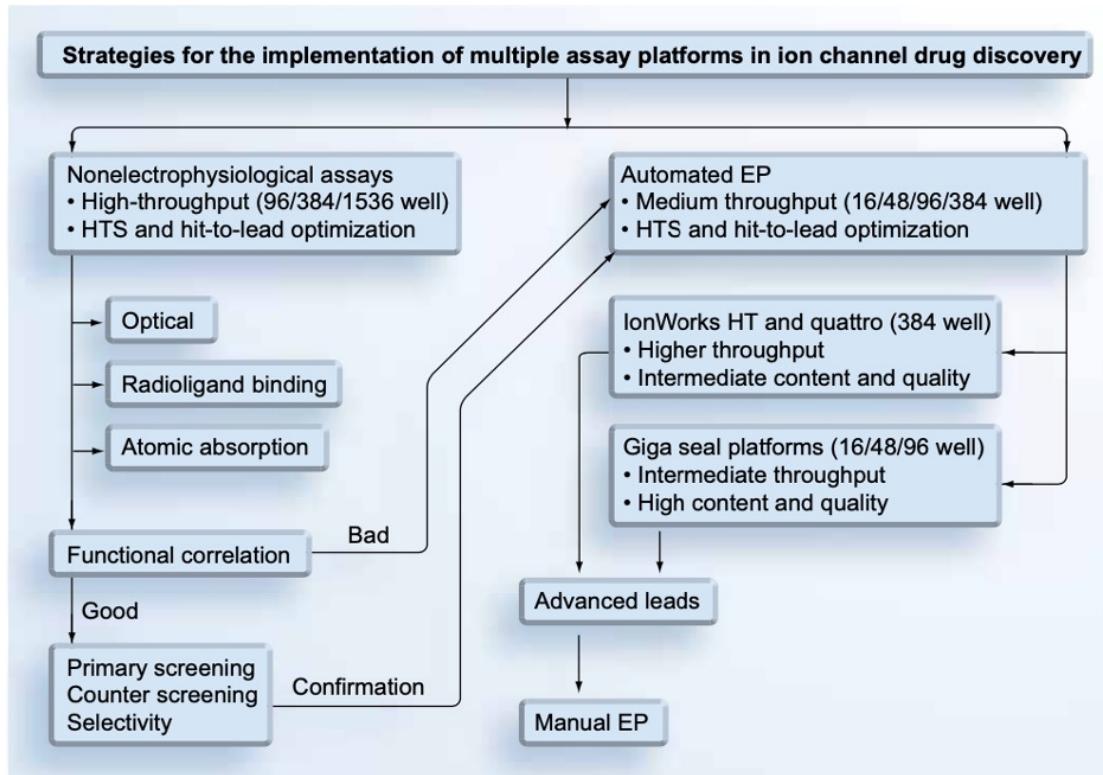


Figure 12. Les différentes méthodes employées pour la découverte de médicaments ciblant des canaux ioniques<sup>53</sup>.

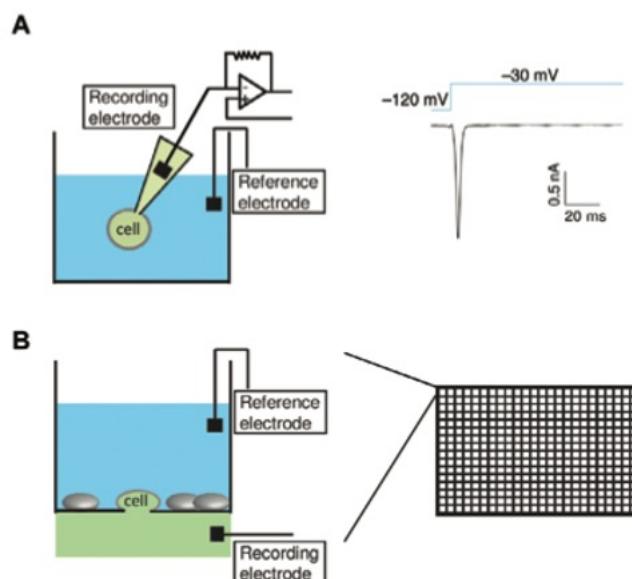


Figure 13. Comparaison entre le patch clamp conventionnel et le patch clamp automatisé. (A) Schéma de l'enregistrement de patch clamp manuel (gauche). Une cellule est enregistrée à l'aide d'une pipette de verre. Les composés à tester peuvent être appliqués dans la solution extracellulaire (en bleu). A droite : réponse représentative du canal Nav1.7 soumis à une impulsion de tension. (B) Schéma d'une expérience d'électrophysiologie automatisée basée sur un réseau planaire. Un signal est enregistré sur une cellule unique à travers un micropore dans un seul puit (à gauche) d'une puce contenant 384 puits (à droite). Les solutions extracellulaires (bleu) et intracellulaires (vert) peuvent être changées par perfusion. Figure modifiée d'après<sup>54</sup>

### 2.1.2.2. High Throughput Screening, les défis liés aux canaux ioniques

Si les criblages à haut débit sont bien établis pour les RCPG, ils sont moins développés pour les canaux ioniques. La méthode traditionnelle d'étude des canaux est basée sur une approche manuelle dite de « *patch clamp* », une procédure d'électrophysiologie développée dans les années 70 par Neher et Sakmann<sup>55</sup> qui permet de mesurer le courant à travers un canal unique. Cette méthode est toutefois techniquement très pointue, couteuse et longue, ce qui la rend incompatible avec des approches haut-débit. Deux stratégies majeures ont donc émergé pour cibler les canaux à plus haut débit (Figure 12). La première est basée sur des approches non-électrophysiologiques. Elles incluent les techniques mesurant les flux d'ions radioactifs puis remplacés au profit d'ions non radioactifs comme le rubidium Rb<sup>+</sup> afin de mesurer l'activité des canaux potassiques ou le lithium Li<sup>+</sup> pour les canaux sodiques. On trouve également les tests basés sur la spectroscopie de fluorescence ou le transfert d'énergie (FRET) avec des colorants sensibles au potentiel de la membrane ou encore par spectroscopie d'absorption atomique. Plus de détails sur ces différentes techniques sont disponibles dans la revue de Terstappen et collègues<sup>53</sup>. La deuxième stratégie est basée sur des approches électrophysiologiques automatisées et non plus manuelles. Les méthodes d'enregistrement basées sur des matrices planaires utilisant des enregistrements parallèles en format plaque ou puce (Figure 13), en combinaison avec des instruments permettant une automatisation complète, ont considérablement augmenté le débit et de multiples essais validés sur ces systèmes ont été intégrés avec succès dans les programmes de découverte de médicaments pour les canaux ioniques. Le *patch clamp* automatisé est largement appliqué aux tests de sécurité des médicaments contre les canaux hERG notamment. Ces techniques automatisées et l'instrumentation associée sont décrites dans diverses revues<sup>54,56</sup>. Malgré les progrès technologiques, les plateformes actuelles de *patch clamp* automatisé n'offrent pas un débit suffisant pour être utilisées comme outils primaires pour le criblage à très haut débit de millions de composés, l'ordre de grandeur du nombre de composés testé se situant plutôt autour de la centaine de milliers de composés (200 000 dans une étude ciblant les canaux Kv<sup>257</sup>), et le coût des instruments et des consommables reste élevé<sup>54</sup>. Le *patch clamp* automatisé est donc souvent utilisé en seconde intention, pour confirmer les hits trouvés lors des criblages primaires (Figure 12).

### 2.1.2.3. Les méthodes computationnelles

Afin d'accélérer le processus de découverte de médicaments, de réduire les coûts du HTS et le taux d'échecs, les techniques assistées par ordinateur (CADD, *computer-aided drug discovery*) ont intéressé les chercheurs et les entreprises pharmaceutiques. Au cours des dernières décennies, les technologies de détermination de structure comme la cristallographie aux rayons-X, la résonnance magnétique nucléaire (RMN) et plus récemment la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ont progressé rapidement, ouvrant ainsi une nouvelle ère dans la conception de médicament basée sur la structure (SBDD). C'est dans les années 90 que le développement de composés basés sur la structure (*structure-based*) est apparu avec les projets portant sur le virus d'immunodéficience humaine<sup>58</sup>. Cette technologie n'a pu être appliquée aux protéines membranaires que plus tard, avec la résolution des premières structures, en 1998 pour la première structure d'un canal ionique- le canal bactérien potassique KcsA<sup>59</sup>- et pour les RCPG en 2000 pour celle de la rhodopsine<sup>60</sup>, puis en 2007 pour celle du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique ( $\beta$ 2AR) <sup>61</sup>.

Malgré les récentes avancées technologiques majeures en matière de cristallisation et de cryo-EM, seule une petite fraction de structures est disponible à ce jour (par exemple 113 structures<sup>b</sup> seulement sont résolues sur les 800 RCPG humains identifiés). Deux méthodes computationnelles majeures sont utilisées pour la modélisation des protéines et la prédiction de structure : la modélisation par homologie et la modélisation *de novo*. La **modélisation comparative** (également connue sous le nom de modélisation homologique) découle de l'observation selon laquelle les protéines ayant des séquences d'acides aminés similaires ont tendance à adopter des structures 3D similaires. Par conséquent, il est possible de prédire la structure 3D d'une protéine en se basant uniquement sur sa séquence d'acides aminés et les structures 3D de protéines ayant des séquences similaires<sup>62</sup>. Il faut toutefois que l'identité de séquence soit d'au moins 30 % à 40 % pour que l'alignement soit fiable et la structure prédite de la protéine modèle correcte. Les exemples de structures 3D élucidées grâce à la modélisation comparative sont nombreux. Les plus souvent cités sont les modèles des canaux TRPV1<sup>63</sup> ou TRPM8<sup>64</sup> ou le canal Kv1.5<sup>65</sup>, tous établis sur la base de la structure du canal potassique Kv1.2. Cette méthode est également largement utilisée pour les RCPG<sup>66,67</sup>. **L'approche de**

---

<sup>b</sup> <https://gpcrdb.org/structure/statistics>, consulté pour la dernière fois le 12 décembre 2021

**novo** consiste quant à elle à créer de nouveaux composés chimiques se liant au site de liaison de la cible avec de bonnes affinités.

L'une des applications les plus courantes du SBDD pour l'identification d'interactions protéine-ligand est le **docking moléculaire**, qui prédit les conformations les plus probables d'un complexe ligand/cible. De même, l'identification de nouveaux ligands se base beaucoup sur le criblage virtuel reposant sur la structure (**structure-based virtual screening**) qui implique le docking de larges banques de composés virtuels sur des structures résolues ou des modèles d'homologie<sup>66</sup>. A l'inverse, il est également possible de se baser sur la structure du ligand et non sur celle de la protéine ciblée. Cette stratégie est couramment appliquée dans la découverte de médicaments, notamment lorsque les informations structurales sur la protéine cible ne sont pas disponibles. Le criblage virtuel basé sur le ligand (**ligand-based virtual screening**) utilise les informations sur les composés précédemment connus pour être actifs, en générant des **pharmacophores**, une compilation 3D de caractéristiques fonctionnelles ou structurelles associées à des activités biologiques<sup>68</sup>. De même, les méthodes basées sur le ligand incluent également la relation quantitative structure-activité (*quantitative structure activity relationship*) qui est une méthode de modélisation informatique ou mathématique visant à révéler les relations entre les activités biologiques et les propriétés structurales des composés chimiques. Enfin les approches *in silico* comprennent également la **modélisation moléculaire** (*molecular dynamics*, MD) qui est une technique permettant d'inclure la flexibilité des protéines, ce qui est particulièrement intéressant pour les RCPG et les canaux ioniques qui sont connus pour être hautement dynamiques. L'application des simulations de MD reste toutefois limitée dans la plupart des programmes de découverte de médicaments<sup>66</sup>.

Étant donné la prévalence des structures cristallines de RCPG parmi l'ensemble des classes de protéines membranaires, le SBDD est le plus avancé pour cette famille. Le relugolix est d'ailleurs le premier médicament oral, utilisé contre le cancer de la prostate, ayant été inventé sur la base d'études de docking en utilisant un modèle d'homologie du récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) basé sur la structure de la rhodopsine<sup>69</sup>. Pour les canaux ioniques et les transporteurs, le nombre de structures résolues plus faible limite le SBDD à la modélisation homologique. Avec l'essor des études structurales des dernières années (voir plus bas), il est toutefois raisonnable de penser que de nombreux médicaments dérivés du SBDD vont arriver en clinique dans les prochaines années.

#### 2.1.2.4. Fragment-based drug design

Mêlant HTS et méthodes *in silico*, le *drug design* basé sur les fragments (FBDD, *fragment-based drug discovery*) est apparu plus récemment comme une méthode intéressante pour identifier de nouveaux hits de petites tailles (typiquement entre 100 et 250 Da) permettant de couvrir plus efficacement l'espace chimique. Les grosses molécules comprennent de nombreux groupes fonctionnels qui peuvent présenter plus d'obstacles stériques ou de conflits électrostatiques dans le site de liaison que le fragment (Figure 14). Le FBDD pourrait donc atteindre des taux de réussite plus élevés que ceux du HTS conventionnel<sup>70</sup>.



**Figure 14. Comparaison entre HTS et FBDD.** Les fragments (en vert) couvrent plus efficacement l'espace chimique que le ligand (en rouge)<sup>71</sup>.

La mise en œuvre de cette approche de FBDD repose sur des méthodes de criblage adaptées à l'identification de ces fragments de faible affinité ( $\mu\text{M}$ - $\text{mM}$ ). Les molécules identifiées, ne présentant qu'une très faible affinité pour la cible thérapeutique, sont ensuite liées entre elles ou modifiées pour aboutir à des candidats médicaments, plus complexes et de meilleure activité et spécificité. Le FBDD est également fréquemment utilisé en combinaison avec le SBDD<sup>70</sup>. Une bibliothèque de fragments peut être conçue et criblée à l'aide d'une approche virtuelle, généralement le docking moléculaire.

Si cette approche est bien établie pour les protéines solubles et en particulier pour les protéases et les kinases - le vemurafenib, le premier médicament dérivé d'un fragment a d'ailleurs été approuvé en 2012 pour le traitement du mélanome<sup>72</sup> – elle est nettement moins développée à l'heure actuelle pour les protéines membranaires mais cette technique se développe rapidement<sup>73</sup>. Une méthode miniaturisée basée sur le screening de composés de basse affinité a d'ailleurs récemment été développée, en utilisant le récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub>, un RCPG, pour faire la preuve de concept<sup>74</sup>.

## 2.2. L'étude des PMs par des méthodes biophysiques

Les techniques biophysiques constituent des éléments clés dans l'étude des protéines et notamment des protéines membranaires, ainsi que dans les processus de développement de médicaments pour de nombreuses entreprises pharmaceutiques et laboratoires académiques<sup>75</sup>. Nous ne traiterons ici que d'un petit nombre de techniques, celles généralement les plus utilisées pour l'étude de PMs. Ces techniques sont souvent complémentaires et permettent d'obtenir des jeux de données les plus complètes possibles en fonction des besoins du chercheur.

L'une des méthodes la plus fréquemment utilisées pour évaluer l'homogénéité, la stabilité, la taille et l'état d'oligomérisation d'une protéine en solution est la diffusion dynamique de la lumière (DLS, *dynamic light scattering*). Récemment, une technique de DLS à haut débit a été développée, basée sur l'utilisation de plaques multi-puits permettant de cribler de nombreuses conditions de détergents en parallèle pour évaluer la stabilité de la protéine dans le temps<sup>76</sup>. La DLS a également été utilisée pour cribler et optimiser les conditions de reconstitution en nanodisques du récepteur A<sub>2</sub>A<sup>77</sup>.

L'état de repliement d'une protéine peut être évalué par **dichroïsme circulaire** (CD). Le spectre de CD va en effet donner des informations sur la structure secondaire des protéines, c'est à dire la composition en hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et repliements aléatoires. Le CD utilisant le rayonnement synchrotron (SRCD, *synchrotron radiation circular dichroism*) a par exemple permis de déterminer la structure complète, résidu par résidu, du domaine C-terminal du canal sodique bactérien NaChBac<sup>78</sup>.

La thermostabilité d'une protéine peut être mesurée par la méthode du **thermal shift assay** (TSA), aussi connue sous le nom de *differential scanning fluorimetry* (DSF). Les protéines sont soumises à des températures croissantes, et leur dénaturation est suivie à l'aide d'une sonde fluorescente, ce qui permet de mesurer leur point de fusion (T<sub>m</sub>), c'est-à-dire la température pour laquelle la moitié de la protéine est dénaturée. Les principales applications de cette technique sont d'améliorer les conditions de purification en testant la stabilité selon le tampon, le pH, la quantité de sel, le détergent, etc (comme Alexandrov et collègues l'ont fait pour l'apeline<sup>79</sup> par exemple), de comparer la stabilité de protéines mutantes (cette stratégie est très utilisée pour stabiliser les RCPG, comme cela a été fait pour le récepteur A<sub>2</sub>A<sup>80,81</sup>, le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique ( $\beta$ 1AR)<sup>82</sup> ou le récepteur à la neurotensine NTS1<sup>83</sup>), de

mesurer l'interaction avec des substrats, mais aussi la recherche et le criblage de ligands<sup>84</sup>. Cette méthode peut en effet être utilisée pour estimer l'affinité ( $K_D$ ) du ligand pour la protéine selon l'augmentation du  $T_m$ .

La composition, la masse moléculaire, la taille et l'état oligomérique d'une protéine membranaire en solution peuvent également être déterminées par la technique de **chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion multi-angles de la lumière (SEC-MALS, size exclusion chromatography multi-angle light scattering)**. Dans cette méthode, la SEC sert à séparer les molécules selon leur volume hydrodynamique. Toutefois, contrairement à la SEC classique, le poids moléculaire n'est pas déterminé selon le temps de rétention mais grâce au système MALS. Il implique un module de diffraction de la lumière et des détecteurs de l'indice de réfraction qui vont analyser les signaux reçus pour quantifier les propriétés physiques de la protéine. Une étude en SEC-MALS sur la protéine A<sub>2</sub>A a révélé que cette protéine forme différentes espèces d'oligomères<sup>85</sup>, mais relativement peu d'autres exemples sont disponibles sur des protéines membranaires eucaryotes par rapport aux protéines membranaires procaryotes<sup>86,87</sup>.

Bien que l'ensemble de ces techniques puisse théoriquement s'appliquer à n'importe quelle protéine membranaire, elles sont nettement plus utilisées dans l'étude des RCPG que dans celle des canaux ioniques. Ces derniers sont plutôt étudiés par électrophysiologie (voir le paragraphe « 2.1.2.2. High Throughput Screening, les défis liés aux canaux ioniques »).

## 2.3. Les études structurales

Le travail à partir de protéines purifiées permet d'obtenir de cruciales informations en termes de données structurales. Ces études ouvrent en effet la porte à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires dans lesquels les protéines membranaires sont impliquées. Ce type d'études, tout comme les études par des méthodes biophysiques, était beaucoup plus ardu que pour les protéines solubles du fait de nombreux facteurs comme la complexité liée à la nature hydrophobes de ces protéines, leur faible taux d'expression dans les tissus natifs ou dans les systèmes hétérologues de production ou la difficulté pour les extraire et surtout leur manque de stabilité en solution. Toutefois, de nombreuses stratégies et avancées technologiques se sont développées pour faire face à ces difficultés.

Les premières structures obtenues ont été celles pour lesquelles les protéines sont naturellement abondantes : le canal potassique KcsA de *Streptomyces lividans* en 1998<sup>59</sup>, l'ATP synthase purifiée en 1999 des membranes de mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>88</sup>, la rhodopsine bovine purifiée en 2000 des yeux de bovins<sup>60</sup> ou encore l'ATPase calcique extraite des muscles des pattes arrières du lapin en 2000<sup>89</sup>. La large majorité des protéines membranaires sont toutefois exprimées à de très faibles concentrations dans les tissus. Il a donc été nécessaire de **développer des systèmes de production** robustes et compatibles avec l'expression de protéines membranaires de mammifères qui ont permis la production de protéines recombinantes à des rendements compatibles avec les études structurales. Les systèmes qui utilisent des cellules d'insectes comme *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf21) ou *Trichoplusia ni* (Hi5) sont particulièrement utilisés et ont par exemple permis la détermination de 85% des structures résolues de RCPG<sup>90</sup>. Les avantages et inconvénients des divers systèmes de production incluant les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, les cellules d'insecte ou encore les systèmes acellulaires sont décrits dans diverses revues récentes<sup>69,90,91</sup>.

### 2.3.1. La cristallographie et les méthodes pour stabiliser les protéines

La méthode de choix pour la résolution de structures de protéines membranaires a longtemps été la **cristallographie aux rayons X**. Cette technique a été utilisée dans la résolution d'environ 80 % des structures disponibles. Ce succès peut s'expliquer par deux raisons principales : un développement technologique d'une nouvelle forme de cristallographie, la cristallographie en phase lipidique cubique (LCP, *Lipidic Cubic*

Phase) et le développement de différentes stratégies qui ont permis de faciliter l'obtention de cristaux en stabilisant les protéines membranaires.

### 2.3.1.1. La cristallographie par diffusion de vapeur et la LCP

La méthode traditionnelle la plus répandue pour cristalliser des protéines est la **diffusion de vapeur**. A l'heure actuelle, cette technique a été utilisée dans plus de 60% des structures de protéines membranaires, principalement par les techniques de gouttes suspendues (*hanging drop*) ou gouttes assises (*sitting drop*) où la cristallisation est médiée par l'équilibre de la vapeur entre la goutte de protéine et la solution de cristallisation. Pour essayer de pallier aux problèmes liés à la cristallisation de protéines membranaires solubilisées par des détergents et en particulier pour augmenter la stabilité de la protéine et donc le processus de formation des cristaux, la LCP ou cristallisation *in meso* a été développée en 1996 par Landau et Rosenbusch<sup>92</sup>. Cette méthode est basée sur la reconstitution de la protéine membranaire dans une bicouche lipidique continue (souvent constituée de monoacylglycérols) avant la cristallisation. La LCP a permis d'obtenir la structure à haute résolution de nombreux RCPG comme le  $\beta$ 2AR<sup>93</sup>, le récepteur A<sub>2A</sub><sup>94</sup>, le récepteur CXCR4<sup>95</sup>, ou le récepteur à l'histamine H1<sup>96</sup>. Bien qu'elle soit utilisée majoritairement pour l'étude des RCPG, cette technique se répand peu à peu pour l'étude d'autres protéines membranaires comme les transporteurs (comme le transporteur du glucose GLUT3<sup>97</sup>) mais reste peu utilisée pour l'étude des canaux ioniques.

### 2.3.1.2. Les différentes méthodes pour stabiliser les protéines

En parallèle du développement de la LCP, différentes méthodes ont été employées pour stabiliser les protéines membranaires en solution et ainsi faciliter leur utilisation pour déterminer leur structure. L'une des solutions qui a démontré son efficacité est l'**insertion de séquences stabilisatrices** comme le lysozyme T4 (T4L) ou l'apocytochrome b<sub>562</sub>RIL (BRIL). L'insertion du T4L à la place de la boucle intracellulaire 3 a d'ailleurs permis la résolution en 2007 de l'une des premières structures d'un GPCR non-rhodopsinien, le  $\beta$ <sub>2</sub>AR humain<sup>93</sup> puis de nombreuses autres structures depuis<sup>98-100</sup>. Si cette stratégie est surtout utilisée pour la famille des RCPG, l'insertion de la séquence BRIL a très récemment été utile pour la résolution de la structure de quelques canaux ioniques comme le nAChR et le canal KcsA<sup>101</sup> ou le canal aux ions chlorures du poisson-globe TMEM206<sup>102</sup>. En 2007, le laboratoire de Christopher Tate

met au point une **technologie stabilisatrice** appliquée aux RCPG, StaR™ (Stabilised Receptor)<sup>81,103</sup>, basée sur la mutation de quelques AAs dans la séquence de la protéine qui améliore considérablement sa thermostabilité (le Tm) sans changer ses propriétés de fixation de ligands des récepteurs. Cette technologie a été à l'origine de la création de la société Heptares Therapeutics (maintenant Sosei Heptares) et a connu un succès majeur ayant permis la résolution de la structure de nombreux récepteurs. A l'heure actuelle, on estime qu'un tiers de toutes les structures de RCPG publiées sont issues de mutants thermostabilisés<sup>104</sup>. De même, l'une des possibilités pour stabiliser une protéine est l'**ajout d'un ligand** agoniste ou antagoniste. Cette stratégie est beaucoup utilisée, aussi bien pour l'obtention de cristaux de RCPG<sup>105</sup> que de canaux ioniques, en particulier pour les canaux ligands-dépendants<sup>106,107</sup>. Enfin l'ajout d'anticorps ou de fragments d'anticorps comme agents stabilisants se développe de plus en plus<sup>108</sup>.

Si la cristallographie est depuis des années la méthode de référence pour la détermination de structures de protéines membranaires, elle est en phase d'être détrônée au profit de la cryo-EM.

### 2.3.2. *L'essor de la cryo-microscopie électronique*

Depuis 2013, la **cryo-EM** connaît un essor sans précédent grâce à l'invention du détecteur à électron direct et à des avancées dans le traitement des images<sup>109</sup>. Avant ces avancées technologiques, la cryo-EM pêchait par des niveaux de résolution assez faibles, peinant à passer sous la dizaine d'Angstrom, ne permettant donc pas d'études de SBDD. Ces dernières années marquent donc un tournant majeur dans la biologie structurale, avec un nombre de structures résolues par cryo-EM qui augmente de façon exponentielle (Figure 15). En 2020, le nombre de structures uniques résolues par cryo-EM représentait d'ailleurs les trois-quarts des structures des protéines membranaires, avec également une forte augmentation du nombre de structures de protéines de mammifères<sup>110</sup>. Ces récents progrès ont particulièrement profité aux canaux ioniques dont le nombre de structures uniques a explosé (plus de 100 structures). Un des exemples les plus frappants concerne la famille des TRP dont la quasi-totalité des structures a été obtenue par cryo-EM (Figure 16), dont de nombreuses structures récentes<sup>111</sup>. La structure du récepteur TRPV1 est d'ailleurs la première structure de protéine membranaire à avoir été résolue à basse résolution en 2013<sup>112,113</sup>. De même, les transporteurs et les RCPG font partie des familles de protéines dont le nombre de structures résolues par cryo-EM est le plus important

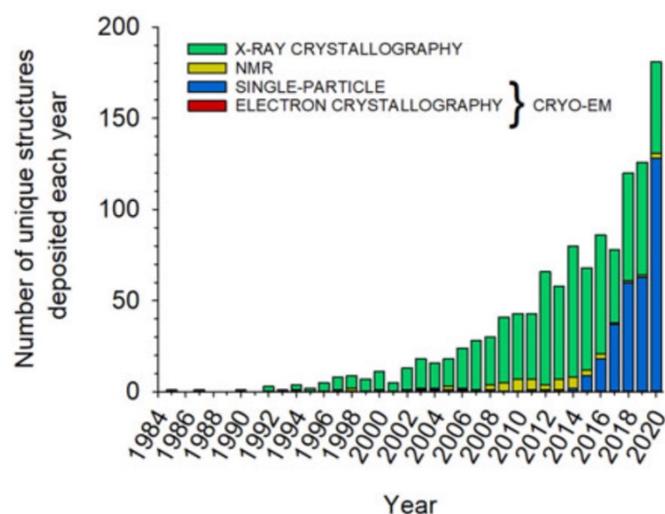


Figure 15. L'essor de la cryo-EM.

Nombre de structures uniques de protéine obtenues chaque année par cristallographie (vert), par RMN (jaune) ou par cryo-EM (bleu et rouge)<sup>110</sup>.

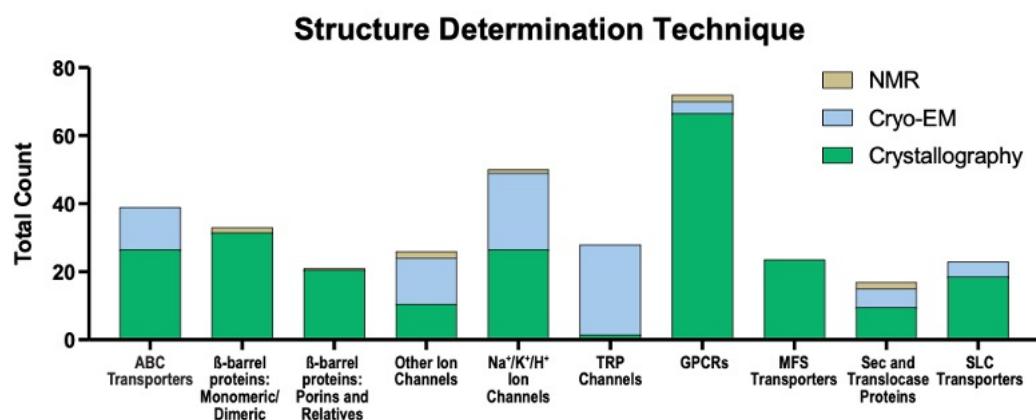


Figure 16. Les méthodes utilisées pour la détermination de structures uniques selon les différentes familles de protéines membranaires.<sup>114</sup>

avec notamment plus de 45 structures uniques de RCPG en moins de 5 ans<sup>c</sup>. Cette expansion majeure dans le domaine est d'autant plus importante qu'il s'agit de structures de complexes de signalisation associant ligands agonistes, récepteurs et protéines G, donnant accès aux détails moléculaires des interfaces entre les différents partenaires, et permettant également d'affiner la compréhension des mécanismes d'activation des protéines G hétérotrimériques<sup>115</sup>.

La cryo-EM présente toutefois deux limites principales : la taille des protéines analysables et les niveaux de résolution. Il est effectivement admis que le seuil limite pour résoudre une structure de protéine membranaire est aujourd'hui d'environ 100 kDa sans quoi les images deviennent trop difficiles à aligner. De même, les niveaux de résolution sont moins bons que ceux obtenus par cristallographie : en 2019 la moyenne des structures uniques de protéines membranaires obtenue par cryo-EM était de  $3,6 \pm 0,7 \text{ \AA}$  contre  $2,7 \pm 0,5 \text{ \AA}$  par cristallographie<sup>114</sup>. Les développements technologiques sont toutefois perpétuels et ont d'ailleurs récemment permis de descendre sous la barre symbolique des 2  $\text{\AA}$  pour une protéine membranaire humaine- le récepteur  $\beta 3 \text{ GABA}_A$ <sup>116</sup>- et on espère pouvoir rapidement atteindre la taille limite de 40 kDa, comme pour les protéines solubles.

### 2.3.3. *Les autres techniques*

Nous ne pouvons pas parler de résolution de structures 3D sans évoquer la **résonnance magnétique nucléaire** (RMN). La spectroscopie RMN est un outil puissant pour étudier les interactions atome-atome et, contrairement à la cristallographie qui ne donne qu'une image figée, elle peut apporter des informations sur la dynamique des protéines en enregistrant en temps réel les spectres d'échantillons, ainsi que sur la dynamique des interactions protéine-protéine et protéine-ligand. La RMN a toutefois été assez peu utilisée pour la résolution de structures de protéines membranes eucaryotes en raison de plusieurs contraintes. D'une part, la RMN n'est adaptée qu'à l'étude de protéines de petite taille, au maximum 100 kDa. De même, les temps de mesure sont longs et à des températures relativement hautes ce qui déstabilise très rapidement les protéines. De plus, il faut produire des protéines recombinantes uniformément marquées, typiquement au  $^{13}\text{C}$  et/ou au  $^{15}\text{N}$ , ce qui signifie donc de les produire dans un milieu minimum supplémenté en atomes lourds. Cela est possible dans les systèmes bactériens, mais beaucoup moins adapté aux

---

<sup>c</sup> [www.GPCRdb.org](http://www.GPCRdb.org)

systèmes de productions eucaryotes comme les cellules d'insectes ou les cellules de mammifères. Toutefois, cette stratégie de production en milieu minimum marqué est possible chez la levure, et elle a été utilisée avec succès au laboratoire pour produire une protéine membranaire humaine, le transporteur de cuivre CTR1 (**Publication 2**). De même, la RMN en phase solide et particulièrement la RMN à l'angle magique (MAS-NMR, *Magic Angle Spinning NMR*) se développe pour l'étude de protéines membranaires<sup>117,118</sup> et notamment de protéines eucaryotes (voire la **Publication 2**), en particulier grâce à la miniaturisation des rotors qui permettent à la fois de consommer moins de matériel biologique et d'augmenter les vitesses de rotations et donc les niveaux de résolution.

De plus, l'étude de la structure, de la dynamique et des interactions des protéines membranaires peut également être réalisée par **spectrométrie de masse** (MS). En particulier, la **MS native** (qui est basée sur l'utilisation de conditions d'ionisation non dénaturante) a récemment émergé comme une approche intéressante et complémentaire aux méthodes biophysiques et structurales classiques. Cette technique présente de nombreux avantages : elle est compatible pour l'étude de protéines de petite taille comme de gros complexes multiprotéiques, elle ne requiert que quelques microlitres de protéines à des concentrations de l'ordre de la dizaine de nanomolaires et elle ne nécessite pas de marquage des protéines ni de tags particuliers, permettant l'étude de protéines dans des conditions les plus natives possibles<sup>84</sup>.

Enfin, le développement de l'intelligence artificielle et de logiciels de prédiction de structures comme AlphaFold développé par la société Deepmind<sup>119</sup>, pourraient révolutionner le milieu de la biologie structurale et notamment des protéines membranaires.

A l'heure actuelle, on dispose de 1371 structures uniques de protéines membranaires<sup>120</sup>. Bien que ce chiffre soit en expansion, il reste toutefois assez faible au vu du nombre de protéines totales de la PDB (environ 2%) et la structure de nombreuses protéines membranaires reste encore non-résolue. Cela illustre bien le fait que, malgré les récents progrès technologiques, des études et des développements méthodologiques sont encore nécessaires pour faciliter la manipulation de protéines membranaires en solution.

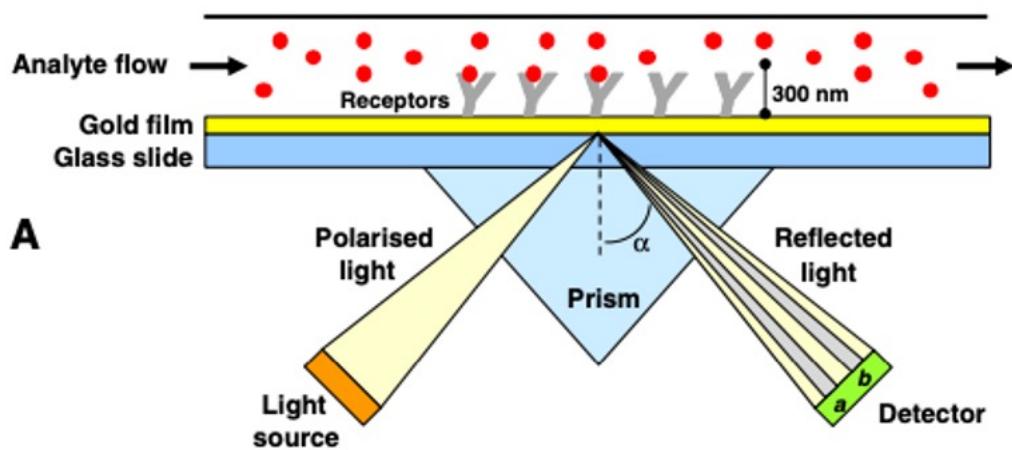
## 2.4. Les études d'interaction

Après avoir identifié des partenaires d'interactions, protéines ou ligands, lors des tests de HTS par exemple, il est idéalement indispensable de réaliser des études plus approfondies afin de déterminer les différents paramètres de liaison. Différentes techniques nécessitant de travailler sur des objets purifiés peuvent être employées, chacune apportant des informations différentes et/ou complémentaires. Loin d'être exhaustives, nous ne traiterons ici que des techniques les plus fréquemment employées.

Des tests de fixation de **ligands radioactifs** (ou radioligands) constituent une technique très utilisée pour étudier les interactions protéine-ligand grâce à sa grande sensibilité. Différents formats de tests permettent d'évaluer différents paramètres comme l'affinité d'un ligand ou sa nature agoniste ou antagoniste (en particulier pour les RCPG). Pour les canaux, les flux d'ions radioactifs comme le  $^{86}\text{Rb}$  étaient très utilisés dans les années 2000 pour évaluer les capacités de transport ionique des canaux. De même la technique de **SPA (Scintillation Proximity Assay)** est une technique polyvalente, basée sur la proximité entre un récepteur couplé à une bille et un radioligand qui va permettre la scintillation de la bille lorsqu'il va venir se fixer à son récepteur. Au laboratoire, cette technique a été utilisée pour évaluer la stabilité de nanodisques lipides de la protéine A<sub>2</sub>A à température ambiante<sup>74</sup>. Toutefois, les contraintes liées à la manipulation d'éléments radioactifs (habilitation, gestion des déchets, coûts importants) font que cette méthode est de moins en moins utilisée et est de plus en plus remplacée par d'autres techniques. Par ailleurs, elle nécessite de disposer de ligands radioactifs ce qui la limite à un petit nombre de protéines membranaires.

Les techniques basées sur la fluorescence sont l'une des alternatives les plus fréquemment employées pour étudier les protéines membranaires. Anisotropie de fluorescence, mesure de la fluorescence intrinsèque basée sur les AAs aromatiques, utilisation de fluorophores extrinsèques (sonde Bimane ou NBD), spectroscopie REES (*red edge excitation shift*), etc, ces techniques sont nombreuses<sup>121</sup> mais la plus répandue est certainement le **FRET (Förster Resonance Energy Transfer)** (ou son alternative le **BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)**), employée aussi bien pour l'étude des RCPG que des canaux ioniques. Cette technique est basée sur le transfert d'énergie entre deux partenaires, un donneur qui, une fois excité et s'il y a interaction entre les partenaires, va transmettre son énergie à un accepteur qui va

émettre de la fluorescence. Bien que ces techniques soient principalement utilisées dans des systèmes cellulaires pour suivre les interactions intra- et intermoléculaires, l'oligomérisation des protéines, les changements conformationnels ou encore la dynamique de l'interaction protéine-protéine, elles peuvent aussi être employées *in vitro*. Dans le cas des RCPG, les applications du FRET/BRET sont variées. Cette technique est utilisée aussi bien pour identifier des ligands, étudier les changements de conformation liés à leur liaison, ainsi que la cinétique de liaison, que pour étudier l'interaction entre RCPG/protéines G, RCPG/arrestine ou les protéines G individuelles ou encore pour étudier la dimérisation des récepteurs<sup>122,123</sup>. Le FRET est également largement utilisé pour l'étude des canaux ioniques notamment pour l'étude de la stoechiométrie et la composition des complexes protéiques. De plus, l'activation des canaux ioniques implique toujours des changements conformationnels complexes et le FRET s'est avéré être un outil très utile qui a permis d'obtenir des informations mécanistiques sur de nombreux canaux comme les récepteurs NMDA, les canaux Kv2.1, Cav1.2, P<sub>2</sub>X, etc<sup>124,125</sup>. Le FRET/BRET a aussi été employé sur des protéines purifiées reconstituées en liposomes (cf paragraphe « 3.2.1. Les vésicules lipidiques »).



**Figure 17. Principe de la SPR.** La fixation d'un analyte (plus communément appelé ligand pour les biochimistes) sur la protéine immobilisée va induire un changement de masse mesuré par une différence dans l'angle de réfraction de la lumière<sup>126</sup>.

La **résonnance plasmonique de surface** (SPR) est une technique ne nécessitant pas de marquage qui permet de mesurer en temps réel les constantes de liaisons d'un couple ligand/récepteur, mais apporte aussi des informations sur la cinétique de la réaction avec les constantes d'association et de dissociation. Cette technique nécessite l'immobilisation d'un des deux partenaires sur une puce tandis que l'autre partenaire est injecté à travers le système microfluidique. La liaison va être détectée à l'aide d'une méthode optique qui mesure les changements d'indice de réfraction à la surface du capteur lié au changement de masse induit par la liaison du deuxième partenaire (Figure 17).

Au vu de ses avantages indéniables – sa sensibilité, la faible quantité de matériel purifié requise - cette technique est beaucoup utilisée pour étudier les interactions protéine-ligand, aussi bien pour les RCPG que pour les canaux ioniques. A titre d'exemples, la SPR a été utilisée pour cibler des ligands de CCR5 et CXCR4 et déterminer leur cinétique et stœchiométrie d'interaction<sup>127</sup>, pour tester des RCPG thermostabilisés comme le récepteur A<sub>2</sub>A ou le  $\beta_1$ AR<sup>128</sup>, mais aussi pour étudier l'interaction entre la S-nitroso-L-cystéine et les canaux potassiques K<sub>V</sub><sup>129</sup>, pour identifier le motif responsable de la liaison de certaines toxines de scorpion aux canaux calcique Nav<sup>130</sup>, ou encore pour étudier la liaison de dinucléotides cycliques sur les canaux HCN4 et HCN2<sup>131</sup>. D'autres exemples sont décrits dans la revue de Patching<sup>126</sup>.

La SPR est toutefois une technique parfois compliquée à mettre en œuvre pour l'étude des protéines membranaires car de nombreux ligands sont des petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da. Les changements de masse à la surface de la puce et donc d'angle de réfraction sont infimes et parfois très difficiles à détecter et/ou à analyser.

L'obtention d'informations sur le site d'interaction protéine-protéine ou protéine-ligand est possible par **spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium (HDX-MS)**. Cette technique est basée sur l'échange de protons d'une protéine avec les atomes de deutérium de la solution deutérée dans laquelle celle-ci est placée. Le taux d'échange hydrogène-deutérium traduit donc l'exposition au solvant de la protéine et permet ainsi de déduire précisément une conformation donnée d'une protéine ainsi que le site de liaison d'un ligand. Cette technique a été employée avec succès pour l'étude d'une protéine membranaire en 2011 pour la première fois, avec l'étude des changements de conformation du  $\beta_2$ AR selon

différents ligands<sup>132</sup>. Depuis elle est de plus en plus utilisée, pour l'étude d'autres RCPG comme le récepteur au glucagon<sup>133</sup> par exemple, mais aussi de divers transporteurs<sup>134</sup> ou canaux ioniques<sup>129</sup>.

Toutes les techniques décrites ci-dessus, mais aussi les autres non détaillées comme la SAXS, qui donne des informations sur la taille et la forme des macromolécules et sur les changements conformationnels à grande échelle liés à la liaison d'un ligand, ou encore l'ITC, qui permet de mettre en évidence une interaction et d'en donner les paramètres thermodynamiques, permettent donc d'obtenir des informations robustes et intéressantes sur les protéines et leur partenaire d'interaction (ligand, petite molécule, protéine). Un des points critiques pour obtenir des données exploitables repose toutefois sur la stabilité et l'intégrité de la protéine membranaire étudiée durant le temps de l'analyse. Ce paramètre est d'ailleurs l'un des challenges actuels lié à l'étude des PMs. La partie suivante traite des différentes stratégies développées par les chercheurs pour faciliter l'étude des protéines membranaires, leur compréhension et *in fine* la découverte de nouveaux médicaments.

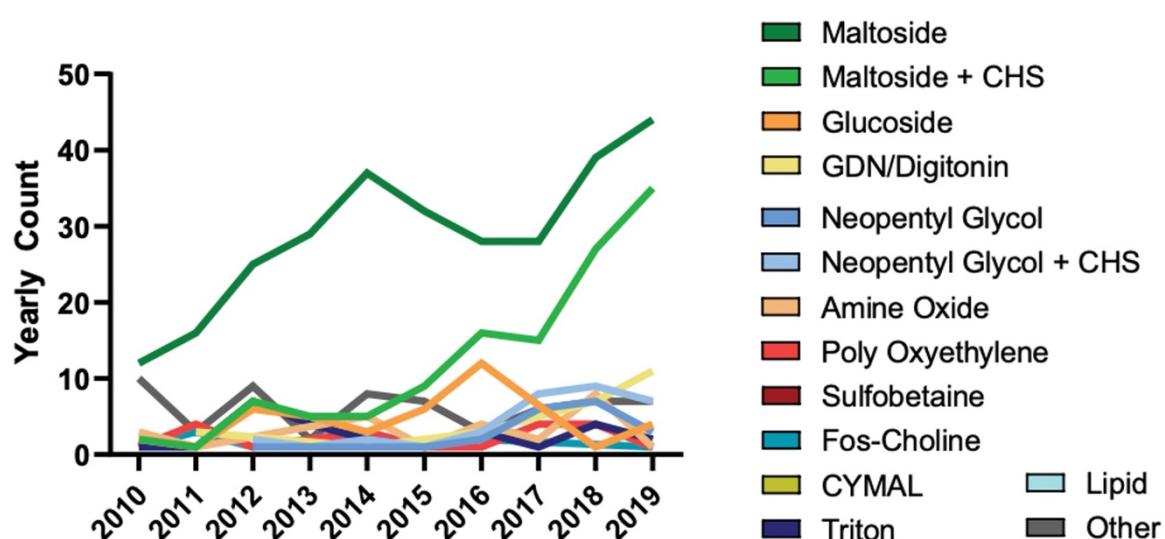


Figure 18. Tendances dans l'utilisation des détergents pour la solubilisation de PMs dont les structures uniques ont été résolues entre 2010 et 2019. Figure modifiée d'après<sup>114</sup>.

### 3. Les systèmes mimétiques de membranes pour l'étude des PMs

Afin de pouvoir être étudiées en solution, les protéines membranaires ont besoin d'être extraites de leur membrane native tout en étant maintenues en solution par des systèmes mimétiques de membranes. Nous présentons ici les systèmes les plus répandus.

#### 3.1. Les détergents comme composés mimétiques de la membrane

##### 3.1.1. Une méthode plébiscitée depuis de nombreuses années ...

Afin de solubiliser une protéine membranaire intégrale, la bicoche lipidique doit être rompue, classiquement grâce à l'action de détergents. Les détergents sont des molécules amphipatiques composées d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe formant des micelles dans une solution aqueuse au-delà d'une certaine concentration définie comme la concentration micellaire critique (CMC). Différentes catégories de détergents ont été développées au fil des années. La sélection d'un détergent en particulier dépend de nombreux paramètres dont les propriétés de la protéine d'intérêt, le système d'expression, la nature des lipides environnant et l'organisation de la membrane ou encore les analyses prévues.

Un certain nombre de détergents dont la structure et les propriétés physico-chimiques varient ont été développés. Ils constituent trois familles majoritaires : les détergents ioniques, les détergents non ioniques et les détergents zwiterioniques<sup>135</sup>.

Les détergents ioniques contiennent une tête avec une charge qui peut être cationique ou anionique, comme pour le sodium dodécylsulfate (SDS). S'ils sont extrêmement efficaces pour la solubilisation des protéines membranaires, ils sont presque toujours dénaturants. Les détergents non ioniques contiennent une tête polaire non chargée constituée de groupes polyoxyéthylène ou sucre. Ces détergents doux, qui ont moins tendance à dénaturer les protéines, sont les plus utilisés pour extraire les PMs. Les détergents zwiterioniques, dont font partie le CHAPS et le CHAPSO, portent une charge positive et une charge négative et combinent les propriétés des détergents ioniques et non-ioniques mais sont généralement plus dénaturants que ces derniers<sup>135</sup>.

Parmi tous les systèmes mimétiques de membranes, les détergents sont de loin les molécules les plus utilisées, notamment pour les études structurales des protéines (Figure 18). Ce sont les maltosides, et en particulier le N-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltoside

(DDM), qui ont été les plus plébiscités ces 10 dernières années pour solubiliser des protéines membranaires, dans près de 60 % des cas, et notamment largement dans le cadre des études par cristallographie aux rayons-X<sup>114</sup>. Pour les études par RMN en solution, ce sont les phosphocholines qui ont été largement plébiscités<sup>136</sup>. Enfin, pour les études par cryo-EM, c'est la digitonine qui est le détergent le plus populaire, suivie par le DDM<sup>110</sup>. Il est également intéressant de noter que, pour l'extraction de protéines membranaires eucaryotes en particulier, l'utilisation de maltosides est souvent combinée avec l'ajout d'un dérivé de cholestérol, le CHS (*cholesteryl hemisuccinate*) qui aiderait à la stabilisation de certaines PMs<sup>137</sup>. Au total, environ un tiers des PMs ont été solubilisées en présence de CHS et cela concerne particulièrement les RCPG et les canaux<sup>110</sup>. Enfin, un certain nombre de détergents de nouvelle génération sont régulièrement développés, comme des détergents contenant des atomes de fluor<sup>138</sup> ou encore la famille des maltooses néopentyl glycol dont fait partie le LMNG<sup>139</sup>.

### *3.1.2. ... mais qui a des limites*

Bien que l'utilisation de détergents soit la méthode la plus commune à l'heure actuelle pour l'étude de PMs en solution, des limites majeures se posent. Étant donné la grande variété de détergents actuellement disponibles, l'identification d'un détergent (ou d'un groupe de détergents) qui répond aux exigences spécifiques des protéines, en termes de stabilité et de fonctionnalité, peut être un processus laborieux d'essais et d'erreurs. De plus, la compatibilité d'un détergent pour maintenir la fonction d'une protéine ou plus simplement encore pour l'extraire des membranes doit être examinée au cas par cas, le détergent universel n'existant pas.

Qui plus est, la micelle de détergent est un système mimétique de la membrane assez éloigné de la membrane native. Par exemple, de nombreuses protéines membranaires ont besoin de la pression latérale présente dans la membrane qu'elles ne retrouvent pas dans les micelles<sup>140</sup>. De plus, pendant le processus d'extraction de la membrane, les détergents détachent les lipides membranaires des protéines, on parle de délipidation, ce qui peut impacter leur stabilité voire mener à leur inactivation. En effet, de plus en plus d'études pointent le rôle crucial des lipides à la fois dans la structure et dans la fonction d'un grand nombre de PMs<sup>141-143</sup>.

D'autre part, il est nécessaire de toujours travailler avec des tampons où la présence de détergent est maintenue au-dessus de sa concentration micellaire critique (CMC). Elle correspond à la concentration de détergent à laquelle la transition

entre les molécules de détergent libre et la structure micellaire s'effectue. En dessous de la CMC, les micelles se désassemblent menant à l'agrégation des protéines. La présence de détergents dans les tampons est toutefois incompatible avec certaines méthodes utilisées pour l'étude et la caractérisation des protéines en raison de leurs propriétés optiques ou de leur capacité à partitionner les autres substrats.

Enfin et non des moindres, la stabilité des protéines à moyen et long terme dans les micelles de détergent est généralement assez mauvaise, les détergents finissant par déstabiliser la protéine en perturbant les interactions internes de cette dernière, conduisant souvent à son agrégation et/ou dénaturation<sup>144</sup>.

### 3.2. Le développement d'approches « native-like »

#### 3.2.1. Les vésicules lipidiques (liposomes)

Comme le remplacement des lipides biologiques par d'autres surfactants est généralement préjudiciable à la stabilité des protéines membranaires, une alternative évidente a consisté à les réintroduire dans un environnement lipidique après purification. Deux stratégies majeures se distinguent : l'insertion des protéines membranaires dans des vésicules lipidiques (liposomes) et la formation de bicelles.

Les vésicules lipidiques ou **liposomes** sont des systèmes utilisés depuis le début des années 1970<sup>145-147</sup> pour l'étude des protéines membranaires et de la dynamique des membranes. L'équipe de Racker a reconstitué et démontré l'activité de la cytochrome oxydase des mitochondries du cœur de bovin et de l'ATPase calcium-dépendante du réticulum sarcoplasmique. Des années plus tard, à la fin des années 90, Rigaud et ses collègues ont poursuivi le développement du système et ont introduit un certain nombre de concepts qui constituent encore à l'heure actuelle la marche à suivre pour reconstituer des protéines dans des liposomes<sup>148,149</sup>.

On distingue plusieurs types de liposomes. Des structures avec de multiples bicouches concentriques se forment spontanément lors de la mise en suspension d'un film de phospholipides dans un tampon aqueux ; on parle de vésicules multi-lamellaires (MLVs). Les MLVs sont généralement peu utilisées pour les études biophysiques à cause de leur structure en forme d'oignon qui leur confère une grande hétérogénéité et donne peu accès aux couches lipidiques présentes au cœur de ces structures. On leur préfère souvent des liposomes plus uniformes, unilamellaire (ULVs), obtenus à partir des MLVs principalement par sonication ou par extrusion. La taille finale des ULVs dépend de la méthode de formation et de la composition en

phospholipides et varie entre les petites vésicules (SUVs) de 20 à 100 nm, les larges vésicules (LUVs) de 100 à 1000 nm et les vésicules géantes (GUVs) supérieures à 1000 nm. La reconstitution de protéines membranaires dans une bicouche lipidique a facilité l'étude d'un grand nombre d'entre elles, particulièrement pour les canaux ioniques, les transporteurs mais aussi les RCPG. La reconstitution du récepteur NTS1 dans des liposomes a par exemple permis de mettre en évidence l'importance de l'environnement lipidique et le rôle du cholestérol pour les propriétés de liaison de ligands du récepteur<sup>150</sup>. Cette même équipe a également étudié par FRET la dimérisation du NTS1R en fonction de la composition en lipides<sup>151</sup>. De plus, la reconstitution du récepteur muscarinique M2 sous forme de tétramères a permis de mettre en évidence que la signalisation par la voie des protéines G de ce récepteur a lieu lorsqu'il est sous forme d'oligomères plutôt que de monomères<sup>152</sup>. Enfin le compartiment interne aqueux permet d'encapsuler des composants solubles, ce qui a par exemple permis de reconstituer une voie de signalisation entière dans l'étude sur le récepteur muscarinique M1 co-reconstitué dans des liposomes avec la protéine G<sub>q/11</sub> et la sous unité  $\beta\gamma$  ainsi que la phospholipase C<sup>153</sup>.

La compartimentation de la phase aqueuse par la bicouche hydrophobe permet également aux liposomes de maintenir un potentiel de membrane, comme dans une cellule native, ce qui est particulièrement intéressant pour l'étude des canaux ioniques. Le flux ionique médié par les canaux à travers la membrane peut être détecté comme des changements des conditions ioniques dans l'espace intra ou extra-liposomal, fournissant des informations qualitatives sur le comportement des canaux. Les essais de flux sur liposomes (LFA, *liposome flux assay*) permettent d'obtenir des informations sur les propriétés fonctionnelles fondamentales des canaux, telles que la sélectivité ionique et les réponses aux activateurs ou aux inhibiteurs. Le développement d'un test de LFA par Su et collègues a par exemple permis d'identifier les premiers inhibiteurs de TRAAK et de nouveaux activateurs de Slo1<sup>154</sup>. Ces essais permettent également de déterminer l'implication des lipides dans la régulation des canaux ioniques<sup>155</sup>. De même des études par FRET ont permis l'évaluation en temps réel de la dynamique conformationnelle du canal KirBac1.1 reconstitué en liposomes<sup>156</sup>. Les liposomes sont également très utiles pour mesurer les flux de rubidium et de sodium radioactif<sup>156</sup> ou les flux de potassium<sup>155</sup>. Enfin les liposomes, généralement des GUVs, sont des outils intéressants pour faire du patch clamp. Un certain nombre de protocoles<sup>157-159</sup> et de revues<sup>160,161</sup> ont été publiés à ce sujet. Si ces méthodes ont d'abord été employées sur des canaux ioniques bactériens,

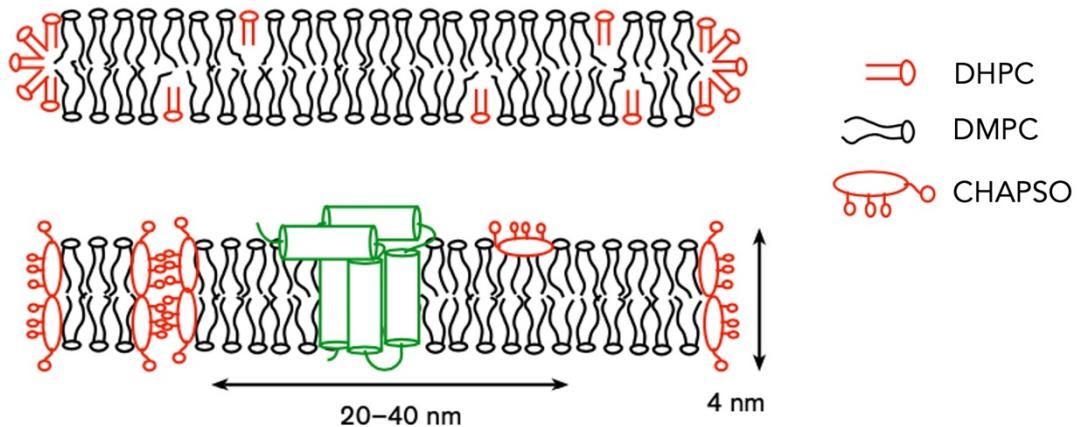
elles se répandent aussi pour l'étude de canaux eucaryotes comme pour le canal TRPV1<sup>113</sup> ou encore les canaux potassiques humains Kir2.1 et 2.2<sup>162</sup>.

De par leur grande taille, les protéoliposomes s'avèrent compatibles avec l'étude structurale et dynamique des protéines par RMN et en particulier par RMN du solide. Là encore, les protéines étudiées sont principalement bactériennes, avec notamment l'étude de la protéorhodopsine<sup>163</sup>, du canal potassique KcsA<sup>164,165</sup> ou encore de plusieurs tonneaux  $\beta$  comme AlkL<sup>166,167</sup>, VDAC<sup>168</sup> ou KpOmpA<sup>169</sup>. D'autres exemples sont décrits dans la revue de Schubeis et collègues<sup>118</sup>. Une des publications majeures au niveau des protéines eucaryotes concerne la structure du récepteur à la chimiokine CXCR1 obtenu en 2012 dans des liposomes de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)<sup>170,171</sup>. De même, une stratégie de reconstitution d'un transporteur de cuivre humain CTR1 en MLVs s'est très récemment montrée efficace pour obtenir des spectres par MAS-RMN (**Publication 2**). L'analyse des spectres est en cours et devrait permettre d'obtenir une structure à haute résolution de cette protéine. De plus, cette même stratégie a été appliquée au récepteur A<sub>2</sub>A ce qui a également permis d'obtenir des spectres du récepteur (travaux en cours au laboratoire).

Les liposomes présentent de nombreux avantages mais aussi certaines limites, comme notamment la difficulté de contrôler l'orientation de la protéine dans la bicouche lors de la reconstitution, ce qui peut s'avérer parfois critique dans certaines applications.

### 3.2.2. *Les bicelles*

Lorsque l'on mélange certains lipides et détergents, dans une certaine proportion, la distribution ne se fait pas de manière aléatoire pour former des micelles mixtes mais les lipides s'organisent en plaques de bicouches lipidiques entourées et saturées par le détergent. Dans les années 1990, des biophysiciens exploitent cette structure particulière en jouant sur le rapport lipide/détergent et sur la nature des lipides, formant ainsi des disques appelés **bicelles** qui pourraient fournir un environnement de type bicouche lipidique aux protéines membranaires. Les bicelles sont obtenues en mélangeant un ou plusieurs lipides et le tensioactif. Les lipides utilisés sont généralement du DMPC ou du diC6PC et le détergent le plus fréquemment utilisé est le CHAPSO (Figure 19).



**Figure 19. Composition et représentation schématique de bicelles.** En haut, représentation d'une bicelle de DHPC/DMPC. En bas, représentation d'une bicelle de CHAPSO/DMPC contenant un protéine membranaire intégrale (en vert)<sup>172</sup>.

L'une des propriétés les plus intéressantes des bicelles et exploitée pour les études RMN découle du fait qu'elles sont suffisamment grandes pour s'aligner dans le champ magnétique. Les bicelles ont donc été largement utilisées pour étudier l'interaction entre des molécules comme des médicaments ou des peptides qui interagissent avec la membrane, par RMN en solution et par RMN du solide<sup>172,173</sup>, mais cela n'a conduit à la résolution que d'un faible nombre de structures<sup>d</sup>. De même, les bicelles ont été exploitées pour la résolution de structures par cristallographie et la première structure d'une protéine membranaire en bicelles de DMPC/CHAPSO, la bacteriorhopsine, fut obtenue en 2002<sup>174</sup>. Cette approche a ensuite été étendue à d'autres types de protéines membranaires, comme le  $\beta_2$ AR<sup>61</sup> en 2007, ou encore des canaux ioniques, des transporteurs, des enzymes et des tonneaux  $\beta$  (voir la revue de Poulos et collègues, 2015<sup>175</sup>).

Toutefois, du fait de certaines contraintes techniques et du développement d'autres alternatives compatibles avec plus d'applications, l'étude de protéines membranaires dans des bicelles est relativement peu répandue à l'heure actuelle.

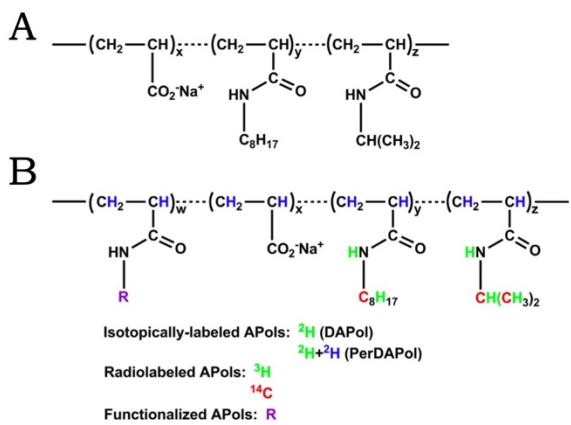
<sup>d</sup>voir <http://www.drorlist.com/nmr/MPNMR.html>

### 3.2.3. Les amphipols (APols)

#### 3.2.3.1. Propriétés générales des APols et des complexes PMs/APols

Afin d'améliorer la stabilité des PMs solubilisées, le laboratoire de Jean-Luc Popot a développé en 1996 une famille de courts polymères amphipathiques nommés **amphipols (APols)**<sup>176</sup>. L'idée initiale du concept des APols était de concevoir des molécules qui auraient une affinité si élevée pour la surface de la protéine qu'il ne serait plus nécessaire de maintenir la concentration de détergent au-dessus de sa CMC et que seules des traces de tensioactif libre dans la solution suffiraient à maintenir la protéine soluble. Une protéine membranaire transférée dans un tel environnement retiendrait donc plus facilement ses lipides, cofacteurs et/ou sous-unités associés et, par conséquent, devrait être fortement stabilisée<sup>144</sup>. Il a même été montré que les lipides ont tendance à se lier à nouveau à la protéine après qu'elle ait été transférée de sa micelle de détergents à l'APol<sup>177,178</sup>. De par leurs nombreux points de contact avec la surface transmembranaire des protéines, les APols ont, contrairement aux détergents, un faible taux de désorption spontanée<sup>144</sup>.

Les propriétés en solution des APols ont été extensivement étudiées et sont décrites dans diverses revues<sup>144,179,180</sup>. Parmi la série d'amphipols initialement développés<sup>176</sup>, le membre le plus étudié et le plus utilisé est de loin l'**A8-35**. Il est composé d'une courte chaîne de polyacrylates sur laquelle certains des carboxylates ont été greffés de manière aléatoire avec un groupement octylamine et d'autres avec un groupement isopropylamine (Figure 20), pour une taille moyenne d'environ 4,3 kDa<sup>181</sup>. Ils sont hautement solubles dans l'eau et la concentration critique d'association à laquelle les molécules individuelles d'A8-35 s'associent est très faible - 0,002 g/L<sup>182</sup> – permettant ainsi de travailler avec des tampons qui présentent des concentrations d'amphipols libres très faibles, voire sans surfactants<sup>179</sup>.



**Figure 20. Représentation schématique de l'amphipol A8-35 et de ses dérivés.** (A) Représentation de l'A8-35 composé de trois groupes différents répartis au hasard le long de la chaîne. (B) Dérivés de l'APol basés sur la même structure chimique<sup>180</sup>.

L'utilisation des amphipols est basée sur 2 stratégies distinctes : comme les APols n'ont pas ou peu de pouvoir solubilisant et n'extraient donc pas les protéines des membranes, ils sont utilisés soit pour piéger les PMs après qu'elles aient été solubilisées par des détergents afin de les stabiliser, soit pour replier correctement des protéines produites sous forme d'agrégats, principalement sous forme de corps d'inclusion, et solubilisées par du SDS. Le repliement de PMs médié par l'APol a été démontré pour la première fois en utilisant comme modèles OmpA et FomA solubilisées dans l'urée, deux protéines de type tonneaux  $\beta$  de la membrane externe provenant d'*Escherichia coli* et de *Fusobacterium nucleatum* et la bactériorhodposine extraite de la membrane pourpre d'*Halobacterium salinarum*<sup>183</sup>.

Quelle que soit la stratégie mise en oeuvre, les particules obtenues sont de petite taille, d'une dizaine de nanomètres, avec une couche assez fine de 1,5-2 nm d'amphipols, et ont été étudiées par différentes techniques. Les différentes applications des APols sont disponibles dans plusieurs revues<sup>144,179,180</sup>, nous traiterons ici brièvement des études fonctionnelles et de liaison de ligands, et les études structurales.

### 3.2.3.2. Études fonctionnelles et de liaison de ligands

L'un des avantages majeurs des amphipols est qu'il existe de nombreux dérivés fonctionnalisés : APols non ioniques, APols sulfonate, APols marqués radioactivement, APols fonctionnalisés par des fluorophores ou par divers tags comme la biotine ou polyhistidine, etc. De nombreux APols ont ainsi été développés et sont listés dans la revue de Le Bon et collègues<sup>180</sup>. Ils offrent donc de larges possibilités d'études, notamment pour fixer les PMs sur des supports solides pour diverses applications dont les études d'interaction ligand/protéine.

Différentes études de liaison de ligands et de détermination de propriétés fonctionnelles de différentes PMs reconstituées en APol ont été menées. Une des premières études est celle portant sur la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA1a), dans laquelle les auteurs ont montré que le complexe SERCA1a/APol n'interfère pas avec la liaison du calcium et de l'ATP<sup>184</sup> mais que l'activité ATPasique de la pompe est réversiblement inhibée par les APols si on compare à ce qui est observé dans les fragments de membranes ou en micelles de détergents<sup>185,186</sup>. De même, la liaison d'analogues de l'acétylcholine a montré que le nAChR piégé en A8-35 présente des transitions allostériques similaires à celles observées dans la membrane<sup>178</sup>. Enfin, l'intérêt des amphipols pour faciliter l'étude des RCPG a été

largement étudié<sup>187</sup>, aussi bien pour la stabilisation de récepteurs purifiés par des détergents puis piégés en amphipols, comme pour le récepteur à la vasopressine V2 (V2R)<sup>184</sup>, que pour le repliement de protéines produites sous forme de corps d'inclusion, par exemple pour les récepteurs 1 et 2 au leukotriène B<sub>4</sub> (BLT1 et BLT2), le récepteur à la sérotonine 5-HT4a ou le récepteur cannabinoïde 1 (CB1)<sup>188</sup>. Tous ces récepteurs sont capables de lier leurs ligands avec des affinités similaires à celles des récepteurs natifs.

Toutefois, bien qu'une étude<sup>189</sup> ait permis de montrer par FRET et GTPγS que le récepteur à la ghreline GHS1a (GHSR1a) replié grâce à un amphipol non ionique est capable de lier plusieurs ligands, de recruter l'arrestine-2 et d'activer la protéine G $\alpha_q$ , elle a aussi mis en lumière le fait que les APols chargés comme l'A8-35 génèrent des fortes liaisons non spécifiques ce qui interfère avec les études sur la liaison des ligands. De même, la cinétique d'interaction des protéines G avec les RCPG activés est ralentie en présence d'A8-35 (J-L Banères, données non publiées).

### 3.2.3.3. *Études structurales et analytiques des complexes PMs/APol*

Les complexes PMs/APols ont été utilisés dans différentes études structurales, notamment par RMN en solution et par cryo-EM. Parmi les premières études par RMN, on trouve celles réalisées sur OmpA<sup>190</sup> et OmpX<sup>191,192</sup>, des tonneaux  $\beta$  d'*E. coli*, qui ont permis de démontrer que l'A8-35 interagit spécifiquement avec la surface transmembranaire hydrophobe des PMs. De façon intéressante, des études réalisées par RMN sur la bactériorhodopsine ont montré des différences dans la structure et la dynamique des boucles extramembranaires selon que la protéine ait été solubilisée en détergent (DDM), reconstituée en A8-35 ou reconstituée en nanodisques<sup>193</sup>, suggérant que l'environnement dans lequel se trouve la protéine influe sur sa flexibilité. Parmi la famille des RCPG, le repliement et la stabilisation de BLT2 par un dérivé deutéré de l'A8-35 (le DAPol) ont permis la détermination de la structure 3D de deux agonistes, le LTB4 et le 12-HHT, en interaction avec le récepteur<sup>194</sup>.

Le côté stabilisant qu'ils apportent aux protéines rend les complexes PMs/APols particulièrement adaptés à des études par cryo-EM (pour une revue récente, voir Popot 2018, chapitre 12<sup>195</sup> ou Le Bon et collègues, 2021<sup>110</sup>). L'utilisation d'APols a été rapportée dans plus de 100 études de microscopie électronique dont une soixantaine avec une résolution inférieure à 5 Å<sup>110</sup>. Les APols ont été particulièrement utilisés pour l'étude des canaux TRP<sup>114</sup>. L'utilisation de l'A8-35 a d'ailleurs permis la résolution des

premières structures à haute résolution du canal TRPV1, les auteurs ayant montré que les classes d'images des particules colorées négativement étaient d'une forme générale beaucoup plus homogène pour les canaux piégés en A8-35 que les canaux en micelles de DDM, suggérant là encore une stabilisation des protéines<sup>112,113</sup>. Parmi les autres canaux de cette famille dont la structure est inférieure à 5 Å, on pourra également citer le canal PC2 (polycustin-2), stabilisé en A8-35 et résolu à 4,2 Å, le canal humain TRPV6 récemment étudié reconstitué en nanodisque ou en amphipol, avec des structures respectivement à 3,6 Å et 4,0 Å<sup>110</sup> ou encore le canal TRPA1. Le canal TRPA1 a été étudié d'abord par EM à coloration négative en A8-35, ces travaux ayant conduit à une structure à une résolution d'environ 16 Å révélant l'arrangement de ses sous-unités et débouchant sur des hypothèses sur les changements de conformation qui conduisent à l'activation du canal<sup>196</sup>. Plus récemment, ce canal a été étudié par cryo-EM en amphipol PMAL-C8 en liaison avec un agoniste et à un ou deux antagonistes, et ayant donné des structures à 4,24 Å, 3,9 Å et 4,7 Å respectivement<sup>197</sup>. Les exemples pour lesquels le transfert de la protéine membranaire de sa micelle de détergent à un amphipol a permis d'obtenir une structure à une meilleure résolution sont nombreux. Divers exemples sont décrits dans les revues citées précédemment.

Certains exemples de PMs stabilisées dans l'A8-35 ou dans d'autres amphipols<sup>198</sup> et étudiées par spectrométrie de masse par ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)<sup>199,200</sup> ou par ionisation par électronébuliseur (ESI, electron spray ionization)<sup>201</sup> sont également disponibles dans la littérature. Toutefois, les complexes protéines/APols semblent peu adaptés à la résolution de structures par cristallographie aux rayons-X<sup>179,195</sup>.

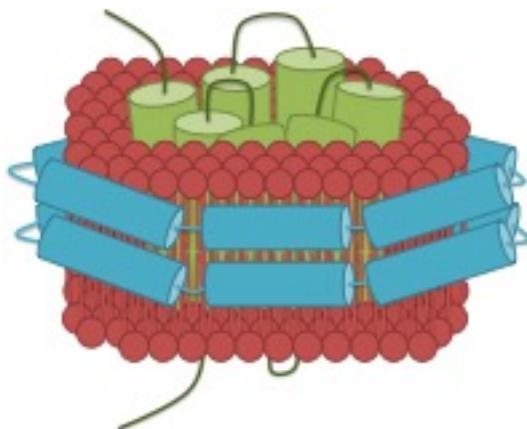
Il apparaît donc que la gamme d'applications qui peuvent tirer des bénéfices de l'utilisation d'APols est large : faciliter la production de PMs correctement repliées, stabiliser les PMs en comparaison aux détergents pour les études fonctionnelles et structurales mais aussi assister la production en système acellulaire ou encore pour des applications biomédicales (ces deux derniers points sont détaillés dans plusieurs revues<sup>179,195</sup>). De même, les propriétés intrinsèques des APols, ou celles qui peuvent leur être conférées par marquage ou fonctionnalisation, ouvrent la voie à une très large gamme d'applications originales, hors de portée ou peu pratiques avec les micelles de détergents.

Si les avantages des APols sont donc nombreux, ce système présente toutefois quelques limites. Tout d'abord, les amphipols n'ont que peu d'avantages par rapport aux détergents au niveau de la représentation physiologique de la bicouche lipidique, par l'absence, par exemple, de la courbure de la membrane (comme pour d'autres systèmes) ou des effets électrostatiques des phospholipides. Outre le recrutement des protéines G parfois altéré dans les protéines reconstituées en amphipols (J-L Banères, données non publiées), il a été observé dans les structures du canal ionique TRPV2 que les amphipols resserraient la structure globale en empêchant les changements de conformation dans le domaine transmembranaire<sup>202</sup>. Cela suggère donc que l'utilisation de ces amphipols pourrait interférer avec des études de dynamique des protéines membranaires. Enfin, les amphipols n'ayant peu ou pas de pouvoir de solubilisation, l'utilisation de détergents reste obligatoire, aussi bien pour extraire les protéines des membranes que les replier à partir de corps d'inclusion par du SDS.

### 3.2.4. *Les nanodisques*

#### 3.2.4.1. *Propriétés générales des nanodisques*

C'est en 2002 que Sligar et ses collègues décrivent pour la première fois la reconstitution d'une protéine membranaire intégrale dans des phospholipides, le tout ceinturé par une protéine dérivée de l'apolipoprotéine A1 (ApoA-1), la protéine d'échafaudage membranaire MSP (*membrane scaffold protein*) formant une nanoparticule nommée nanodisque<sup>203</sup>. Les nanodisques ont généralement un diamètre de 8 à 16 nm<sup>204</sup> et sont composés d'une bicouche phospholipidique discoïdale entourée d'une ceinture constituée de deux molécules de MSP (Figure 21). Les séquences initiales des MSP étaient basées sur l'apolipoprotéine A1 du sérum humain, composant des particules de lipoprotéines de haute densité (HDL), typiquement constituées de répétitions hélicoïdales de 22 résidus. Les protéines membranaires à l'intérieur des nanodisques sont stables grâce à la forte interaction entre les résidus hydrophobes de la MSP et les chaînes acyles des lipides. La très faible solubilité des lipides dans l'eau permet un échange lipidique lent entre les nanodisques en solution. Par ailleurs, la stabilité de l'hélice amphipathique de la MSP liée aux lipides contribue à la résistance des nanodisques à l'agrégation dans des conditions ambiantes.



**Figure 21. Représentation schématique d'un nanodisque.** La protéine membranaire (en vert) est encerclée par une bicouche de lipides (en rouge). Le tout est ceinturé par deux molécules de MSP dont les différentes hélices sont représentées en bleu.

De nombreux protocoles détaillant la reconstitution d'une protéine membranaire dans des nanodisques sont disponibles dans la littérature<sup>205-207</sup>. Dans la plupart des cas, la protéine est d'abord extraite et purifiée en détergent avant d'être reconstituée en nanodisques. La reconstitution fait intervenir plusieurs paramètres spécifiques comme le rapport stœchiométrique entre la MSP, les lipides et la protéine cible ou encore la taille de la MSP qui influe sur la taille du nanodisque. En effet, le choix de la MSP et donc de sa longueur définit le diamètre du disque, qui peut être diminué ou augmenté en supprimant ou en insérant des hélices amphipatiques, comme démontré par gel filtration et par SAXS<sup>208</sup>. Les lipides les plus couramment utilisés sont des lipides synthétiques dérivés de la phosphatidylcholine (PC) comme le DMPC, le DPPC ou le POPC ainsi que des phospholipides chargés comme la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidyléthanolamine (PE) ou le phosphatidylinositol (PIP). Il est également possible d'utiliser des lipides venant de sources naturelles comme les lipides totaux d'*E. coli*, ou des lipides de soja et d'œuf de poulet.

Les nanodisques présentent de nombreux avantages : ils offrent la stabilité, la pression latérale et la présence d'un arrangement de bicouche lipidique, par rapport à l'environnement plus hétérogène que l'on trouve dans les micelles de détergents et les bicelles. La taille des nanodisques est monodisperse, ce qui est avantageux pour les études spectroscopiques des protéines cibles. De plus, les nanodisques peuvent être fonctionnalisés par l'intermédiaire de la MSP, par des biotines par exemple, permettant leur immobilisation sur des supports, en tirant profit de l'interaction biotine-streptavidine par exemple<sup>74</sup>. Ainsi, les deux côtés de la protéine sont accessibles, ce qui est intéressant pour les études de liaison de ligands. De même, le choix des lipides composant le nanodisque est assez libre, et peut permettre de

réaliser des études d'interaction entre certains lipides spécifiquement et la protéine d'intérêt. Enfin, les protéines reconstituées ont une stabilité et une durée de vie prolongée, ce qui a permis de réaliser de nombreuses études fonctionnelles et structurales. En 2020, près de 1200 publications traitaient des nanodisques et de leurs utilisations<sup>209</sup>. Nous ne donnerons ici qu'un très bref aperçu des applications fonctionnelles et structurales décrites. Des revues abordent de façon beaucoup plus exhaustive ce sujet<sup>204,210,211</sup>.

### 3.2.4.2. Les études fonctionnelles

La communauté scientifique a largement exploité le potentiel des nanodisques dans l'étude de nombreuses familles de protéines dont les RCPG. La preuve de concept de la reconstitution d'un RCPG a été établie avec 2 études en 2006 et 2007 sur le  $\beta_2$ AR, reconstitué dans le premier cas dans un nanodisque de POPC et MSP1<sup>212</sup> et dans le deuxième cas dans un nanodisque de POPC/POPG avec l'apoA-1 native<sup>213</sup>. Dans les deux cas, le récepteur était fonctionnel au regard de sa liaison de ligands et de l'échange de nucléotides au niveau de la protéine G<sub>s</sub>. Depuis, un grand nombre de RCPG ont pu être reconstitués avec succès et ont été étudiés par diverses méthodes biochimiques et biophysiques. La revue récente de Lavington et Watts compile dans un tableau les publications les plus notables<sup>211</sup>. Dans l'ensemble, la littérature montre que les RCPG reconstitués sont capables de lier leur ligand, comme étudié par diverses techniques (radioactivité, SPR ou SPA) pour le récepteur au glutamate mGluR2<sup>214</sup>, le GHSR<sup>215</sup>, le récepteur A<sub>2A</sub><sup>216</sup> ou encore le récepteur mu aux opioïdes  $\mu$ OR<sup>217</sup>. Ils sont également capables de recruter leur protéine G, comme montré pour le mGluR2<sup>214</sup>, le  $\mu$ OR<sup>217</sup>, le NTSR1<sup>218</sup>, le GHSR<sup>215</sup> ou le récepteur muscarinique M2<sup>215</sup>, et/ou l'arrestine<sup>215,219</sup>. De même, de nombreuses études ont été réalisées pour évaluer la modulation des lipides sur le couplage aux protéines G ou sur la liaison de ligands, comme pour le NTSR1<sup>220,221</sup> ou le  $\beta_2$ AR<sup>222,223</sup>. Outre les RCPG, l'importance de la présence de lipides autour de la protéine cible a pu être évaluée pour d'autres protéines comme le transporteur TAP<sup>224</sup> ou le transporteur ABC MsbA<sup>225</sup>. Les nanodisques se révèlent également très utiles dans les études de liaisons par SPR car ils peuvent être immobilisés sur la surface de la puce en utilisant les tags d'affinité contenus sur la MSP. On peut par exemple citer l'étude de la cinétique d'interaction entre la toxine cholérique et le récepteur glycolipidique G<sub>M1</sub><sup>226</sup> ou le criblage entre le cytochrome P4503A4 et diverses molécules<sup>227</sup>, ou contre un anticorps<sup>228</sup>.

### 3.2.4.3. Études structurales et analytiques

La reconstitution de PMs a permis la réalisation de nombreuses études biophysiques et structurales sur diverses protéines par des méthodes variées.

Si les nanodisques se prêtent assez peu à la cristallographie aux rayons X, leur homogénéité de taille a permis d'obtenir de nombreuses structures de haute résolution par microscopie électronique. En effet, plus d'une centaine de structures à moins de 5 Å ont été obtenues à partir de nanodisques. En 2019 et 2020, les nanodisques ont d'ailleurs été le système le plus utilisé pour l'étude de particules uniques par cryo-EM<sup>110</sup>. Parmi les familles de protéines pour lesquelles les nanodisques ont été les plus utilisés lors de ces études structurales, on retrouve les canaux, les transporteurs ABC, les ATPases, les récepteurs Cys-loop et les membres de la famille TMEM16<sup>110</sup>. Parmi les canaux, il est intéressant de noter la prévalence de l'utilisation de nanodisques dans la famille des TRPs, avec plus de 20 % de structures obtenues à partir de ce système<sup>114</sup>. Un des exemples fréquemment cités est également celui du récepteur de la ryanodine qui a révélé l'ordre des hélices transmembranaires<sup>229</sup>. Quelques structures de RCPG en nanodisques ont également été obtenues assez récemment à partir de récepteurs en complexe avec leur protéine G comme pour le D2DR dont la structure a été obtenue avec la protéine G<sub>i</sub><sup>230</sup>, ou avec l'arrestine comme pour le  $\beta_1$ AR<sup>231</sup> ou le récepteur muscarinique M2<sup>232</sup> ou encore à partir de dimères de récepteurs pour la rhodopsine<sup>233</sup>.

Les nanodisques sont également analysables par RMN en solution ou RNM du solide comme cela a été montré pour la première fois dès 2006 sur des nanodisques vides, permettant ainsi de déterminer la conformation adoptée par la MSP<sup>234</sup>. Ces deux techniques ont été plus largement adoptées ces dernières années pour étudier des nanodisques et révéler des détails sur la structure des protéines mais surtout pour donner des informations sur leur dynamique conformationnelle. Si ces stratégies ont été assez répandues dans l'étude d'un certain nombre de protéines, comme pour le récepteur de la famille du récepteur au *Tumor Necrosis Factor p75NTR*<sup>235</sup>, pour le cytochrome P450 en complexe avec le cytochrome  $b_5$ <sup>236</sup> ou encore pour un certain nombre de protéines bactériennes<sup>237-239</sup>, des optimisations dans la préparation des nanodisques ont parfois été nécessaires, notamment pour les RCPG. Par exemple, le récepteur BLT2 a été marqué isotopiquement et assemblé dans des nanodisques composés de DMPC partiellement deutéré et de CHS protoné ainsi que de MSP protonée<sup>240</sup>. De plus, les changements de conformations liés à la fixation d'un ligand

par exemple ont pu être déterminés pour différentes protéines comme un transporteur de maltose<sup>241</sup> ou encore pour le  $\beta_2$ AR<sup>242</sup>, de même que le domaine d'interaction entre le CCR1 et CCR5 et leur ligand MIP-1 $\alpha$ <sup>243</sup>.

Sans rentrer dans les détails, les complexes protéines/nanodisques ont également pu être analysés par d'autres techniques incluant le FRET sur particule unique<sup>244</sup>, la spectroscopie de force sur molécule unique<sup>245</sup>, la SAXS<sup>246-248</sup>, ou encore les spectroscopies par résonance de spin électronique comme la résonance paramagnétique électrique (EPR)<sup>249</sup> ou la spectroscopie DEER (*double electron-electron resonance*)<sup>250,251</sup>.

Ainsi, il apparaît que les nanodisques présentent de nombreux avantages qui permettent d'étudier les protéines membranaires par des méthodes variées. Toutefois, les procédures de reconstitution des protéines en nanodisques nécessitent l'utilisation de détergent pour extraire les protéines des membranes. De même, l'environnement lipidique de la nanoparticule, bien que contrôlé, n'est pas une imitation exacte de la bicouche lipidique native et l'interaction avec les lipides exogènes peut différer de celle avec les lipides natifs. Enfin, la structure de la MSP peut interférer avec celle de la protéine pour les expériences d'EPR et de RMN<sup>252</sup>.

### 3.2.5. *Les copolymères de styrène et acide maléique*

C'est en 2009 que l'utilisation de **copolymères de styrène et d'acide maléique (SMA)** pour l'extraction des protéines membranaires a été rapportée pour la première fois<sup>253</sup>, avec comme modèle d'étude la bactériorhodopsine et le tonneau  $\beta$  PagP, solubilisés à partir de membranes pourpres de *H. salinarum* fusionnée à de la DMPC et de MLV reconstituées respectivement. Les copolymères de SMA sont des polymères amphipathiques comprenant des groupements de styrène hydrophobe et des groupes d'acide maléique hydrophile, généralement dans un rapport styrène/acide maléique de 2:1 ou 3:1, les plus connus et utilisés étant le SMA 2000 et le SMA 3000. Le SMA s'insère dans les membranes et forme des petits disques de membrane entourés par le polymère, appelés particules lipidiques de SMA (SMALPs)<sup>254</sup>, plutôt que de perturber les interactions hydrophobes entre la protéine membranaire et les lipides membranaires comme le font les détergents. On les retrouve aussi parfois sous l'appellation de lipodisques<sup>255</sup>, de nanodisques natifs<sup>256</sup> ou de PoLiPa<sup>257</sup>. Les protéines membranaires extraites dans les SMALPs conservent donc leur environnement natif de bicouche lipidique, tout en étant dans petites particules solubles compatibles avec de nombreuses techniques de caractérisation en aval<sup>258</sup>.

Un des autres avantages majeurs des SMALPs est qu'ils ne nécessitent pas que les tampons soient complétés par du SMA libre, contrairement aux détergents dont la concentration doit être maintenue au-dessus de la CMC pour toutes les analyses.

Quelques modèles déterminant le mécanisme moléculaire de la solubilisation des protéines par les SMA ont été proposés<sup>259-261</sup>. Scheidelaar et collègues ont décrit en 2015 un modèle en trois étapes pour expliquer le mode d'action des SMA, cependant sur une bicouche lipidique artificielle ne contenant pas de protéines. Dans un premier temps, le SMA se lie à la surface de la membrane lipidique par son groupement styrène hydrophobe, ce qui est modulé par la présence de sels et de lipides chargés négativement qui vont induire des forces de répulsion avec le polymère également chargé négativement. Dans un deuxième temps, le SMA va s'insérer dans le cœur hydrophobe de la membrane. La pression latérale exercée par les lipides, la fluidité et l'épaisseur de la membrane auraient un effet important sur ce phénomène. De même, ils ont montré que la composition en lipides des SMALPs reflète celle de la membrane initiale. Enfin, l'étape finale est la solubilisation effective de la bicouche et la formation simultanée de nanoparticules lipides. Plus tard, Xue et collègues<sup>261</sup>, d'après des simulations par dynamisme moléculaire dans le modèle Martini, donnent des informations plus détaillées sur l'insertion, la pénétration et la formation de pores par les polymères, montrant notamment comment ils mènent à la déstabilisation complète de la membrane lipidique et à la formation de nanodisques.

Les SMA se sont avérés efficaces pour la solubilisation des protéines membranaires de diverses familles produites à partir de différents systèmes d'expression, principalement des bactéries, mais aussi les cellules d'insectes, les levures, les cellules de mammifères et les cellules végétales. Ces polymères constituant le cœur de mon projet de thèse, leur utilisation fera l'objet d'une partie à part entière plus développée ci-après.

L'utilisation de polymères de SMA présente toutefois quelques désavantages. En raison de leur synthèse par polymérisation radicalaire, les polymères sont de longueur et de composition différentes, ce qui entraîne une certaine hétérogénéité dans les particules formées. De même, les SMA sont sensibles à des concentrations faibles de cations divalents comme le magnésium et le calcium, ce qui est problématique pour certaines protéines qui nécessitent ces ions comme cofacteur pour la liaison de ligands ou pour leur activité enzymatique comme les ATPases. De plus, les SMA sont également sensibles au pH et ne sont solubles que dans une

fenêtre assez réduite (autour de pH 7,5-8). Des polymères dérivés ont toutefois été développés pour faire face à ces deux dernières limitations (cf paragraphe « 4.1. Le panel de SMA et polymères dérivés décrits »). Une autre limitation potentielle est la taille des disques formés. Contrairement aux nanodisques qui peuvent former des disques plus gros en utilisant une MSP plus longue, les SMALPs font une taille de 10 à 12 nm, trop petits pour certains complexes protéiques, mais cette taille dépend des ratios polymères/lipides utilisés. Enfin, bien que les SMALPs confèrent une meilleure stabilité aux protéines, il n'est pas encore clairement établi que les polymères n'apporterait pas une contrainte trop importante sur la protéine<sup>258</sup>.

### 3.2.6. Les méthodologies plus récentes

Plus récemment, d'autres technologies permettant l'extraction de protéines membranaires ont également été décrites. Elles incluent les nanoparticules de saposine, les Peptidiscs ou encore une nouvelle génération d'amphipols capables d'extraire les protéines des membranes, les CyclAPols.

En 2016, Frauenfeld et collègues ont décrit un système basé sur l'utilisation d'une lipoprotéine, la **Saposine A** (SapA), utilisée pour reconstituer les protéines membranaires dans des nanoparticules en utilisant un canal mécanosensible d'archée (T2) et un transporteur de peptide bactérien (POT1)<sup>262</sup>. De façon similaire à la MSP, la SapA sert de protéine d'échafaudage qui entoure la nanoparticule contenant des lipides et la protéine. L'un des avantages est que la SapA s'ajuste à la taille de la protéine facilitant ainsi l'incorporation de protéines membranaires de taille et structure variées. Les particules obtenues ont pu être étudiées par diverses techniques biochimiques et biophysiques comme la cryo-EM pour la protéine SERCA1<sup>263</sup> ou pour l'uniporter mitochondrial calcique NfMCU<sup>264</sup>, la RMN en solution pour le récepteur  $\beta_2$ AR<sup>265</sup>, des analyses par SAXS<sup>266</sup> ou SANS<sup>267</sup>, des analyses de thermostabilité par DSF<sup>266,267</sup>, des études fonctionnelles de liaison de ligands par *microscale thermophoresis* (MST)<sup>266</sup>, de flux de calcium<sup>264</sup>, ou encore des essais enzymatiques<sup>267,268</sup>. Plus récemment, la technologie a été améliorée et les protéines sont directement reconstituées en nanoparticules en parallèle de leur extraction par des détergents. La preuve de concept de cette méthodologie a été réalisée sur un récepteur aux chimiokines<sup>269</sup>.

De manière assez similaire aux nanoparticules de saposine, une méthode nommée **Peptidisc** est décrite par Carlson et collègues en 2018. Il s'agit de multiples copies d'un peptide amphipatique nommé NSPr ayant la capacité de s'enrouler

autour de la protéine cible. Là encore, les protéines sont reconstituées dans le Peptidisc après avoir été extraites et purifiées en détergent. Les auteurs ont testé l'efficacité du système sur différentes protéines, comme les tonneaux  $\beta$  OmpF ou FhuA ou le transporteur ABC MalFGK<sub>2</sub><sup>270</sup>.

Enfin très récemment, des amphipols de nouvelle génération, nommés **CyclAPols**, ont été développés et sont décrits comme étant efficaces pour extraire directement les protéines des membranes<sup>271</sup>. Ils se différencient des amphipols traditionnels, et notamment de l'A8-35, par le remplacement de la chaîne carbonée linéaire par un groupement cyclique hydrophobe de huit carbones (Figure 22). L'efficacité de ces nouveaux polymères a été testée sur différentes protéines (la bactériorhodopline extraite de membranes pourpres de *H. salinarum* et YidC-GFP extraite de membrane d'*E. coli*), où ils se sont révélés plus efficaces que les polymères SMA.

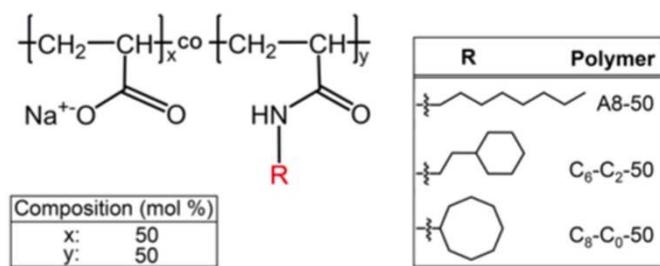
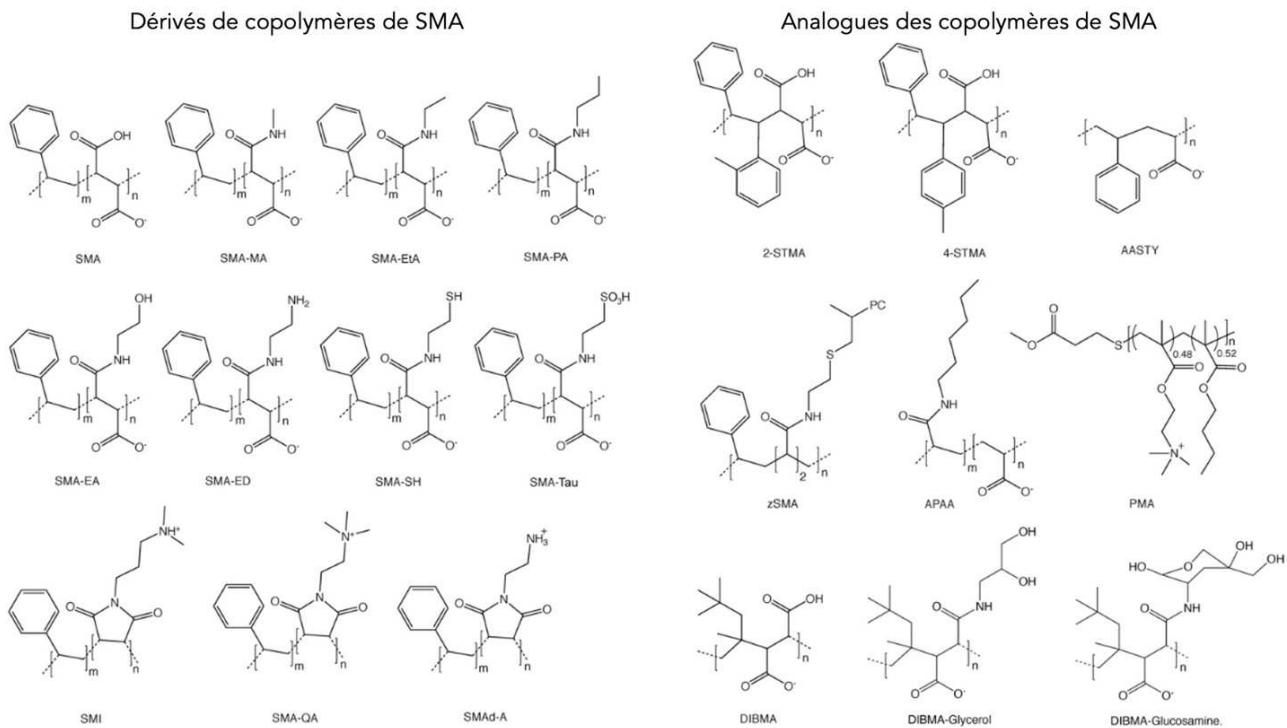


Figure 22. Structure chimique des CyclAPols.<sup>271</sup>

Il apparaît donc qu'au cours de ces 30 dernières années, les chercheurs ont développé divers systèmes mimétiques de membranes, présentant chacun des avantages et des inconvénients, pouvant être utilisés de manière complémentaire afin d'obtenir des données les plus complètes possibles. Parmi ces systèmes, les polymères de styrène et d'acide maléique semblent particulièrement intéressants car ils ne nécessitent pas l'utilisation de détergents et ils permettent de conserver les lipides natifs de la membrane. La prochaine partie traite de l'utilisation de ces polymères dans diverses études fonctionnelles et structurales de protéines membranaires.





**Figure 23. Les différents types de polymères utilisés pour extraire des protéines membranaires et leurs caractéristiques associées.** Une description de chaque polymère et les références associées sont disponibles dans le texte principal. Figure modifiée d'après<sup>272</sup>.

## 4. L'utilisation de copolymères SMA et dérivés pour l'étude de PMs

### 4.1. Le panel de SMA et polymères dérivés décrits

La découverte en 2009 dévoilant que le SMA 2000 pouvait être utilisé pour extraire des protéines membranaires<sup>253</sup> représente une avancée majeure dans le domaine de la biochimie. Ce polymère reste d'ailleurs à ce jour le plus utilisé pour l'extraction et l'étude *in vitro* de PMs. Une variété d'autres polymères (Figure 23) a été développée pour investiguer sur les lipides et les interactions protéine-lipide mais également pour essayer de faire face aux problèmes liés à ce polymère, comme la sensibilité aux variations de pH ou aux ions divalents.

Plusieurs polymères ont été modifiés ou fonctionnalisés au niveau de la chaîne polaire, notamment avec un groupement éthanolamine (SMA-EA)<sup>273</sup>, éthylénamine (SMA-ED)<sup>274</sup> (ou sa version déshydratée, le SMAd-A), taurine (SMA-Tau)<sup>275</sup> ou encore avec une fonction thiol (SMA-SH)<sup>276</sup> qui permet d'attacher différents tags d'affinité ou fluorescent. De même des groupements ammonium tertiaires et quaternaires ont permis d'obtenir respectivement le SMI<sup>277</sup> et le SMA-QA<sup>278</sup>. Ces polymères sont plus tolérants aux ions divalents et solubles dans une gamme de pH plus large. De même, des disques plus grands peuvent être obtenus à partir de SMA portant un groupement phosphatidylcholine (zSMA)<sup>279</sup>, ou méthylamine (SMA-MA)<sup>280</sup>, éthylamine (SMA-EtA)<sup>280</sup> ou encore de propylamine (SMA-PA)<sup>280</sup>, et permettent de solubiliser les protéines dans des plus larges gammes de pH.

Enfin, des analogues au polymère de styrène et d'acide maléique ont également été synthétisés. Dans les polymères DIBMA<sup>281</sup>, le groupement styrène qui interfère avec la détection des protéines à 280 nm a été remplacé par des chaînes aliphatiques qui sont plus compatibles pour l'analyse par CD. Des dérivés du DIBMA ont également été synthétisés avec des groupements glycérol et glucosamine pour augmenter leur solubilité (Cube Biotech). Des polymères de polyméthacrylate (PMA)<sup>282</sup> avec différents ratios de chaînes latérales de butyle et d'acétylcholine ainsi qu'un ensemble de copolymères APAA à base de d'alkyle (butyle, pentyle ou hexyle) et d'acide polyacrylique ont également été développés<sup>283</sup>. L'un des inconvénients des polymères de SMA, en particulier pour les études structurales, concerne leur polydiversité en matière de longueur de la chaîne. C'est dans cette optique que des polymères de styrène et d'acide acrylique (AASTY) présentant une dispersité plus proche de 1 ont été développés<sup>284</sup>. De même, des polymères de stilbènes avec un

Tableau 5. Les protéines eucaryotes étudiées *in vitro* à l'aide de polymères de SMA et dérivés.

Système d'expression	Protéine	Polymère utilisé	Etudes réalisées
Cellules d'insecte Sf9	ENT1/SLC29A1	SZ 30010	Liaison de ligand radioactif, thermostabilité, ESI-MS
	MRP4/ABCC4	SMA 2000/SZ 25010	Thermostabilité, gels natifs
	Récepteur de la glycine	SZ 30010	Cryo-EM
	Récepteur CB1	SMA 2000/SZ 25010	DLS, thermostabilité, SPR, cytométrie en flux
	Récepteur NTS1	PMA	GTPase-glo
Cellules d'insecte H5	Glycoprotéine-P/ABCB1	SMA 2000	Liaison de ligands, thermostabilité, CD, AUC
Cellules HEK293T	ABCG2	SMA 2000	DLS, liaison de ligand par FSC
	Récepteur à la dopamine D1	SMA 3000	Liaison de ligand radioactif, MST, CD
	Récepteur adrénergique $\beta$ 2	DIBMA	DLS, FRET
	Récepteur PTH1	SMA 2000	HDX-MS
	Récepteur AA <sub>2</sub> A	SMI	Liaison de ligand radioactif
	Récepteur V1a	SMI	Liaison de ligand radioactif
	Récepteur PTH1	SMA 2000	HDX-MS, SPR
Canal TRPM4	AASTY	Cryo-EM	
Canal ASIC1	SZ 30010	Cryo-EM	
Canal KCNGQ1	SMA 3000	DLS, microscopie électronique à coloration négative	
Canal KCNH5	SMA 3000	DLS, microscopie électronique à coloration négative	
<i>Pichia pastoris</i>	Récepteur AA <sub>2</sub> A	SMA 2000	AUC, liaison de ligand radioactif, CD
	Récepteur MT1	SMA 2000	Liaison de ligand radioactif, GTP $\gamma$ S, recrutement arrestine
CD81	SMA 2000	CD, spectrométrie de masse, analyse des lipides	
SOS1	SMA 2000	Spectrométrie de masse, activité de transport	
Transporteur SERT	SMA 2000/DIBMA	DLS, CD, liaison de ligand radioactif, activité de transport	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wsc1	SMA 3000	Microscopie électronique à coloration négative
<i>S. pombe</i>	Canal SLAC1	SMA	Cryo-EM, MS/MS
	Récepteur GHSR	SMA 2000	Liaison de ligand par FRET, GTP $\gamma$ S, recrutement arrestine, émission de fluorescence (bimane)
Protéoliposomes	GHSR:D2DR	SMA 2000	Liaison de ligand, activation des protéines G, recrutement arrestine

groupement méthyle en position 2 ou 4 et d'anhydride maléique (2-STMA et 4-STMA) ont également permis d'obtenir des particules de tailles et formes plus homogènes<sup>285</sup>.

Si cette croissance dans le développement de nouveaux polymères permet d'envisager la solubilisation d'une plus grande diversité de membranes et de protéines, la majorité de ces polymères ne sont pas disponibles commercialement, ou ne le sont que depuis très récemment, comme pour les SMA-EA, SMA-ED et SMA-QA commercialisés par Anatrace depuis fin 2021.

## 4.2. Complexes protéine/SMA et les études fonctionnelles associées

De nombreuses études portant sur des protéines bactériennes produites en système procaryote (souvent *E. coli*) sont décrites dans la littérature. Des revues récentes traitent d'ailleurs de ces travaux de façon assez exhaustive<sup>272,286</sup>. Ici, nous nous concentrerons principalement sur les études portant sur des protéines eucaryotes voire humaines en essayant d'en faire une analyse critique. De même, nous ferons un distinguo entre les articles parus avant 2019 et depuis 2019, afin de bien mettre en lumière l'état de l'art au moment de l'élaboration de ce projet puis de donner un aperçu plus complet des études parues ces trois dernières années. Le Tableau 5 donne une vue d'ensemble des différentes protéines eucaryotes étudiées par des polymères de SMA ou dérivés et qui sont décrites dans les paragraphes ci-dessous.

### 4.2.1. Les informations disponibles avant 2019

Cinq transporteurs ABC eucaryotes, la glycoprotéine-P humaine ou ABCB1, le CFTR murin ou ABCC7, la protéine MRP1 (*multidrug-resistance protein 1*) ou ABCC1, la protéine ABCG2 et la protéine MRP4 ou ABCC4 furent parmi les premières protéines eucaryotes à être extraites à l'aide de polymère SMA, à partir de différents systèmes de production (cellules d'insectes High Five et Sf9, cellules HEK (*human embryonic kidney*) et *Saccharomyces cerevisiae*). Une purification en une seule étape de chromatographie d'affinité a permis d'obtenir de bons rendements pour la glycoprotéine-P, permettant ainsi sa caractérisation par des tests de liaison de ligands par méthode fluorescente, par l'étude de sa thermostabilité, par l'étude de sa structure 2D par CD et par l'étude de son comportement en solution par ultracentrifugation analytique (AUC). Toutefois dans cette étude, les auteurs n'ont pas essayé de démontrer l'activité ATPase des protéines purifiées ni l'activité de transport de substrat, qui nécessiteraient leur reconstitution dans des protéoliposomes<sup>287</sup>. Un

autre transporteur, l'ENT1/SLC29A1 a également été purifié à partir de cellules d'insectes Sf9. Cette étude a montré que les SMALPs peuvent être purifiées par le tag FLAG de la protéine. Une caractérisation des SMALPs-ENT1 a été réalisée par des tests radioactifs de liaison de ligand et par une analyse de la thermostabilité de la protéine en comparaison avec les membranes et avec la protéine purifiée en DDM ou en DM. De même, une analyse par ESI-MS a permis d'identifier les lipides contenus dans la particule<sup>288</sup>.

Le premier RCPG ayant été solubilisé à l'aide de SMA est le récepteur A<sub>2</sub>A, exprimé dans *Pichia pastoris* et en cellules HEK, extrait par le SMA 2000 en 2015. Les protéines ont été purifiées par une étape de chromatographie d'affinité suivie d'une étape de gel filtration puis les SMALPs ont été caractérisées par CD, par AUC et selon leur capacité à fixer des ligands. Si cette publication semble très intéressante au premier abord, quelques détails expérimentaux semblent toutefois questionnables. Par exemple, il est assez étrange que la protéine, dont la taille est d'environ 30 kDa, élue à 14 mL d'une colonne de gel filtration Superdex 200 10/300. Pour une protéine de cette taille, et ce sans tenir compte de la contribution du polymère et d'éventuels lipides associés, on s'attendrait plutôt à trouver un volume d'élution d'environ 10 à 12 mL au maximum. De même, lors de la caractérisation pharmacologique des protéines purifiées, il n'est jamais fait mention des niveaux de fixation de ligands (B<sub>max</sub>) mais seulement de valeurs normalisées en pourcentage. Alors que cette publication fait office de référence dans le milieu des SMA et a été citée à de nombreuses reprises, nous ne possédons finalement que de peu d'informations concrètes sur l'état de repliement et fonctionnel des récepteurs parmi l'ensemble du pool de protéines purifiées<sup>254</sup>. Plus récemment, deux études ont utilisé des SMALPs-A<sub>2</sub>A, l'une pour développer une méthode de liaison d'un ligand par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FSC, *fluorescence correlation spectroscopy*)<sup>289</sup>, et l'autre pour étudier les changements conformationnels induits par la liaison de ligands<sup>290</sup>.

D'autres RCPG ont également été extraits et étudiés par des SMA. C'est par exemple le cas du récepteur MT1 et du récepteur GHSR1a<sup>291</sup>. Les auteurs ont utilisé deux systèmes différents pour extraire les protéines à l'aide des SMA, des protéoliposomes pour le GHS-R1a et des membranes de la levure *Pichia pastoris* pour le MT1R. Des essais de liaison de ligand par compétition ont été réalisés par FRET pour le GHS-R1a et par radioactivité pour le MT1R et ont montré dans les deux cas une affinité de liaison de différents ligands similaires à celle de membranes. De plus, des essais de GTSyS et de recrutement de l'arrestine ont été réalisés pour évaluer la

fonctionnalité des récepteurs. Le GHS-R1a s'est montré plus stable dans des SMALPs extraites de liposomes que dans des micelles de détergents, capable de favoriser l'échange GDP/GTP comme pour les protéines reconstituées en nanodisques et capable de recruter l'arrestine lorsqu'il est activé par des agonistes. Enfin une caractérisation structurale du GHS-R1a à l'aide d'un test basé sur la fluorescence de la bimane a montré différents états conformationnels du récepteur à la suite de la liaison de ligands. La purification du MT1R (après extraction par le SMA2000 à partir de membranes de levures) par chromatographie d'affinité puis par chromatographie d'exclusion par la taille montre que l'échantillon contient une grosse partie de gros agrégats et/ou de fragments de membranes non solubilisés qui éluent dans le volume mort de la colonne. Les rendements de protéines obtenues à partir de membranes sont donc nettement plus faibles que ceux obtenus pour l'extraction à partir de liposomes, suggérant que les SMA sont plus efficaces sur des modèles lipidiques plus simples. Les SMALPs-MT1R sont toutefois capables d'activer les protéines G et recrutent l'arrestine comme dans les cellules CHO. Au vu des nombreuses expériences réalisées pour caractériser les propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des SMALPs purifiés, cette étude est sans doute l'une des plus complètes publiée sur l'étude de deux RCPG purifiés par un SMA. Il aurait toutefois été intéressant que les valeurs de pKi traduisant l'affinité des ligands pour leur récepteur respectif soient également comparées avec les valeurs que l'on peut obtenir avec des protéines purifiées en détergent ou reconstituées en nanodisques et pas seulement avec les membranes des systèmes d'expression.

Dans une autre étude, l'hétérodimérisation du GHSR avec le D2DR a été étudiée en solubilisant les protéines à l'aide de SMA à partir de protéoliposomes. Les complexes obtenus étaient fonctionnels d'un point de vue de la liaison de ligands, de l'activation des protéines G et du recrutement de l'arrestine. Des études de FRET ont pu être réalisées à partir des hétéromères en SMALPs<sup>292</sup>.

Dans leur papier décrivant le développement d'un polymère dérivé des SMA, le SMI, Hall et collègues ont testé l'efficacité de ce nouveau polymère pour extraire les récepteurs humains A<sub>2</sub>A et le récepteur à la vasopressine 1a (V1aR) exprimés dans des cellules HEK293T<sup>277</sup>. Les récepteurs extraits en particules lipidiques de SMI (SMILPs) sont caractérisés par leur capacité à lier un ligand radioactif. Toutefois, il ne s'agit pas de protéines purifiées mais des membranes solubilisées avec le SMI contenant les SMILPs de RCPG. De même, les valeurs de la liaison spécifique sont exprimées en pourcentage de la liaison totale, ne permettant donc pas d'évaluer la proportion de

protéines capable de lier un ligand parmi le pool de protéines. De même, ces résultats ne sont pas mis en perspective avec les valeurs que l'on peut obtenir à partir de membranes, voire à partir de protéines purifiées en détergent ou reconstituées en nanodisques.

Un autre RCPG de classe A, le récepteur CB1 a été extrait par le SMA 2000 à partir de cellules d'insectes Sf9. Les protéines purifiées par une étape unique de chromatographie d'affinité ont été évaluées par DLS et leur thermostabilité a été testée en comparaison avec celle en micelles de détergent. Dans cette publication, les auteurs ont caractérisé la capacité du SMALP-CB1 à interagir avec un anticorps anti-CB1 par cytométrie en flux et par SPR en immobilisant l'anticorps sur la surface et en injectant le SMALP-CB1. Toutefois, la liaison non-spécifique (mesurée à l'aide d'un SMALP-KcsA contrôle) est importante, de l'ordre de 35 %, ce qui n'a pas permis la détermination des constantes de liaisons. De plus, aucune liaison spécifique n'a pu être détectée lorsque le SMALP-CB1 a été immobilisé sur la surface de SPR et que l'anticorps CB1 a été injecté<sup>293</sup>.

Bien qu'il y ait globalement assez peu d'études effectuées sur des protéines membranaires eucaryotes au regard du nombre d'études sur des protéines procaryotes, ou qu'elles manquent parfois d'informations, ces papiers laissent toutefois penser que les SMA sont efficaces pour extraire des protéines eucaryotes produites dans des systèmes eucaryotes, y compris à partir du système *Pichia pastoris*.

#### 4.2.2. Les études parues après 2019

Des études supplémentaires ont été publiées en 2019 et les années suivantes sur l'isolement de protéines membranaires à l'aide de polymères de SMA. Parmi ces protéines, on trouve des transporteurs, comme le MPR4/ABCC4<sup>294</sup>, l'ABCG2<sup>295</sup>, l'antiporteur SOS1 de la plante *Arabidopsis thaliana*<sup>296</sup> ou encore le transporteur humain de la sérotonine SERT<sup>297</sup>, des canaux ioniques humains (KVNH5 et KCNQ1)<sup>298</sup>, des récepteurs comme le récepteur à la glycine GlyR $\alpha$ 1<sup>299</sup> ou le récepteur tyrosine kinase EphA2<sup>300</sup> et des RCPG comme le  $\beta_2$ AR avec deux différentes études<sup>301,302</sup>, le NTSR1<sup>303</sup> ou le récepteur à la dopamine D1 (D1DR)<sup>304</sup> ou encore la protéine de la famille des tétraspanines CD81<sup>305</sup>.

Les systèmes d'expression de ces protéines sont assez variés, allant de cellules d'insecte Sf9 pour MRP4 et NTSR1, en passant par les cellules de mammifères COS-1 pour les canaux KCNGQ1 et KCNH5 ou HEK pour D1DR, ABCG2 et le  $\beta_2$ AR, ou

encore la levure *Pichia pastoris* pour SOS1, CD81 et SERT. Le récepteur EphA2 a, quant à lui, été extrait de protéoliposomes. Les SMA utilisés sont souvent le SMA 2000 (pour les protéines MRP4, SOS1, CD81, ABCG2 et SERT) et le SMA 3000 (KCNGQ1, KCNH5 et D1DR) mais aussi d'autres polymères comme le DIBMA pour SERT et le  $\beta_2$ AR, le SZ25010 pour MPR4 et CD8, le XIRAN SL25010 P20 (ratio styrène/acide maléique de 3 :1) et XIRAN SL 30010 P20 (ratio styrène/acide maléique de 2.3 :1) pour le  $\beta_2$ AR ou encore un polymère de PMA pour NTS1R.

Les protéines sont purifiées soit par une étape unique de chromatographie d'affinité pour MRP4, KCNGQ1, KCNH5 et ABCG2, soit par une double chromatographie d'affinité (chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC) puis chromatographie d'affinité anti-FLAG) pour le NTS1R, ou encore une chromatographie d'affinité suivie d'une gel filtration pour SOS1, CD81 et SERT. D'une manière plus surprenante, le D1DR a été purifié d'abord par gel filtration puis par chromatographie d'affinité. Il en est de même pour la purification des SMALP-  $\beta_2$ AR, réalisée par chromatographie liquide bidimensionnelle, dans laquelle la SEC et l'IMAC ont été combinées par l'intermédiaire d'une vanne de commutation. Dans ces deux papiers, les auteurs indiquent qu'une première étape de SEC permet de séparer des larges fractions membranaires et des SMA libres. Ce concept est toutefois assez étonnant alors que, dans les deux cas, les colonnes utilisées sont des Superdex 200 10/300, pour lesquelles les volumes d'injection sont habituellement de 500  $\mu$ L.

Différentes techniques ont été utilisées pour évaluer les SMALPs purifiées : des études de thermostabilité (MPR4), des études pour évaluer la taille et l'homogénéité des particules par DLS (KCNGQ1 et KCNH5, CD81, ABCG2, SERT, et le  $\beta_2$ AR), des analyses par CD (CD81 et SERT) ou par microscopie électronique à coloration négative (KCNGQ1 et KCNH5), des analyses par spectrométrie de masse pour évaluer la présence de contaminants (SOS1, CD81) ou encore des essais de liaison de ligands par radioactivité (D1DR et SERT) ou par MST (D1DR). De même, une analyse de l'environnement lipidique du SMALP-CB81 a été réalisée par spectrométrie de masse. Aussi, le transporteur SOS1 et le transporteur SERT ont été reconstitués en protéoliposomes pour évaluer leur activité de transport. Des analyses par FSC ont été mises au point pour démontrer la liaison de ligands pour ABCG2 et pour A<sub>2</sub>A<sup>289</sup>. La capacité du NTSR1 à stimuler les protéines G<sub>q</sub> et G<sub>i1</sub> a été évaluée par un test d'échange du GTP, réalisé toutefois directement sur les membranes solubilisées par le polymère et pas sur les protéines purifiées à cause de rendements trop faibles. Enfin, un nouveau test de FRET en temps résolu a été établi pour étudier si le  $\beta_2$ AR

reste fonctionnel lorsqu'il est extrait des membranes de cellules HEK dans les particules de DIBMA.

Si certaines études sont très complètes comme celles sur la protéine CD81, le transporteur ABCG2 ou encore le transporteur SERT avec diverses informations sur le repliement ou la fonctionnalité des protéines à lier des ligands et à effectuer leur mission de transport, d'autres études manquent parfois d'informations quant à la fonctionnalité des SMALPs purifiées, voire présentent des données parfois questionnables. A titre d'exemple, dans l'étude sur le D1DR, les auteurs relatent un rendement de 0,255 mg/L de culture, pourtant les bandes correspondant aux protéines purifiées sont très peu visibles sur un gel SDS PAGE coloré au nitrate d'argent (pourtant plus sensible qu'une coloration au bleu de Coomassie). De plus, dans les données supplémentaires, on peut voir que la liaison du D1DR pour son ligand dans les membranes est évaluée à 7,7 pmol/mg de protéine totale contre 590 fmol/mg après purification dans les SMALPs, soit un enrichissement d'un facteur 0,1... De même, si la fonctionnalité des canaux KCNGQ1 et KCNH5 a été validée par électrophysiologie sur cellule unique dans les cellules COS, il n'est pas fait mention de ce type d'étude sur des SMALPs reconstituées en protéoliposomes par exemple. Pour MPR4, peu d'informations sont disponibles quant à la conformation de la protéine (seulement évaluée par des gels natifs) et aucune information n'est disponible quant à sa fonctionnalité.

## 4.3. Études structurales des SMALPs

### 4.3.1. L'état de l'art avant le commencement du projet

Au commencement de ce projet, les études structurales sur des protéines purifiées en SMA sont rares. Elles incluent une structure obtenue par cristallographie aux rayons-X et des structures obtenues par cryo-EM, sans doute la méthode la plus efficace pour déterminer des structures de protéines membranaires en SMALPs.

En 2017, Broecker et collègues rapportent la première structure à 2,0 Å obtenue par LCP de la rhodopsine de *Haloquadratum walsbyi*<sup>306</sup> isolée en SMALP. Depuis, aucune autre structure de SMALPs n'a été déterminée par cristallographie.

A l'inverse, plusieurs études par microscopie électronique étaient déjà publiées avant le commencement de ce projet. La preuve de concept de la compatibilité des SMALPs avec des études par cryo-EM fut publiée en 2014 avec la structure de la P-glycoprotéine/ABCB1, à une résolution toutefois assez faible (35 Å)<sup>287</sup>. Dans la foulée, une structure du transporteur d'*E. coli* AcrB à 23 Å fut déterminée par coloration négative<sup>307</sup>. Une autre structure de cette même protéine fut ensuite résolue par cryo-EM en 2018 par une autre équipe à de meilleurs niveaux de résolution (3,2 Å)<sup>308</sup>. Cette étude a d'ailleurs permis de montrer pour la première fois que les SMA étaient capables de retenir des lipides de la bicouche, du fait de la présence de 24 lipides dans la particule. Une des avancées majeures dans l'étude des SMALPs par cryo-EM fut la résolution pour la première fois du Complexe Alternatif III (ACIII) de *Flavobacterium johnsoniae*, en 2018, à un niveau de résolution de 3,4 Å, donnant des informations sur les interactions protéine-protéine du complexe.

Ainsi, lors de l'élaboration de ce projet de thèse aucune étude structurale à basse résolution n'était disponible sur une protéine membranaire eucaryote.

### 4.3.2. Depuis 2019

Depuis ces 3 dernières années, un plus grand nombre de structures de protéines membranaires ont été publiées, mais toujours assez peu de structures de protéines eucaryotes. Parmi les structures des protéines procaryotes étudiées en SMALPs par microscopie électronique, on trouve par exemple l'étude sur ZipA, une protéine d'*E. coli*, en interaction avec la protéine FtsZ<sup>309</sup>, l'étude sur KimA, un transporteur de la famille des KUP, dont une structure à 3,7 Å a permis de proposer un modèle pour le mécanisme du transport du potassium<sup>310</sup>, l'étude sur le canal d'*E. coli* Ynal, extrait

avec le polymère DIMBA soit des membranes de bactéries soit de protéoliposomes et dont la structure a été résolue à 3,0 Å<sup>311</sup>, la première structure du transporteur AcrB de la salmonelle résolue à 4,6 Å<sup>312</sup>, l'étude de la cible antibactérienne PBP1b extraite et purifiée en DDM puis reconstituée en SMA30010P et dont la structure a été résolue à 3,3 Å<sup>313</sup>, l'étude structurale du cytochrome *bo*<sub>3</sub> d'*E. coli*, résolu à 2,55 Å, qui a montré la présence de phospholipides et de d'ubiquinone-8 dans le site de liaison du substrat<sup>314</sup>, ou encore l'étude du canal bactérien dépendant des ligands ELIC dont la structure résolue à 2,5 Å a permis de révéler des détails inédits sur l'interface lipide-protéine<sup>315</sup>.

Les structures de protéines membranaires eucaryotes incluent, par ordre chronologique, la structure du canal de poulet ASIC1 (Acid-sensing *ion channel 1*) en 2020<sup>316</sup>, du canal humain TRPM4<sup>317</sup>, du capteur mécanosensible de levure Wsc1<sup>318</sup>, du récepteur du poisson-zèbre de la glycine<sup>299</sup> et du canal de plante SLAC1 en 2021<sup>319</sup>.

La protéine ASIC1 du poulet a été exprimée dans des cellules de mammifères (HEK293S) et deux structures correspondant à deux états conformationnels du canal (au repos et désensibilisé) ont été résolues par cryo-EM à 2,8 Å et 3,7 Å. Les données obtenues sur l'architecture générale du canal sont similaires à celles précédemment obtenues en détergent. Toutefois, pour la première fois, des données sur la partie N-ter intracellulaire ont été découvertes grâce à cette protéine purifiée en SMALP, ce qui donne des renseignements sur la contribution de cette partie aminée dans les mécanismes de perméabilité ionique de ce canal. De plus, les auteurs ont observé des densités pouvant correspondre à des lipides autour du domaine transmembranaire du canal, ce qui suggère que les SMA ont préservé les interactions protéine-lipide, probablement importantes pour préserver la structure complète de cette protéine<sup>316</sup>.

Smith et collègues ont synthétisé des polymères de styrène et d'acide acrylique nommés AASTY (polyacrylic acid co-styrene). Dans leur étude de 2020, ils montrent que ce polymère est efficace pour extraire le récepteur humain TRPM4, fusionné à la GFP et produit en cellules de mammifères (HEK293) pour former des nanodisques natifs, à des niveaux d'efficacité comparables à ceux obtenus par l'extraction en DDM/CHS. Toutefois, malgré la haute pureté après purification, l'échantillon s'est révélé assez hétérogène avec peu de particules à la morphologie attendue par micrographe et la structure obtenue par cryo-EM est à une résolution assez faible d'environ 18 Å. Les classes 2D des particules les plus uniformes ont cependant montré

de hautes similarités avec celles précédemment obtenues sur le canal reconstitué en nanodisques<sup>317</sup>.

Le capteur de la paroi cellulaire Wsc1, crucial pour le maintien de l'intégrité des levures et des champignons, a été étudié en solution pour la première fois après avoir été produit dans *Saccharomyces cerevisiae* et extrait par le SMA3000. Les concentrations de protéines purifiées sont toutefois très faibles car en dessous de la limite de détection par Western-Blot et trop faible pour avoir des données de DLS exploitables. De plus, les données structurales obtenues par coloration négative sont de faible résolution et des parties entières de la protéine restent sans structure définie<sup>318</sup>.

Une étude parue en 2021 s'est focalisée sur une caractérisation structurale du canal SLAC1 de la plante *Brachypodium distachyon*. La protéine a été produite chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* puis purifiée à l'aide de SMA. Les auteurs ont obtenu une structure à 2,97 Å ayant permis de mieux comprendre le mécanisme de l'activation du canal par la phosphorylation de certains résidus. Les auteurs ont également réalisé une caractérisation fonctionnelle par électrophysiologie du canal d'*Arabidopsis thaliana* exprimé dans des oocytes de *Xenopus*. Comme les auteurs le soulignent dans leur papier, il aurait été intéressant que les études fonctionnelles aient été réalisées sur le canal de la même espèce que les études structurales<sup>319</sup>.

Enfin les données structurales les plus complètes obtenues à partir de SMALPs sont sans doute celles publiées récemment sur le récepteur à la glycine. Les auteurs ont étudié la structure de ce canal lorsqu'il est lié avec différents ligands, la glycine, le GABA ou la taurine, et selon qu'il ait été directement extrait et purifié en SMALPs ou reconstitué en nanodisques. De façon intéressante, cette étude montre que les SMALPs permettent de voir, en présence de glycine, trois conformations différentes du canal (ouvert, désensibilisé et ouvert-étendu) - ce qui est conforme aux données d'électrophysiologie – à d'assez bons niveaux de résolutions de 2,9 Å, 3,1 Å et 4,0 Å respectivement. A l'inverse, une seule structure du canal lié à la glycine a été obtenue, celle à l'état désensibilisé du canal, suggérant que les lipides ou le nanodisque lui-même induisent un changement dans l'équilibre conformationnel du canal vers l'état désensibilisé. De plus, les structures obtenues en présence d'agonistes partiels ont montré une nouvelle conformation partiellement fermée du récepteur. Ainsi ces différents états conformationnels de la protéine obtenus par l'étude des SMALPs permettent de mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement du récepteur<sup>299</sup>.

## 5. Présentation du projet

### 5.1. En quelques mots

Comme nous avons pu le mettre en évidence dans les différentes parties, de nombreuses méthodes biochimiques, biophysiques et structurales nécessitent de travailler avec des protéines purifiées. Les principaux facteurs clés de la réussite de ces études sont la stabilité de la protéine et un état de repliement le plus natif possible, dans un environnement le plus proche possible de la membrane native. C'est dans cette optique que des alternatives aux détergents, qui répondent assez mal aux critères évoqués, se sont développées au fil des années. Parmi ces alternatives, les copolymères de styrène et d'acide maléique apparaissent comme particulièrement intéressants car ils permettent de s'affranchir totalement de l'utilisation de détergents, à l'inverse d'autres techniques comme la reconstitution en amphipols ou en nanodisques, et ils permettent d'isoler les protéines dans un environnement lipidique natif.

L'utilisation de polymères de SMA pour l'étude de protéines membranaires est en plein essor depuis une douzaine d'années mais se limite principalement à l'étude de protéines procaryotes. Si quelques études sur des protéines eucaryotes sont toutefois disponibles dans la littérature, elles sont parfois incomplètes ou avec des données questionnables.

Le but de ce projet de thèse est donc d'évaluer la **capacité** des polymères de SMA à extraire **deux protéines membranaires eucaryotes modèles**, produites dans le système d'expression *Pichia pastoris* et de mettre au point un protocole de purification permettant d'obtenir un échantillon homogène. Par comparaison avec les résultats obtenus pour la préparation de ces protéines modèles en présence de détergents, il a ensuite pour objectif de caractériser finement la qualité des particules purifiées (pureté, homogénéité, fonctionnalité) par différentes techniques biochimiques et biophysiques avec, le cas échéant, des études structurales par cryo-microscopie électronique.

### 5.2. La levure *Pichia pastoris* comme système d'expression

La levure *Pichia pastoris* est un système d'expression très polyvalent<sup>320</sup>, ayant déjà démontré son intérêt pour la production de protéines membranaires eucaryotes.

En effet, un grand nombre de protéines ont pu être extraites des membranes de *P. pastoris*, à des niveaux de quantité et de qualité compatibles avec de nombreuses études moléculaires. On citera par exemple des études de criblage et de caractérisation fonctionnelle des composés<sup>321-324</sup>, d'interactions avec et par d'autre protéines<sup>292,325-327</sup> et lipides<sup>328,329</sup>, des études mesurant l'impact de mutations<sup>330-332</sup>, ainsi que de multiples études structurales et mécanistiques impliquant diverses méthodes<sup>333-341</sup>.

Ce système d'expression est utilisé depuis plusieurs années sur la plateforme IMPReSs, où il a permis l'expression et la purification d'un large panel de protéines membranaires ; de nombreux RCPG<sup>342</sup> comme le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A<sup>321,343</sup>, le récepteur à la mélatonine MT1<sup>322</sup>, le récepteur à la dopamine D<sub>2</sub><sup>292</sup>, le récepteur aux opioïdes kappa<sup>344</sup>, les récepteurs β2AR et CNR2<sup>325</sup> ; des canaux ioniques comme le canal hERG<sup>345</sup> ou le canal potassique Kir2.1 (Zuniga et al., en préparation), en passant par d'autres protéines membranaires comme le transporteur de cuivre hCTR1 (Publication 2) ; mais aussi des protéines secrétées comme des VHH<sup>346</sup>, des petits peptides ou des enzymes (travaux non publiés).

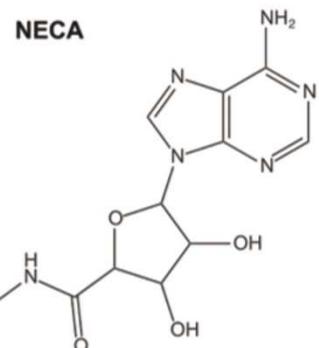
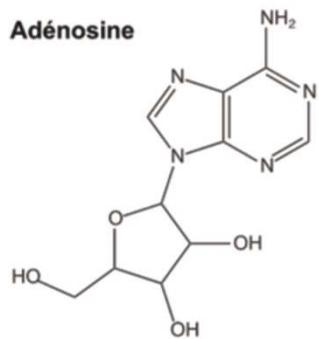
### 5.3. Les protéines modèles

#### 5.3.1. Le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A

##### 5.3.1.1. L'adénosine et ses récepteurs

L'adénosine est un nucléoside purique endogène ubiquitaire qui module de nombreux processus physiologiques comme l'activité neuronale – avec des fonctions importantes telles que la modulation de la libération des neurotransmetteurs, la plasticité synaptique, ou la neuroprotection lors d'évènements ischémiques, hypoxiques et de stress oxydatif -, la fonction vasculaire où l'adénosine produit soit une vasoconstriction soit une vasodilatation des veines et des artères, l'agrégation plaquettaire ou encore la régénération des cellules sanguines<sup>347</sup>. Retrouvée sous différentes formes, notamment associée à un, deux ou trois phosphates pour former l'AMP, l'ADP et l'ATP, elle est impliquée dans les voies clés du métabolisme énergétique cellulaire. Sous forme d'AMPc, elle joue un rôle clé de second messager.

AGONISTES



ANTAGONISTES

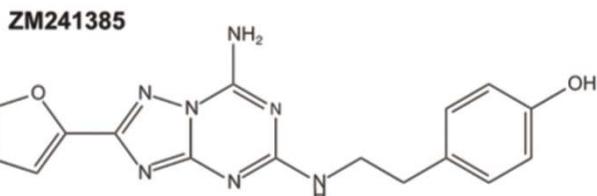
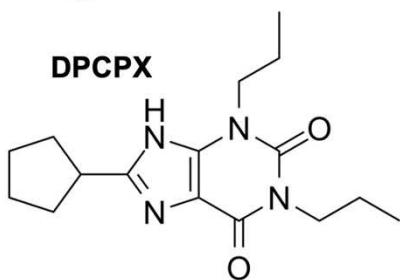
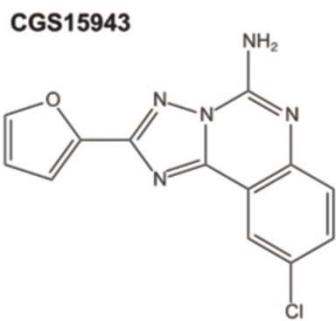
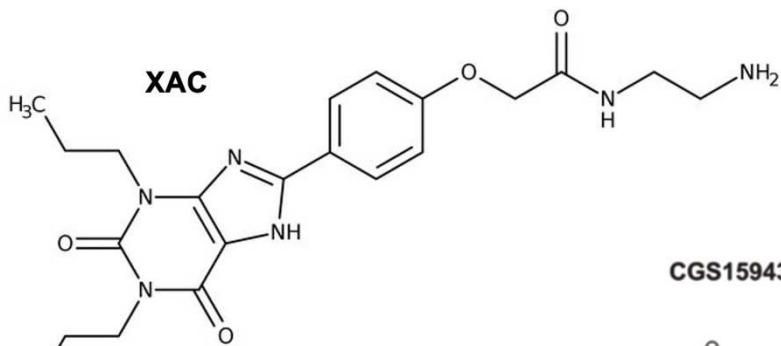


Figure 24. Structure chimique des ligands agonistes et antagonistes du récepteur A<sub>2A</sub> utilisés au cours de ce projet. NECA : 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine, DPCPX : Dipropylcyclopentylxanthine, XAC : Xanthine amine congener

L'adénosine est produite à la fois de manière intra et extracellulaire, par la dégradation de l'ATP et de l'AMP en extracellulaire, et par conversion de la S-adénosylhomocystéine ou de l'AMP en intracellulaire (Figure 25). Dans des conditions physiologiques normales, les niveaux extracellulaires d'adénosine se situent entre 20 et 300 nM et peuvent s'élever à des niveaux micromolaires faibles dans des situations physiologiques extrêmes comme un exercice physique intense ou des faibles taux d'oxygène voire des niveaux encore plus élevés dans des conditions pathologiques comme l'ischémie<sup>348</sup>.

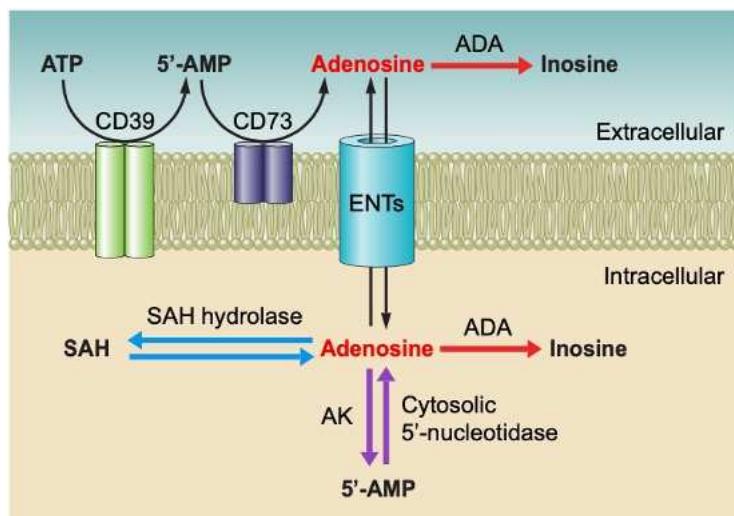


Figure 25. Métabolisme de l'adénosine et transport dans le milieu intra- et extracellulaire. SAH : S-adénosylhomocystéine, ADA : adénosine désaminase, AK : Adénosine kinase, ENTs: Equilibrative nucleoside transporters, CD39 : ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase, CD73 : ecto-5'-nucléotidase.<sup>348</sup>

La signalisation cellulaire par l'adénosine est médiée par l'intermédiaire de quatre sous-types de RCPG : les récepteurs à l'adénosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>, exprimés dans plusieurs cellules et tissus de l'organisme. Ils se distinguent entre eux par leur localisation en réponse à l'administration de molécules agonistes comme l'adénosine et ses analogues ou antagonistes comme la caféine et autres méthylxantines (Figure 24). Ils sont très conservés chez les mammifères où ils ont des homologies de séquence importantes, de l'ordre de 90 à 95 % entre les récepteurs de souris, du cochon d'Inde, du chien et de l'Homme<sup>349</sup>. Dans le cadre de ce projet, nous travaillerons sur le récepteur A<sub>2A</sub>.

### 5.3.1.2. Localisation et rôles physiopathologiques du récepteur A<sub>2</sub>A

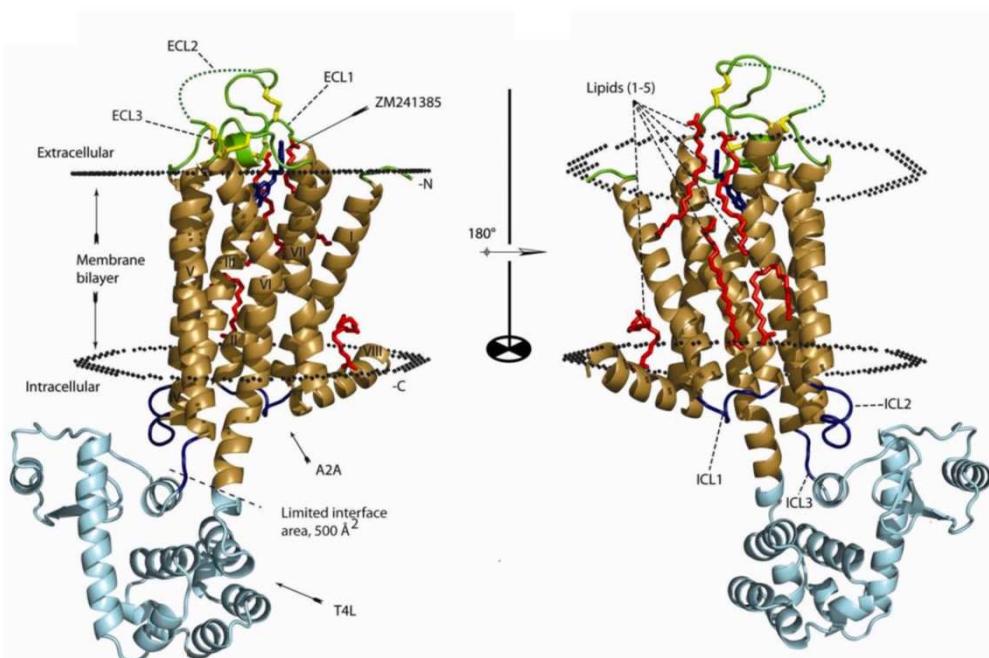
Les récepteurs A<sub>2</sub>A sont présents dans de nombreux tissus à la fois au niveau central et au niveau périphérique, majoritairement dans le striatum, le tubercule olfactif et le système immunitaire, et à des niveaux plus faibles dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le cœur, les poumons et les vaisseaux sanguins. C'est d'abord en raison de son rôle clé dans l'inflammation que le récepteur A<sub>2</sub>A a suscité l'intérêt de l'industrie pharmaceutique. L'utilisation de différents agonistes a démontré d'importants effets anti-inflammatoires sur les cellules impliquées dans les maladies respiratoires comme l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)<sup>350</sup>, sans toutefois qu'aucun médicament ne soit finalement approuvé<sup>351</sup>. De même, le récepteur A<sub>2</sub>A jouent un rôle dans les maladies cardiaques, notamment les arythmies, l'ischémie et l'hypoxie ou les crises cardiaques<sup>352</sup>. Le regadenoson, un agoniste sélectif du récepteur A<sub>2</sub>A, a d'ailleurs été autorisé en 2008 comme vasodilatateur coronaire pour la réalisation de scintigraphies myocardiques<sup>353</sup>. Dans le cerveau, le récepteur A<sub>2</sub>A co-localise avec d'autres RCPG, avec lesquels ils s'associent pour former des hétérodimères. Ils sont en effet impliqués dans les systèmes dopaminergique, cannabinoïde et glutamatergique, par leurs associations avec le D<sub>2</sub>DR<sup>354</sup>, le CB<sub>1</sub>R<sup>355</sup> et le mGlu<sub>5</sub><sup>356</sup>. Ces récepteurs sont directement impliqués dans des pathologies neurologiques comme la schizophrénie, l'hyperactivité ou la maladie de Parkinson. Les récepteurs A<sub>2</sub>A sont donc des cibles thérapeutiques majeures et de nombreuses molécules agonistes et antagonistes ont été développées<sup>347</sup>. Une molécule, l'istradefylline, a d'ailleurs été approuvée au Japon en association avec la L-DOPA dans le traitement de la maladie de Parkinson<sup>357</sup>. Elle a toutefois été refusée par la FDA en raison d'un manque d'efficacité thérapeutique. Enfin, les récepteurs sont surexprimés dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses, et ont été montrés comme stimulant la prolifération cellulaire, induisant l'angiogenèse en favorisant la prolifération des cellules endothéliales ou encore en inhibant les lymphocytes T anti-tumoraux<sup>358</sup>.

Il apparaît donc que le récepteur A<sub>2</sub>A est impliqué dans de nombreuses maladies et que leurs potentiels thérapeutiques restent largement sous-exploités.

### 5.3.1.3. Le récepteur A<sub>2</sub>A comme modèle d'étude

La structure du récepteur A<sub>2</sub>A a été résolue en 2008<sup>94</sup> (Figure 26), il fait donc partie des premiers RCPG étudiés par cristallographie aux rayons X après les récepteurs β<sub>1</sub> et β<sub>2</sub> adrénnergiques. La dynamique conformationnelle du récepteur A<sub>2</sub>A est d'ailleurs,

avec le récepteur adrénnergique  $\beta 2$ , l'une des plus étudiées de tous les RCPG, sans doute grâce à de nombreuses structures obtenues en conformation active ou inactive<sup>80,94,359</sup>. Des détails de son mécanisme moléculaire d'activation sont disponibles dans la revue<sup>19</sup>. Cette protéine a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*, notamment parce qu'elle a pu être produite dans divers systèmes d'expression comme les cellules d'insecte Sf9<sup>359</sup>, la levure *Saccharomyces cerevisiae*<sup>360</sup> ou encore la levure *Pichia pastoris* (Publication 1<sup>206</sup>). Sa purification en détergents<sup>80</sup>, en polymères<sup>254</sup> ou reconstituée en nanodisques lipidiques<sup>206</sup> ou en liposomes<sup>361</sup>, a permis de réaliser différentes études biochimiques, notamment de fixation de ligands par radioactivité, SPR ou SPA ; biophysiques comme par spectrométrie de masse, ITC, SAXS ou CD<sup>362</sup> ; ou encore le criblage de fragments par RMN-STD (résonance magnétique nucléaire de différence de transfert de saturation)<sup>321</sup> ou par chromatographie frontale de faible affinité<sup>74</sup>.



**Figure 26. Structure cristalline du récepteur à l'adénosine A2A en complexe avec le ZM241385.** La partie transmembranaire de la protéine est coloré en marron; les boucles extracellulaires (ECL) en vert, les boucles intracellulaire (ICL) en bleu foncé, le domaine de fusion T4L en bleu clair, le pont disulfure en jaune, le ZM241385 en bleu et les lipides en rouge.<sup>94</sup>

### 5.3.2. Le canal calcique TRPV4

#### 5.3.2.1. Généralités sur les canaux TRPV

L'une des six sous-familles des canaux TRP inclut les canaux TRPV, au nombre de 6 (TRPV1 à TRPV6). Ils contiennent sept domaines hydrophobes dont six traversent la membrane plasmique (S1-S6), le septième domaine ainsi que les extrémités N- et C-terminales étant situés de manière intracellulaire. Les canaux TRPV ont été largement étudiés en raison de la sensibilité à la chaleur et à la capsaïcine (une molécule similaire à la vanilline, que l'on retrouve dans les piments) de son membre fondateur, le canal TRPV1, qui a d'ailleurs donné son nom à la famille. Les canaux TRPV1 à 4 sont des canaux cationiques non sélectifs tandis que les canaux TRPV5 et 6 sont hautement sélectifs pour le calcium.

#### 5.3.2.2. Localisation et rôles physiopathologiques du canal TRPV4

A l'image de l'ensemble des canaux TRP, TRPV4 est exprimé dans de nombreux organes et types cellulaires comme le système nerveux central et périphérique, le cœur, le foie, les reins, la vessie, les testicules, la peau, les os, les vaisseaux sanguins, ou encore la cochlée. Ce canal est donc impliqué dans un large nombre de processus physiologiques et pathologiques dont nous donnerons ici quelques exemples. TRPV4 joue un rôle important dans la détection et la réponse aux changements osmotiques et dans la mécanosensation. De même, comme les autres canaux de sa famille, TRPV4 est impliqué dans la sensation de la chaleur. Il répond à des températures chaudes non nocives (supérieures à 27°C) ce qui laisse penser qu'il pourrait jouer un rôle dans la thermorégulation normale. Comme d'autres canaux TRP, TRPV4 est impliqué dans la douleur et l'inflammation. Différentes molécules inflammatoires peuvent affecter l'expression et la signalisation de TRPV4. Son rôle dans l'inflammation a beaucoup été lié à la protéine PAR2 (Protease-activated Receptor 2) mais aussi à l'histamine et la sérotonine. Ce phénomène inflammatoire serait également impliqué dans les maladies gastro-intestinales, alors que TRPV4 est largement exprimé dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal. De même, TRPV4 est retrouvé dans les tissus des voies respiratoires et dans plusieurs types de cellules immunitaires qui jouent un rôle important dans la fonction pulmonaire. Ainsi, TRPV4 est impliqué dans un large éventail de fonctions et de processus pathologiques des poumons et des voies respiratoires comme la toux, l'asthme, la BPCO ou encore la mucoviscidose. Enfin, TRPV4 a un rôle clé dans la fonction de la vessie, où il est exprimé dans l'urothélium

et dans le muscle détrusor. Des revues plus détaillées sur les différents rôles physiopathologiques de TRPV4 sont disponibles dans la littérature<sup>363,364</sup>.

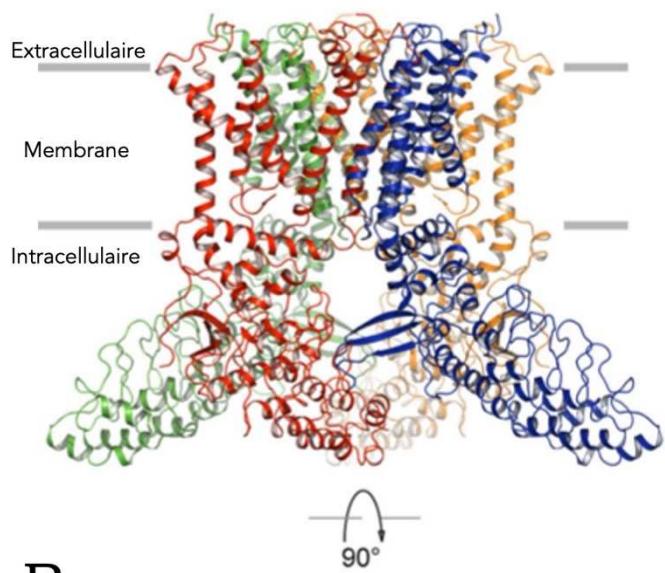
Ainsi, le potentiel thérapeutique de TRPV4 dans un grand nombre de maladies semble assez probant. Alors qu'une molécule, l'inhibiteur GSK2798745, administrée chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque et deux autres molécules contre l'œdème pulmonaire sont en phase d'étude clinique, aucun médicament ciblant TRPV4 n'est à ce jour disponible. En effet, en raison de son expression très répandue et de la multitude d'effets dans tout l'organisme, son activation ou son inhibition peuvent poser des problèmes en matière de sécurité.

### 5.3.2.3. Études fonctionnelles et structurales de TRPV4

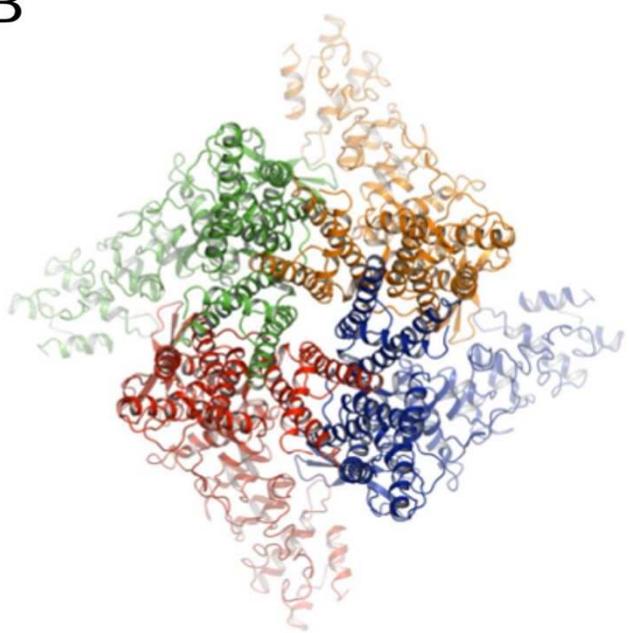
Le canal TRPV4 a été décrit en détail dès 2000. Il a été caractérisé comme un canal régulé par le volume en raison de sa sensibilité osmotique et de sa sensibilité au gonflement cellulaire<sup>365</sup>. D'un point de vue fonctionnel, de nombreuses études ont été réalisées sur des souris, notamment des souris knock-out pour TRPV4<sup>363,364</sup>, et ont permis d'identifier le rôle de ce canal dans divers processus physiologiques décrits plus haut. Ce canal est activé par divers stimuli comme le gonflement des cellules, les forces de cisaillement, la chaleur modérée ou encore diverses molécules chimiques comme les dérivés d'esters de phorbol et endogènes comme l'acide arachidonique, les métabolites dérivés du cytochrome P450, ou les endocannabinoïdes<sup>366</sup>. Comme tous les canaux ioniques, TRPV4 peut être étudié par électrophysiologie. A titre d'exemple, une étude par voltage-clamp sur des spermatozoïdes entiers associée à des études sur la sensibilité à la température ont permis de montrer que TRPV4 est exprimé de manière fonctionnelle dans les spermatozoïdes et assure la dépolarisation de la membrane dans le sperme humain<sup>367</sup>.

D'un point de vue structural, TRPV4 est un canal cationique non sélectif, modérément perméable au calcium. Il s'assemble en un tétramère homo-dimérique, avec six segments transmembranaires par monomère, comme tous les canaux TRPV. Ce canal, comme les autres TRPVs, est caractérisé par la répétition de six motifs d'ankyrine du côté N-terminal, qui sont essentiels pour le fonctionnement du canal et pour les interactions protéine-protéine. La structure de TRPV4 du *Xenopus tropicalis* a été résolue en 2018 à une résolution de 3,8 Å par cryo-EM<sup>333</sup> comme la majorité des canaux TRP (Figure 27). La structure a été obtenue à partir d'un construit tronqué au niveau des extrémités C- et N-terminale, construit permettant toutefois l'activation du

A



B



**Figure 27. Structure du canal TRPV4 obtenue par cryo-EM.** Chaque sous unité du tétramère est coloré d'une couleur différente. (A) Vue parallèle à la membrane. (B) Vue du dessus de l'organisation du canal. Figure modifiée d'après<sup>333</sup>.

canal par un agoniste spécifique, comme des expériences de flux de rubidium et de patch clamp l'ont montré.

Cette structure a révélé que les domaines S1 à S4 sont organisés différemment par rapport aux canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV6, dont les structures avaient préalablement été obtenues. La réorientation de ces domaines génère une interface unique entre les domaines S1-S4 et le pore central du canal, suggérant des mécanismes d'ouverture du canal distincts.

TRPV4 apparaît donc comme un bon candidat modèle pour la réalisation d'études structurales, notamment par cryo-EM.

#### 5.4. La stratégie mise en œuvre

Pour ce projet, nous avons donc décidé de travailler à l'aide de deux protéines modèles, l'une comme modèle d'étude fonctionnelle des SMALPs – A<sub>2</sub>A – et l'autre pour des études structurales – TRPV4, en comparaison avec des données obtenues en détergent.

Dans un premier temps, il s'agit d'établir des procédures de purification en détergent robustes pour les deux protéines. Si de telles procédures sont déjà bien établies et maîtrisées au laboratoire dans le cas du récepteur A<sub>2</sub>A, ce n'est pas le cas pour la protéine TRPV4. Une première partie du travail a donc consisté à prendre en main le protocole de purification de A<sub>2</sub>A, en y apportant quelques modifications afin d'augmenter les rendements, et à mettre au point un protocole robuste de purification pour TRPV4. Ce dernier sera étudié par des approches structurales, plus particulièrement par cryo-EM.

Ensuite, la seconde partie du projet consiste à tester différents polymères afin d'évaluer leur efficacité à extraire ces deux protéines des membranes de la levure. Les polymères les plus efficaces seront utilisés pour purifier les protéines en mettant au point un protocole de purification.

Enfin, la dernière partie du projet se consacre à l'évaluation des propriétés des SMALPs purifiés en comparaison avec les protéines en détergent. Dans le cas de A<sub>2</sub>A, du fait des nombreux ligands disponibles et d'une caractérisation pharmacologique déjà bien établie dans différents systèmes mimétiques de membranes (détérgeants et nanodisques), le travail se focalisera sur une caractérisation fonctionnelle des récepteurs et plus particulièrement sur la capacité du récepteur à lier différents ligands agonistes et antagonistes. Pour TRPV4, la caractérisation des particules sera

effectuée plutôt par des approches structurales, en comparaison avec celles effectuées sur la protéine en détergent.

Les procédures de production et de purification développées au laboratoire et au cours de cette thèse ont fait l'objet de la publication d'un article de protocoles (**Publication 1**), annexé à partir de la page 179. De même, j'ai été associée à la mise au point d'un protocole de purification et de reconstitution en liposomes d'un transporteur de cuivre pour lequel un article de protocoles est sous presse et devrait être disponible très prochainement (**Publication 2**), annexé à partir de la page 181. Enfin, sans lien avec ce travail de thèse, j'ai analysé des complexes protéiques par gel filtration analytique dans le cadre d'une collaboration avec une chercheuse de l'UMR 7242 et les résultats obtenus ont été intégrés dans un article de recherche (**Publication 3**, annexée à partir de la page 183).





## **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Préparation des protéines membranaires

### 1.1. Expression des PMs dans la levure *Pichia pastoris*

Les séquences codant pour les protéines d'intérêt à surexprimer sont clonées dans le plasmide pPIC9K (Invitrogen) selon le protocole déjà décrit<sup>342</sup>. La souche de *Pichia pastoris* SMD1163 (*his4*, *pep4*, *prb1*)<sup>e</sup> est transformée de manière stable par transformation intégrative. Les clones recombinants sont sélectionnés de par leur résistance à la génétidine et la restauration de l'auxotrophie de l'histidine ainsi que selon leur niveau d'expression de la protéine d'intérêt, comme décrit précédemment<sup>368,369</sup>. Les clones recombinants sont stockés à – 80°C dans un milieu YEP glycérolé (10 g/L extrait de levure, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose avec 20 % (v/v) de glycérol).

Les clones sont déstockés stérilement sur un milieu gélosé YPG agar sans antibiotique (10 g/L extrait de levure, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose, 20 g/L agar) puis incubés 24 h à 30 °C. Une colonie est ensuite repiquée sur un milieu gélosé YPG agar additionné de 50 µg/mL de génétidine pendant 48h à 30 °C. Les levures sont utilisées pour inoculer 500 mL de milieu BMGY (10 g/L extrait de levure, 20 g/L peptone, 13,4 g/L source d'azote YNB sans acides aminés, 10 % (v/v) glycérol, 0,1 M tampon phosphate KPi à pH 6) dans un erlenmeyer à ailettes de 2,5 L. La préculture est incubée toute la nuit à 30 °C sous agitation (220 rpm). Le lendemain, la préculture est diluée dans du BMGY pour atteindre une densité optique à 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 2,5 puis est incubée à nouveau à 30 °C sous agitation jusqu'à atteindre une OD<sub>600</sub> d'environ 10. Les cellules sont alors récupérées stérilement par centrifugation (4 000 g pendant 5 min, température ambiante). Les culots sont resuspendus dans 2 fois le volume initial de milieu BMMY (10 g/L extrait de levure, 20 g/L peptone, 13,4 g/L YNB, 0,5 % (v/v) méthanol, 0,1 M tampon phosphate KPi à pH 6), soit une OD<sub>600</sub> d'environ 5, afin d'induire la production de protéines. Dans le cas de la protéine A<sub>2</sub>A, le milieu BMMY est additionné de 2,5 % (v/v) DMSO et de 1 µM de ZM-241385 (ligand antagoniste). La culture est incubée à 22 °C sous agitation (220 rpm) pendant 18 à 20 h. Les cellules sont récoltées par centrifugation (4000 g, 5 min à température ambiante) puis lavées 2 fois dans du tampon PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM

---

<sup>e</sup> Cette souche est auxotrophe pour l'histidine (le gène *his4* codant pour l'histidinol déshydrogénase présente une mutation) et est déficiente pour les protéases endogènes codées par les gènes *pep4* et *prb1*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 17,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Chaque culot d'environ 6 à 7 g correspondant à 250 mL de culture est stocké dans un tube de 50 mL à - 80 °C ou est utilisé directement pour procéder à la préparation des échantillons membranaires.

## 1.2. Préparation des membranes totales de levures de *Pichia pastoris*

Afin de limiter l'action des protéases, l'ensemble des manipulations sont réalisées dans la glace. Chaque culot (6 à 7 g) est resuspendu dans 25 mL de tampon de TNGE (50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 % glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF ajouté extemporanément) puis additionné de 10 mL de microbilles de verre de 0,5 mm (Sigma). Les cellules sont lysées mécaniquement avec un homogénéiseur (FastPrep 24, MP Biomedicals), par 3 cycles alternant 40 secondes d'agitation à vitesse maximale (6 m/s) et 40 secondes de refroidissement sur glace. Le lysat contenant les membranes est récupéré par une centrifugation à 4 000 g pendant 5 min à 4°C tandis que les cellules non lysées et débris cellulaires sont repris dans 15 mL de tampon TNGE pour un nouveau cycle de lyse. Au total 3 cycles sont nécessaires pour lyser les levures de manière optimale. Les lysats obtenus à chaque cycle sont ensuite regroupés, centrifugés 5 min à 4 000 g à 4 °C pour enlever les derniers débris puis ultracentrifugés 30 min à 100 000 g à 4 °C. Les culots contenant les fractions membranaires totales sont pesés afin de déterminer la masse membranaire, puis ils sont récupérés et resuspendus par homogénéisation au potter dans du tampon TNG (50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 % glycérol, 1 mM PMSF ajouté extemporanément) à raison de 45 mL de tampon pour 4 culots de levures (soit l'équivalent d'1 L de culture). Les préparations de membranes sont aliquotées par 10 mL dans des tubes de 15 mL puis stockées à -80 °C.

On distinguera la concentration massique en membranes qui correspond à la masse de membranes, de la concentration protéique, qui correspond à la quantité de protéines totales dans les préparations de membranes. Les volumes indiqués permettent d'obtenir des préparations de membranes dont la concentration protéique est d'environ 10 mg/mL et dont la concentration massique en membranes est d'environ 150 mg/mL.

### 1.3. Extraction et purification des protéines à l'aide de détergents

Les procédures préalablement développées au laboratoire pour la solubilisation et la purification de la protéine A<sub>2</sub>A ont été légèrement modifiées afin d'améliorer le rendement de protéines purifiées. Le récepteur est extrait et purifié dans des micelles mixtes de détergent et de CHS (Anatrace) dans un ratio massique 10 : 1, en présence d'un ligand antagoniste, le DPCPX, non maintenu lors de la purification pour ne pas interférer dans les études d'interaction ligand/récepteur réalisées ensuite.

Contrairement à la protéine A<sub>2</sub>A, aucun protocole de référence n'était établi au laboratoire pour la purification de la protéine TRPV4. Un criblage de quelques détergents les plus fréquemment utilisés a donc été réalisé et différentes conditions de tampons, de détergents et de leur concentration ont été testés pendant la purification afin d'optimiser les résultats obtenus par microscopie électronique.

#### 1.3.1. Criblage de détergents

La solubilisation de TRPV4 est testée en présence de différents détergents à une concentration finale de 1 % (w/v). Le tampon de solubilisation est composé de 50 mM Tris HCl pH 7,4 et de 500 mM NaCl, le tout dans un volume réactionnel de 1 mL pour une concentration finale en protéines de 2 mg/mL. Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante sur un dispositif rotatif puis les protéines solubilisées sont récupérées dans le surnageant après ultracentrifugation pendant 30 min à 100 000 g et à 4 °C. Le culot résiduel est resuspendu dans 1 mL de tampon de solubilisation sans détergent. Des fractions de 15 µL d'extrait soluble et du culot resuspendu sont déposées sur un gel SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés comme décrit au paragraphe « 2.2 Électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et immunodétection ».

#### 1.3.2. Solubilisation

La composition des tampons utilisés pour la totalité de la procédure de purification est détaillée dans le Tableau 6.

Les préparations membranaires sont diluées à 2 mg/mL dans un tampon de solubilisation. La suspension est incubée pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation douce puis les protéines solubilisées sont récupérées après ultracentrifugation pendant 30 minutes à 100 000 g, à 4°C. Le surnageant est

additionné de 25 mM (TRPV4) ou 30 mM (A<sub>2</sub>A) d'imidazole puis est filtré sur un filtre de 0,22 µm avant d'être chargé sur une colonne de nickel.

**Tableau 6. Composition des tampons de purification en détergent pour A<sub>2</sub>A et TRPV4.**

Protéine	Tampon	Composition
A <sub>2</sub> A	Solubilisation	50 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,5 %/ 0,05 % DDM/CHS, 1 µM DPCPX, 0,3 mM EDTA, 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases/100 mL de tampon
	Tampon A	50 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,05 %/ 0,005 % DDM/CHS, 30 mM imidazole
	Tampon B	50 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,05 %/ 0,005 % DDM/CHS, 500 mM imidazole
	Tampon GF	50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02 %/ 0,002 % DDM/CHS
TRPV4	Solubilisation	50 mM Tris HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, détergent (DDM ou LMNG) 0,5%/0,05 % CHS, 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases/100 mL de tampon.
	Tampon A	50 mM Tris HCl pH 7,4 500 mM NaCl, détergent, 25 mM imidazole
	Tampon B	50 mM Tris HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, détergent, 500 mM imidazole
	Tampon GF	50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, détergent

### 1.3.3. Chromatographie d'affinité sur nickel

Les protéines sont purifiées grâce à leur tag histidine sur une colonne de nickel (HisTrapHP 1 mL, Cytiva) montée en série sur un automate de purification (ÄKTA Pure, Cytiva). La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de colonne (CV) de tampon A puis le solubilisât est chargé sur la colonne à un débit de 1 mL/min. Après le chargement, la colonne est lavée avec 10 CV de tampon A pour éliminer les protéines non ou faiblement retenues sur la colonne. Pour A<sub>2</sub>A, les protéines sont élues par une stratégie mêlant un gradient de 0 à 24 % de tampon B pendant 6 CV puis un plateau à 24 % de tampon B pendant 5 CV suivi d'un palier à 100 % de tampon B pendant 10 CV. Pour TRPV4, différents détergents à différentes concentrations ont été testés pour optimiser la purification. Ils seront précisés au cas par cas. Pendant la purification, les protéines sont élues par un premier palier à 30 % de tampon B pendant 10 CV puis un palier à 100 % de tampon B pendant 10 CV. De plus, dans

certains cas, les tampons ont été additionnés de lipides (0,1 mg/mL POPC:POPG à un ratio 3 :2) et/ou de ligand (1  $\mu$ M GSK2193874).

Les fractions d'intérêt de 500  $\mu$ L sont soit rassemblées et concentrées par centrifugation sur filtre (Vivaspin, seuil de coupure (MWCO) 50 kDa, Sartorius) à une vitesse maximale de 2 000 g, soit directement purifiées par chromatographie d'exclusion stérique.

#### *1.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique*

Les échantillons issus de chromatographie d'affinité sont purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL, (Cytiva) montée sur un automate de purification (ÄKTA FPLC, Cytiva). La colonne est équilibrée avec 30 mL de tampon GF puis l'échantillon est injecté sur la colonne par une boucle d'injection et les protéines sont éluées dans le même tampon à un débit de 0,3 mL/mL. Des fractions de 0,5 mL sont récoltées par le collecteur automatique et l'absorbance à 280 nm est suivie tout au long de la purification.

### **1.4. Extraction et purification des protéines à l'aide de polymères amphiphiles**

#### *1.4.1. Préparation des polymères*

Les SMA et dérivés proviennent d'un don de Cray Valley. Ils sont hydrolysés à NovAliX selon le protocole décrit<sup>370</sup>. Ils sont resuspendus dans un tampon 25 mM Tris pH 8 juste avant d'être utilisés. Le SMA-ED est synthétisé à NovAliX à partir du SMA 2000 selon le protocole décrit par Ravula et collègues<sup>274</sup>.

Les CyclAPols proviennent du Laboratoire de Biologie Physico-Chimique des Protéines Membranaires (Paris) où ils sont préparés selon le protocole décrit<sup>271</sup>. Ils sont resuspendus dans de l'eau à 20 mg/mL juste avant d'être utilisés.

#### *1.4.2. Criblage des polymères*

Différents types de polymères ont été testés lors de ce projet : des polymères de SMA et dérivés (les SMA 2000, SMA 3000, SMA 1440, SMA-ED, DIBMA, et XIRAN) et des amphipols de nouvelle génération (les CyclAPols C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50 et C<sub>8</sub>-C<sub>0</sub>-50).

La solubilisation des protéines est testée en présence de différents SMA et dérivés à une concentration finale de 2,5 % (w/v). Le tampon de solubilisation est composé de 20 mM Tris HCl pH 8 et de 500 mM NaCl (150 mM NaCl pour le SMA

1440, qui précipite à 500 mM de NaCl), le tout dans un volume réactionnel de 1 mL pour une concentration massique finale en membranes de 30 mg/mL.

Pour les CyclAPols, les tests de solubilisation sont effectués dans le même tampon, avec différents ratios protéines : polymères (m/m), le tout dans un volume réactionnel de 1 mL avec une concentration protéique finale de 2 mg/mL.

Dans chaque cas, le mélange est incubé 1 h à température ambiante sur un dispositif rotatif puis les protéines solubilisées sont récupérées dans le surnageant après ultracentrifugation pendant 30 min à 100 000 g et à 4 °C. Le culot résiduel est resuspendu dans 1 mL de tampon de solubilisation sans polymère additionné de 1 % de SDS pour aider à la resuspension du culot. Des fractions de 15 µL d'extrait soluble et du culot resuspendu sont déposées sur un gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées comme décrit au paragraphe « 2.2 Électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et immunodétection ».

#### 1.4.3. Solubilisation par les SMA

La composition des tampons pour la totalité de la procédure de purification par les polymères est détaillée dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Composition des tampons pour la purification des protéines par les polymères.**

Tampon		Composition
SMA IMAC	Solubilisation A <sub>2</sub> A	50 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 2,5 % (m/v) SMA, 1 µM DPCPX, 0,3 mM EDTA, 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases/100 mL de tampon
	Solubilisation TRPV4	50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 2,5 % (m/v) SMA, 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases/100 mL de tampon
	Tampon A	50 mM HEPES/Tris pH 8, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole
	Tampon B	50 mM HEPES/Tris pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole
CyclAPol IMAC	Solubilisation	50 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 2 mg/mL C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -50, 1 µM DPCPX, 0,3 mM EDTA, 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases/100 mL de tampon.
	Tampon A	50 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole
	Tampon B	50 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole
CyclAPol anti-flag	Tampon A	50 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl
	Tampon B	50 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 100 µg/mL peptide flag

Les préparations membranaires sont diluées à 30 mg/mL (concentration massique) dans un tampon de solubilisation soit un volume final de 30 mL pour une expérience type où 100 mg de protéines totales sont mises en jeu. La suspension est incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce puis les protéines solubilisées sont récupérées après ultracentrifugation pendant 30 minutes à 100 000 g, à 4 °C. Le surnageant est additionné de 25 mM d'imidazole puis est filtré sur un filtre de 0,22 µm avant d'être chargé sur une colonne de nickel.

#### *1.4.4. Solubilisation par le CyclAPol C6-C2-50*

Les préparations membranaires sont diluées à 2 mg/mL (concentration protéique) dans un tampon de solubilisation soit un volume final de 50 mL pour une expérience type où 100 mg de protéines totales sont mises en jeu. La suspension est incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce puis les protéines solubilisées sont récupérées après ultracentrifugation pendant 30 minutes à 100 000 g, à 4 °C. Le surnageant est additionné de 25 mM d'imidazole puis est filtré sur un filtre de 0,22 µm avant d'être chargé sur une colonne de nickel.

#### *1.4.5. Chromatographie d'affinité sur nickel (IMAC)*

Comme décrit précédemment, les protéines sont purifiées grâce à leur tag histidine sur une colonne de nickel (HisTrapHP 1 mL, Cytiva) montée en série sur un automate de purification (ÄKTA Pure, Cytiva). La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de colonne (CV) de tampon A puis le solubilisat est chargé sur la colonne à un débit de 0,5 mL/min. Après le chargement, la colonne est lavée avec 10 CV de tampon A pour éliminer les protéines non ou faiblement retenues sur la colonne. Les protéines sont élues par un premier palier à 4 % (A<sub>2</sub>A) ou 8 % (TRPV4) de tampon B pendant 10 CV puis un palier à 100 % de tampon B pendant 10 CV. Les fractions d'intérêts de 500 µL sont ensuite soit analysées directement ou purifiées par une 2<sup>ème</sup> étape de purification sur un gradient de glycérol, par gel filtration ou par une chromatographie sur une résine anti-flag.

#### *1.4.6. Chromatographie d'affinité sur résine anti-flag*

Une deuxième chromatographie d'affinité sur une résine anti-flag est réalisée quand cela est mentionné. 1 mL de résine M2 anti-flag est lavé avec 10 mL d'eau puis avec 3 fois 10 mL de tampon A avant d'être conditionné dans une colonne Tricorn 5/50 (Cytiva). La colonne est ensuite montée en série sur un automate de purification (ÄKTA Pure). Les protéines purifiées issues de l'IMAC sont injectées sur la colonne. La

fraction non retenue (flow-through, FT) est collectée dans des fractions de 1 mL et la colonne est lavée avec 10 CV de tampon A. Les protéines sont ensuite éluées avec du tampon B dans des fractions de 500  $\mu$ L. Les différentes fractions d'intérêt sont analysées par SDS-PAGE et Western-Blot.

#### *1.4.7. Séparation sur gradient de glycérol*

Pour améliorer la pureté de l'échantillon après la chromatographie d'affinité, une stratégie de séparation des particules sur un gradient de glycérol a été envisagé.

Les tampons sont constitués de 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl et de différentes concentrations décroissantes de glycérol déposées successivement dans un tube adapté de manière à former un gradient de composition choisie. Environ 450  $\mu$ L d'échantillon sont chargés en haut du gradient. Les tubes sont ultracentrifugés pendant 16 h à 4 °C dans un rotor SW 60 ou SW 41, à 40 000 rpm. Après l'ultracentrifugation, des fractions de 1 mL ou de 200  $\mu$ L sont récupérées délicatement à la pipette en partant du haut du tube. Ces fractions sont analysées par SDS-PAGE. Les plus intéressantes sont rassemblées, éventuellement flash-congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C, pour être analysées plus tard.

#### *1.4.8. Dialyse et concentration des échantillons*

Quand cela est précisé, les échantillons sont chargés dans une cassette de dialyse Slide A Lyzer 10 000 MWCO (Thermo Fisher) préalablement hydratée pendant 5 min dans du tampon. Ils sont ensuite dialysés contre 750 mL de tampon 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl pendant 2 h à RT puis pendant 16 h à 4°C contre 1 L de tampon renouvelé. Les échantillons sont ensuite concentrés sur un concentrateur Vivaspin 500 10 000 MWCO (Sartorius).

## 2. Analyses biochimiques

### 2.1. Dosage protéique/Quantification des protéines

La concentration en protéines des membranes est déterminée par un dosage colorimétrique basé sur une réaction à l'acide bicinchoninique (BCA ; BCA Protein Assay Kit, Pierce). L'échantillon, dilué au 20<sup>ème</sup> dans du tampon TNG, est dosé contre une gamme étalon de BSA (7 points de 0 µg à 20 µg de protéines). 1 mL de réactif est ajouté à 50 µL d'échantillon dilué et le tout est incubé 30 min à 37 °C avant lecture à 562 nm. La concentration protéique des membranes est calculée par rapport à la gamme étalon de BSA.

Pour les protéines purifiées en détergent, la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm par un NanoDrop™ 2000 (Thermo-Fisher). La concentration est ensuite calculée selon la loi de Beer-Lambert :  $A_{280\text{ nm}} = \varepsilon \times l \times C$ , où  $A_{280\text{ nm}}$  est l'absorbance à 280 nm,  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire en L/mol/cm,  $l$  est la longueur du trajet optique en cm et  $C$  la concentration molaire en mol/L.

Pour les protéines purifiées en SMA, la concentration est déterminée par analyse densitométrique de l'intensité des bandes sur un gel SDS-PAGE. Une droite d'étalonnage est réalisée à partir de protéines purifiées en détergent et dont la concentration est connue (déterminée par mesure à 280 nm). Les analyses de densitométrie sont réalisées grâce au logiciel ImageJ.

### 2.2. Electrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et immunodétection

Les échantillons protéiques sont mélangés dans un volume équivalent dans du tampon de charge (100 mM Tris HCl pH 6,8, 25 % glycérol, 8 % SDS, 0,2 g/L Bleu brillant de Coomassie G250, 200 mM DTT) puis chargés dans un gel de polyacrylamide Tris-Tricine à 10 %. Le gel de séparation est composé de 10 % (v/v) d'acrylamide:bisacrylamide 29:1, 0,8 M Tris HCl pH 8,45 - 0,08 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) de glycérol, 0,15 % (m/v) d'APS et 0,06 % (v/v) de TEMED et le gel de concentration est composé de 4 % (v/v) d'acrylamide:bisacrylamide 29:1, 0,8 M Tris-HCl pH 8,45 - 0,08 % SDS, 0,15 % (m/v) d'APS et 0,09 % (v/v) de TEMED. Les protéines sont séparées par un courant électrique à 100 V pendant environ 1h30 dans un tampon de migration Tris-Tricine (100 mM Tris HCl pH 8,3, 100 mM Tricine, 0,1 % SDS). La taille

apparente des protéines est déterminée grâce à un marqueur de poids moléculaire coloré et déposé en parallèle des échantillons (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Les protéines sont alors colorées au bleu de Coomassie (Quick Coomassie Stain, Generon) ou transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm Protran, Amersham) pour une révélation par immunodétection. Dans ce cas, le transfert des protéines est réalisé pendant environ 1h30 par l'application d'un courant de 100 V dans un tampon Tris-glycine (25 mM Tris base, 200 mM glycine, 0,02 % SDS, 20 % éthanol). La membrane est ensuite incubée pendant 1 h dans un tampon de blocage (PBS, 0,02 % Tween 80, 5 % (m/v) lait) puis incubée pendant 1 h avec l'anticorps primaire approprié (cf Tableau 8 pour les anticorps utilisés) dilué dans le tampon de blocage. Après trois lavages de 5 min dans du tampon PBST (PBS, 0,02 %, Tween 80), la membrane est incubée pendant 1 h dans l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome DyLight® 488. Les protéines biotinyliées sont révélées grâce à une heure d'incubation avec de l'ExtrAvidin-HRP diluée à 1/1000 (v/v) dans du tampon de blocage. La membrane est lavée 3 fois pendant 5 min dans du tampon PBST avant d'être révélée, selon le couplage de l'anticorps secondaire, soit sur un scanner Odyssey (Li-Cor) pour les anticorps couplés au fluorochrome, soit par chimiluminescence pour les anticorps couplés à la HRP (kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific™) et visualisées sur une caméra Amersham Imager 680 (GE Healthcare).

**Tableau 8. Liste et caractéristiques des anticorps utilisés**

Nom	Référence	Dilution	Fournisseur
Anti-HIS	Mouse Penta-his antibody	1:10000	Qiagen
Anti-FLAG	Mouse monoclonal Anti-FLAG® M2	1:2000	Sigma-Aldrich
Anti-souris-Dylight 488	Goat anti-mouse antibody DyLight® 488 Conjugated	1:10000	Bethyl Laboratories
Avidine-HRP	ExtrAvidin®-Peroxidase	1:1000	Sigma-Aldrich

## 2.3. Test de liaison de radioligand (récepteur A<sub>2A</sub>)

### 2.3.1. Courbes de saturation

Les courbes de saturation sont réalisées à l'aide d'une gamme de concentration, généralement de 5 à 150 nM ou 200 nM, du ligand antagoniste tritié [<sup>3</sup>H]-ZM241385 (American Radiolabeled Chemicals). Une concentration de 10 µM de ligand froid CGS15943 (Tocris) est utilisée pour mesurer la liaison non spécifique. Les échantillons sont dilués à une quantité finale de 100 ng par puits pour les protéines purifiées et 10 µg par puit pour des échantillons membranaires dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA pour les SMALPs purifiés et dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,05%/0,005% DDM/CHS pour les protéines purifiées en détergent. Dans une plaque 96-puits, 80 µL d'échantillon additionnés de 10 µL de tampon et 10 µL de radioligand sont distribués en triplicats dans les puits destinés à évaluer la liaison totale (spécifique et non spécifique) du ligand radioactif. Pour les puits servant à mesurer la liaison non spécifique, 80 µL d'échantillon sont distribués par puits et additionnés de 10 µL de ligand froid et 10 µL de radioligand, également en triplicats. Après 1 h d'incubation à RT sous agitation, lorsque l'on travaille avec des protéines purifiées, 100 µL de γ-globuline 0,1 % et 100 µL de PEG 6000 à 25 % (m/v) sont ajoutés dans chaque puits. Les échantillons sont mélangés et incubés pendant 15 min à RT avant d'être filtrés à l'aide d'un appareil de filtration de microplaques (Unifilter-96 Cell Harvester, Packard) sur un filtre GF/B (96-well UniFilter GF/B plates, Perkin Elmer) pré-incubé dans un tampon 50 mM Tris pH 8, 0,5 % (v/v) PEI. Le filtre est ensuite lavé 3 fois avec 1 mL de tampon de lavage froid (50 mM Tris, 8 % (m/v) PEG 6000). Après séchage de la plaque à RT, 30 µL de cocktail de scintillation (Microscint 20, Perkin Elmer) sont ajoutés dans chaque puit puis la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation TopCount (Perkin Elmer) après une heure d'incubation à l'obscurité. Les données sont analysées par le logiciel Prism version 4.0c (GraphPad) en ajustant à une hyperbole à un site de liaison. Les valeurs du nombre de sites de liaison (B<sub>max</sub>) et la constante de dissociation à l'équilibre (K<sub>D</sub>) sont déterminées selon l'équation :

$$Y = \frac{B_{max} \times X}{K_D + X}$$

B<sub>max</sub> : nombre total de sites de liaison (pmol/mg)

K<sub>D</sub> : constante de dissociation à l'équilibre (mol/L)

### 2.3.2. Courbes de déplacement

Des courbes de déplacement sont réalisées pour évaluer la capacité de différents ligands du récepteur A<sub>2A</sub> à déplacer une concentration fixe du ligand antagoniste radioactif [<sup>3</sup>H]-ZM241385, typiquement 10 nM (10 µL). Les protéines purifiées sont diluées à une quantité finale de 100 ng par puit ou 10 µg pour les préparations de membranes dans le tampon approprié (Tableau 9) (80 µL). Le radioligand est chassé par des concentrations croissantes de ligands froids (10 µL). Sept à huit concentrations comprises entre 10<sup>-3</sup> et 10<sup>-11</sup> M sont testées et chaque condition est réalisée en duplicité. Les ligands testés sont le ZM241385, le XAC, le CGS15943, le DPCPX, l'adénosine et le NECA. Les échantillons sont ensuite traités de la même façon que pour les courbes de saturation, à l'exception des membranes qui ne sont pas précipitées par le PEG et la γ-globuline avant d'être filtrées. Les données sont analysées par le logiciel Prism version 4.0c (GraphPad). Les valeurs de constante d'inhibition (K<sub>i</sub>) de chaque ligand sont calculées selon l'équation :

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{[RL]}{K_D}}$$

K<sub>i</sub> : constante d'inhibition à l'équilibre du compétiteur (mol/L)

IC50 : concentration inhibitrice médiane (mol/L)

[RL] : concentration de radioligand mise en jeu (mol/L)

K<sub>D</sub> : constante de dissociation à l'équilibre du radioligand (mol/L)

Tableau 9. Composition des tampons de liaison pour les expériences de déplacement

Échantillon	Composition
Membranes	50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA
Protéines en détergent	50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 0,05 %/0,005 % DDM/CHS
SMALPs	50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA

### 3. Analyses biophysiques

#### 3.1. Microscopie électronique à transmission

##### 3.1.1. Coloration négative

Les échantillons sont analysés sur la plateforme de microscopie de NovAliX. Brièvement, une grille Quantifoil avec un film de support en carbone est effluvée (*glow-discharge*) afin de rendre la surface du carbone hydrophile puis 4 µL d'échantillons y sont déposés pour être adsorbés pendant 1 minute et colorés négativement avec du colorant Nano-W (Nanoprobes) pendant 1 minute. L'excès de liquide est enlevé avec du papier-filtre Wattman. Les échantillons sont ensuite observés avec un microscope électronique Glacios (Thermo Scientific) sous une tension de 200 kV. Les images sont enregistrées à un grossissement de 120 000 fois avec une caméra Falcon III.

##### 3.1.2. Cryo-microscopie

4 µL de la protéine purifiée à environ 1 mg/mL sont déposés sur une grille effluvée Quantifoil R1,2/1,3 mesh 200. Le temps d'absorption est ajusté à 3,5 secondes à une force de 0 puis les grilles sont vitrifiées dans de l'éthane liquide à l'aide d'un Vitrobot Mark IV (FEI) dont la température a été réglée à 4°C et à un taux d'humidité de 100 %. Les grilles sont ensuite stockées dans l'azote liquide avant d'être observées au microscope.

Les grilles sont observées avec un microscope électronique Glacios sous une tension de 200 kV. Pour la structure présentée dans la partie résultats, 4000 micrographes ont été enregistrés avec une caméra Falcon III, à un grossissement calibré de 190 000 fois, soit une taille de pixel de 0,75 Å, sur une plage de défocalisation de -0,8/-2,8. Vingt images de films ont été enregistrées à une dose finale d'électrons de 58 e/Å<sup>2</sup> par film pour un temps d'exposition de 2,5 sec. Au total, 820 000 particules sont analysées et classées dans des classes 2D. 86 000 particules sont sélectionnées pour reconstituer des classes 3D et 62 000 particules sont finalement gardées pour la reconstruction 3D finale. Les images sont traitées par le logiciel RELION et les refinements sont réalisées à l'aide du logiciel CryoSPARC.

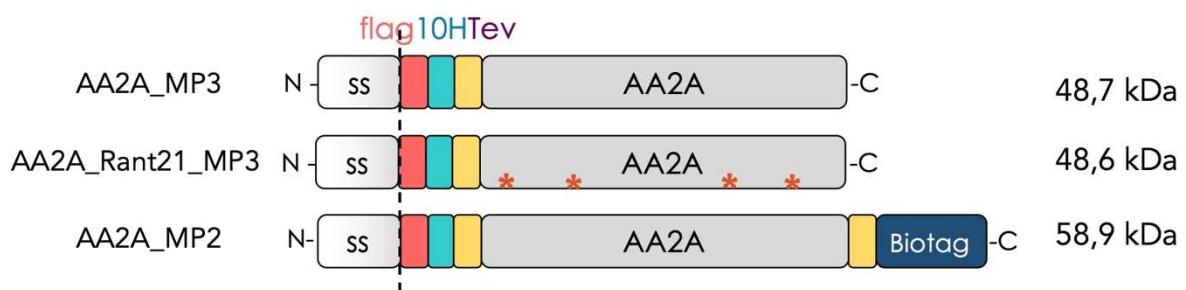
### 3.2. Résonance plasmonique de surface

Les études par résonance plasmonique de surface ont été réalisées au sein de NovAliX sur un Biacore T200 (Cytiva). Toutes les expériences sont réalisées à 18°C sur une puce SA (Cytiva) qui présente une surface de streptavidine fixée de manière covalente à une matrice de carboxyméthyldextrane. La puce est conditionnée en faisant passer un tampon 1 M NaCl, 50 mM NaOH pendant 3 fois 60 secondes à un débit de 10 µL/min puis la puce est équilibrée en injectant du tampon d'immobilisation (30 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 2 % DMSO). Les protéines sont injectées sur la puce test à 2 µL/min afin d'atteindre un niveau d'immobilisation d'environ 4000 RU. La puce de référence est laissée vide.

Les expériences d'interactions sont ensuite effectuées en injectant des concentrations croissantes de différents ligands, selon une cinétique multi-cycles. Les ligands testés sont le XAC, le ZM241385, le DPCPX, le CGS15943, l'adénosine et le NECA. Les ligands sont à des concentrations stocks de 1 à 10 mM dans du DMSO et ils sont dilués selon une gamme de concentration de 3,2 – 10 – 31,7 – 100 – 317 – 1000 – 3160 – 10000 – 31600 - 100000 nM dans un tampon 30 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, additionné de 2 % DMSO (qui est également le tampon de course), afin de limiter les artefacts liés à l'indice de réfraction élevé du DMSO. Une correction du solvant (*solvent correction*) est incluse pour cela. Des concentrations croissantes de ligands sont injectées successivement à un débit de 30 µL/min, avec un temps de contact de 90 sec et un temps de dissociation de 180 sec. Chaque expérience est réalisée en duplicita. Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Biacore T200 Evaluation Software (Cytiva). Les courbes de SPR sont corrigées par la soustraction du signal dans la piste de référence et du signal sans composés. Les constantes d'affinité et de cinétique sont déterminées par corrélation avec des courbes de référence, en se basant sur le postulat selon lequel la liaison s'effectue à un ratio molaire 1 : 1, selon un modèle de Langmuir.



## **RESULTATS ET DISCUSSION**



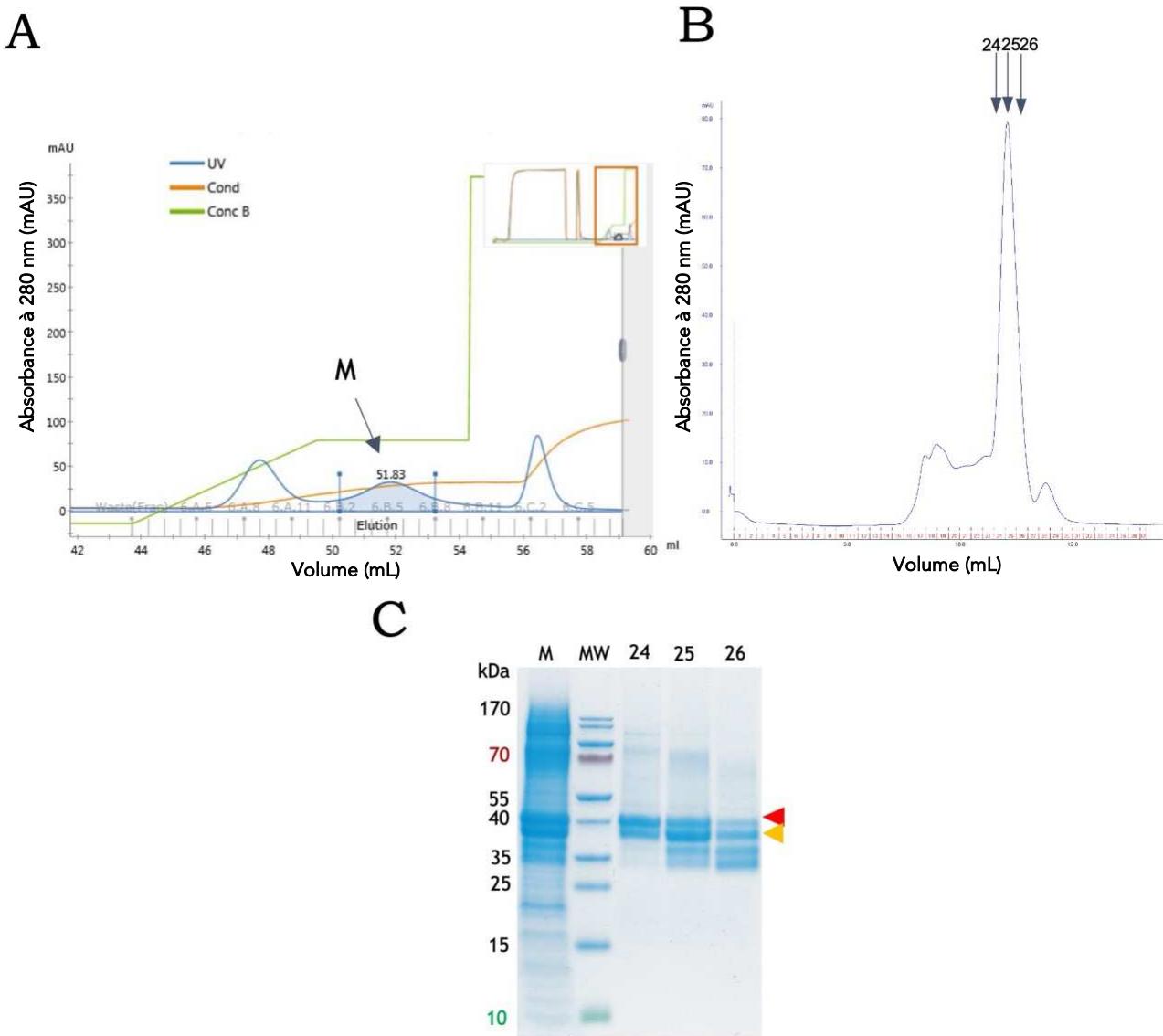
**Figure 28. Représentation schématique des construits recombinants de la protéine A<sub>2</sub>A exprimée dans la levure *Pichia pastoris*.** SS : séquence de sécrétion du facteur  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* ; flag : étiquette flag ; 10H : étiquette décahistidine ; Tev : site de clivage de la protéase TEV ; Biotag : domaine de biotinylation. Le nom de la construction est indiqué à gauche et sa taille à droite. Les 4 étoiles rouges symbolisent les 4 mutations introduites dans la séquence de la protéine, elles sont placées de façon aléatoire sur ce schéma.

## 1. Purification du récepteur A<sub>2</sub>A par des polymères amphiphiles et caractérisation par des études de liaison ligand/récepteur

Le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A est une protéine modèle très étudiée et fréquemment utilisée lors du développement de nouvelles technologies. Les conditions de production et de purification en détergent développées au laboratoire ont déjà été décrites à plusieurs reprises<sup>342,371,372</sup>, seules quelques optimisations ont été apportées au cours de ce travail afin d'améliorer les rendements de purification.

### 1.1. Constructions recombinantes du récepteur et clonage dans la levure

Nous disposons au laboratoire de plusieurs constructions recombinantes du récepteur A<sub>2</sub>A, dont principalement trois ont été utilisées dans le cadre de ce projet (Figure 28). La version la plus proche de la version sauvage du récepteur est nommée A<sub>2</sub>A\_MP3. Cette construction contient du côté N-ter une étiquette FLAG et une étiquette décahistidine permettant respectivement sa détection par Western-Blot et sa purification par chromatographie d'affinité. En amont de ces étiquettes, on trouve une séquence de sécrétion provenant du facteur  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* pour favoriser l'adressage des protéines à la membrane plasmique, séquence qui va être clivée de manière endogène lors de la maturation de la protéine dans l'appareil de Golgi. Enfin, un site de clivage par la protéase TEV est présent, permettant, si nécessaire, de se débarrasser des différentes étiquettes. Une seconde construction, A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3, est une version dans laquelle plusieurs mutations ont été introduites afin d'améliorer la thermostabilité du récepteur<sup>81</sup>. Il faut également noter que la protéine est stabilisée dans une conformation dite inactive, c'est-à-dire qu'elle est toujours capable de lier les ligands antagonistes mais plus les agonistes. La mise au point des conditions expérimentales de solubilisation par les polymères a été effectuée sur ce construit. Enfin, la version utilisée pour toutes les caractérisations pharmacologiques et biophysiques est nommée A<sub>2</sub>A\_MP2. Elle a les mêmes caractéristiques que A<sub>2</sub>A\_MP3 du côté N-ter mais possède une séquence de biotinylation du côté C-ter. Cette séquence correspond au domaine de biotinylation de la transcarboxylase de la bactérie *Propionibacterium shermanii*. Elle est reconnue par la biotine ligase endogène de *P. pastoris* qui va biotinyler *in vivo* les récepteurs produits<sup>373</sup>. Enfin, un site de clivage par la protéase TEV est présent de part et d'autre du gène codant le récepteur, permettant si nécessaire de se débarrasser des différentes étiquettes.



**Figure 29. Purification du récepteur A<sub>2A</sub>\_Rant21\_MP3 en DDM/CHS.** (A) Chromatographe d'élution de la colonne d'affinité au nickel. L'élution s'effectue au moyen d'un gradient de tampon B (vert) entre 0 et 24 % de tampon B, puis d'un palier à 24 % de tampon B et enfin d'un dernier palier à 100 % de tampon B. Les fractions d'élutions du deuxième pic sont assemblées pour former le pool M. (B) Chromatographe de gel filtration du pool M. Les fractions 22, 23, 24 et 25 sont matérialisées par les flèches. (C) Analyse SDS-PAGE des fractions par coloration au Bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. MW : marqueur de poids moléculaire. La flèche rouge correspond à la forme entière du récepteur, la flèche orange correspond à la forme tronquée du récepteur.

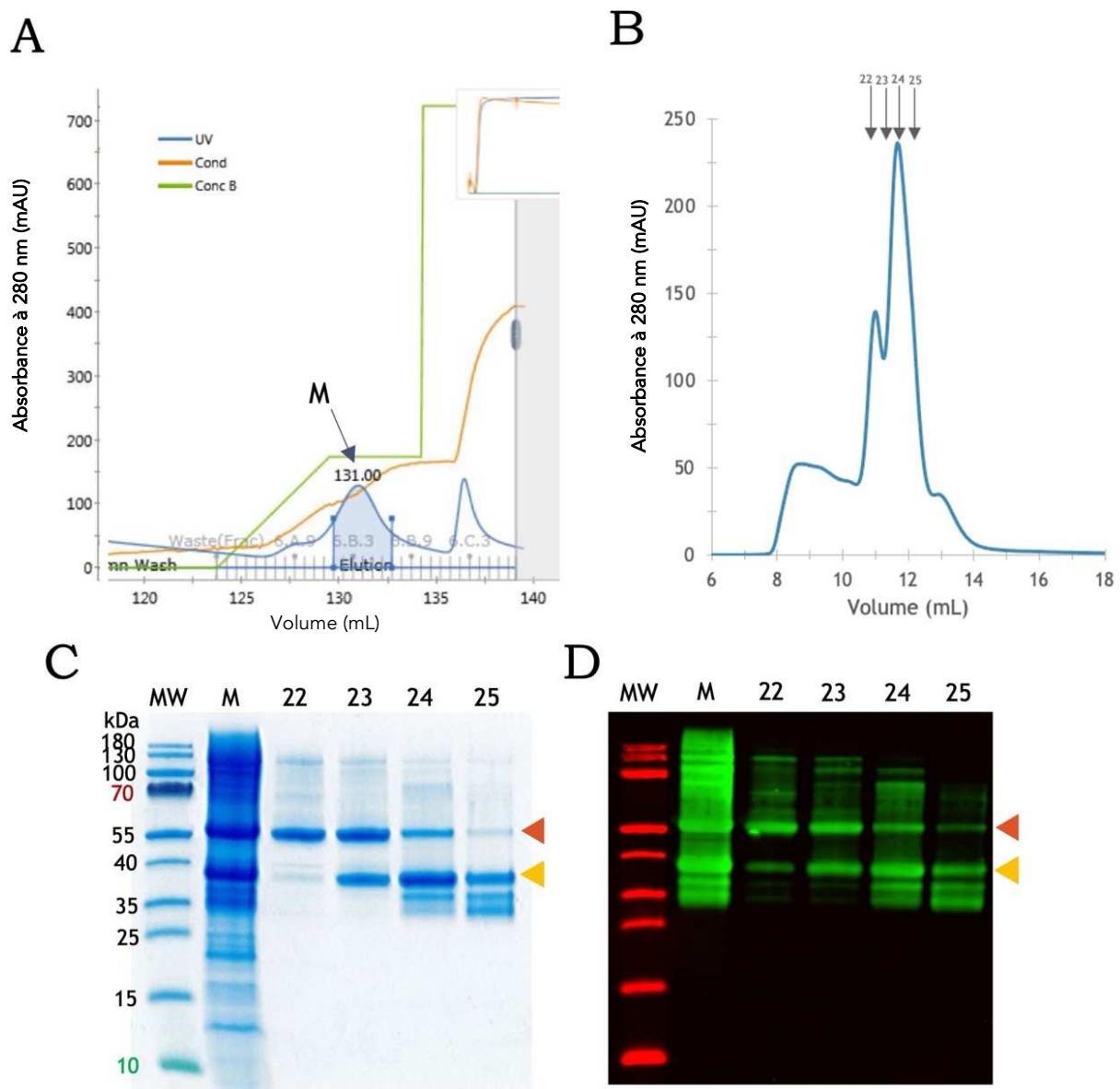
Toutes ces constructions sont clonées dans un vecteur pPIC9K, sous le contrôle du promoteur  $P_{AOX1}$  inductible au méthanol. Chaque vecteur est ensuite intégré dans le génome de la levure de manière stable par transformation intégrative. Pour chaque construct un clone présentant des niveaux d'expression intéressants de la protéine d'intérêt est sélectionné et stocké à -80°C dans du glycérol afin d'être utilisé régulièrement lors des différentes productions.

## 1.2. Production et préparations membranaires de levures

Chaque lot de production représente généralement des volumes de 2 à 4 L. Les levures sont d'abord cultivées à 30°C, leur température de croissance optimale, dans un milieu contenant du glycérol, ce qui permet d'augmenter rapidement la biomasse. La production de protéine est ensuite induite pendant 18 h environ en changeant de milieu pour introduire du méthanol. La baisse de température à 22°C, l'ajout de ligand, de DMSO et dans le cas de A<sub>2</sub>A\_MP2 de biotine, sont réalisés car ces conditions ont préalablement été identifiées comme favorisant l'expression fonctionnelle de ce récepteur<sup>342</sup>. Un litre de culture permet de récolter environ 28 g de cellules (poids humide du culot) qui génèrent en moyenne 500 mg de préparations membranaires (quantité de protéines totales dosées par un dosage BCA) généralement resuspendues avant stockage à une concentration protéique de 10 mg/mL. Ces clones sont utilisés de longue date au laboratoire et donnent des résultats très reproductibles en termes de rendement et de qualité des protéines produites.

## 1.3. Purification en détergent

La solubilisation et la purification en détergent des différents construits s'effectuent de la même façon. Après avoir été extraites de leur environnement membranaire initial par un mélange de DDM et de CHS, les protéines sont purifiées selon un protocole standard en deux étapes. La première consiste en une chromatographie d'affinité au nickel : les protéines sont retenues sur la colonne via leur étiquette poly-histidine. Le protocole d'élution a été optimisé afin de bien séparer 2 sous-populations distinctes du récepteur ayant des affinités différentes avec la résine (Figure 29A et Figure 30A). Le premier pic qui est décroché lors du gradient d'imidazole correspond exclusivement à des protéines contaminantes, les bandes révélées sur le gel coloré au bleu de Coomassie n'étant pas immunodétectées sur le Western-Blot (données non présentées). La quantité de protéines contaminantes est

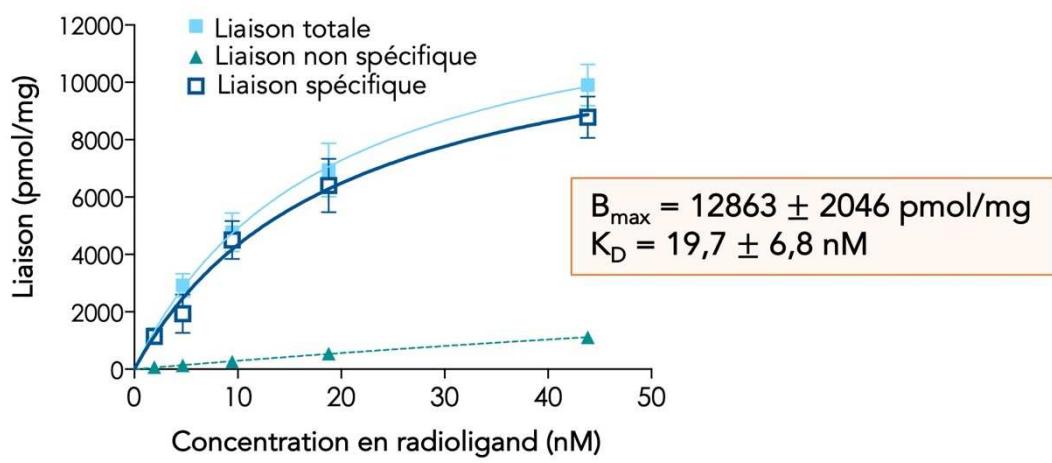


**Figure 30. Purification du récepteur A<sub>2A</sub>\_MP2.** (A) Chromatographe d'élution de la colonne d'affinité au nickel. L'élution s'effectue au moyen un gradient de tampon B (vert) entre 0 et 24 % de tampon B, puis d'un palier à 24 % de tampon B et enfin d'un dernier palier à 100 % de tampon B. Les fractions d'élutions du deuxième pic sont assemblées pour former le pool M. (B) Chromatographe de gel filtration du pool M. Les fractions 22, 23, 24 et 25 sont matérialisées par les flèches. (C) Analyse SDS-PAGE des fractions par coloration au Bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. (D) Western Blot anti-flag. Migration de 5 µL d'échantillon par piste. MW : marqueur de poids moléculaire. La flèche rouge correspond à la forme entière du récepteur, la flèche orange correspond à la forme tronquée du récepteur.

plus ou moins importante selon les lots de préparations de membranes. Le deuxième et le troisième pic contiennent tous les deux la protéine d'intérêt mais dans le dernier pic, celle-ci est majoritairement sous forme agrégée et non fonctionnelle (ne liant que très peu le [<sup>3</sup>H]-ZM241385, données préalablement obtenues au laboratoire). Les fractions du deuxième pic sont poolées et concentrées jusqu'à 500 µL pour la suite de la purification.

La deuxième étape de purification consiste en une étape de polissage sur une colonne de gel filtration (Superdex200 10/300-GL). Pour A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3, cette chromatographie d'exclusion par la taille révèle un pic de faible intensité qui élue à partir du volume mort de la colonne (environ 8 mL) correspondant à des contaminants de plus hauts poids moléculaires ou à des récepteurs sous forme d'oligomères ou d'agrégats puis un deuxième pic largement majoritaire qui élue vers 12 mL (Figure 29B). L'analyse des fractions sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie révèle la présence de deux bandes majoritaires, dans la fraction issue de l'IMAC comme dans les fractions 24 à 26 issues de la gel filtration. On distingue une bande autour de 45 kDa (matérialisée par la flèche rouge) et une bande juste en dessous, aux alentours de 40 kDa (matérialisée par la flèche orange) (Figure 29C). On constate également la présence de deux autres bandes de plus bas poids moléculaire dans les fractions 25 et 26 qui correspondent à des versions dégradées de la protéine.

Pour A<sub>2</sub>A\_MP2, on distingue 3 pics lors de la chromatographie d'exclusion par la taille : un premier de faible intensité à partir du volume mort de la colonne (fractions 17 à 19), un deuxième entre 10 et 11 mL (fraction 22) et le dernier à partir de 11 mL (fractions 23 à 25) (Figure 30B). Dans la fraction 22, on retrouve une bande majoritaire autour de 55 kDa ainsi qu'une bande de très faible intensité vers 40 kDa. Dans la fraction 23, l'intensité des 2 bandes est quasiment identique et enfin dans les fractions 24 et 25, on trouve majoritairement la bande à 40 kDa et des bandes de plus bas poids moléculaire, correspondant à des versions dégradées du récepteur (Figure 30C et D). Une analyse protéomique de ces différentes bandes préalablement réalisée au laboratoire<sup>374</sup> a permis de démontrer que la première bande (à 45 kDa pour A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3 et à 55 kDa pour A<sub>2</sub>A\_MP2) correspond à la version complète de la protéine. La bande à 40 kDa, que l'on retrouve dans les deux purifications, correspond quant à elle à une version tronquée du récepteur du côté C-terminal, après la lysine 422. Le tag de biotinylation de la construction A<sub>2</sub>A\_MP2 est donc clivé pour les protéines tronquées. De plus, il a préalablement été montré au laboratoire, par des tests de fixation de radioligand, que le clivage de la protéine du côté C-terminal n'a



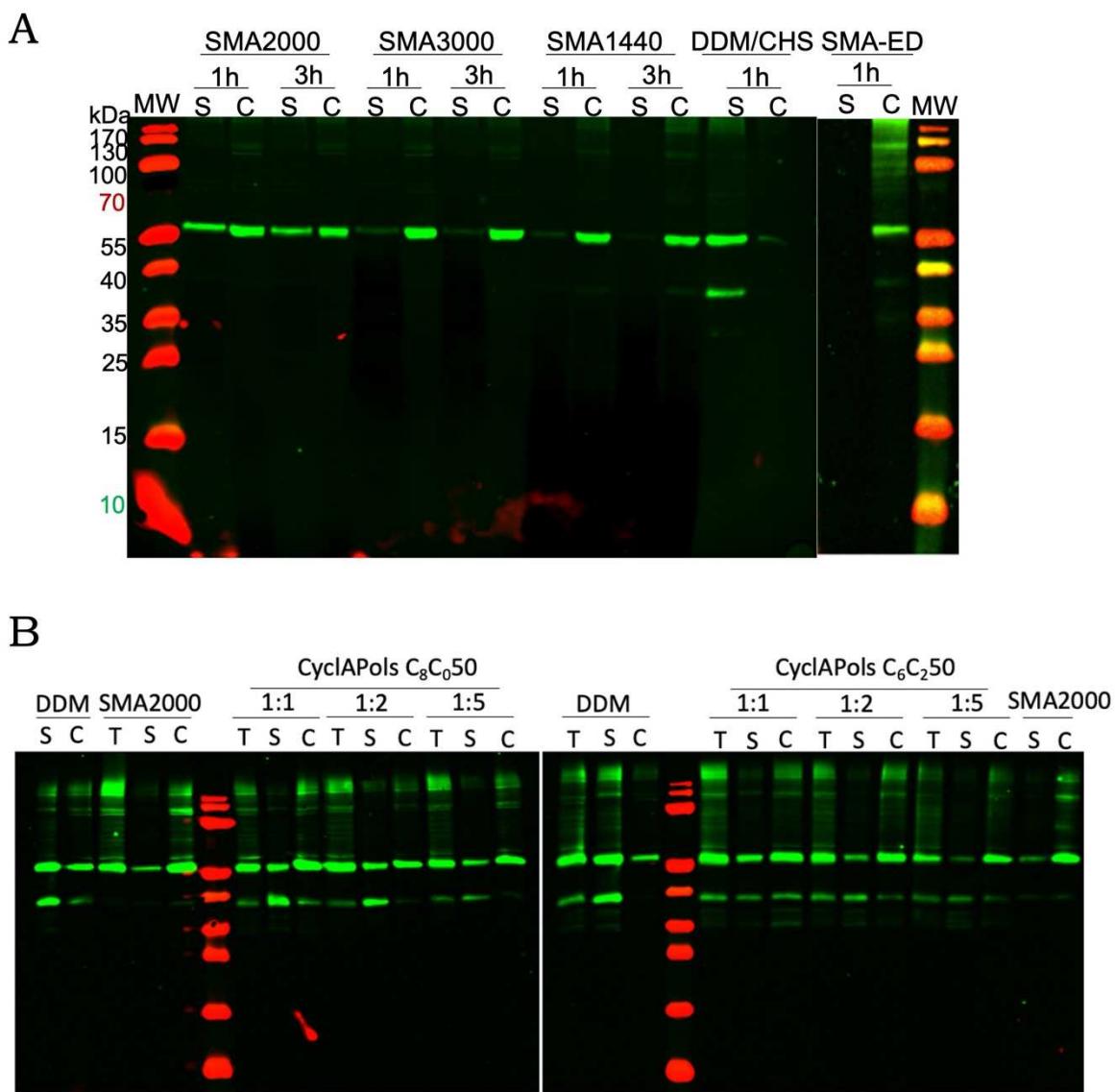
**Figure 31. Courbe de saturation de la protéine A<sub>2</sub>A\_MP2 par le ligand radioactif [<sup>3</sup>H]-ZM241385.** La liaison totale représente la fixation spécifique et non-spécifique du ligand sur l'échantillon. La liaison non-spécifique est mesurée en présence d'un large excès du ligand antagoniste compétiteur CGS15943. Elle permet de déterminer la liaison spécifique du [<sup>3</sup>H]-ZM241385 sur le récepteur A<sub>2</sub>A et d'en calculer les paramètres  $B_{max}$  et  $K_D$ .

pas d'impact sur la fixation de divers ligands, aussi bien des antagonistes que des agonistes.

Le rendement moyen de purification de la protéine A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3 est d'environ 1,5 à 2 mg/mL. Le rendement moyen de purification de la protéine A<sub>2</sub>A\_MP2 est d'environ 0,8 à 1 mg/mL si on prend en compte les fractions 22 et 23 et de 0,5 mg/mL si on prend en compte la forme complète uniquement.

### *1.3.1. Caractérisation de l'activité du récepteur par radiobinding (courbes de saturation)*

La qualité des protéines produites est évaluée au moyen d'un test de fixation de radioligand à l'équilibre, où des concentrations croissantes du composé antagoniste [<sup>3</sup>H]-ZM241385 sont mises en jeu afin d'atteindre une concentration saturante. Il est ainsi possible de déterminer le nombre de sites capables de lier ce ligand ( $B_{max}$ ) ainsi que son affinité ( $K_D$ ). L'affinité mesurée du récepteur purifié en DDM/CHS pour le [<sup>3</sup>H]-ZM241385 est de l'ordre de 20 nM, du même ordre de grandeur que les valeurs publiées dans la littérature<sup>81</sup>. De même, Singh et collègues ont calculé un  $K_D$  de 9 ± 0,2 nM avec une construction protéique proche de la nôtre<sup>375</sup>, ce qui reste dans le même ordre de grandeur que les valeurs que nous obtenons. Le  $B_{max}$  peut atteindre, selon les expériences et les lots de protéines, environ 12 000 pmol/mg (Figure 31). Les valeurs théoriques du  $B_{max}$  que l'on doit obtenir dans le cas où 100 % des récepteurs A<sub>2</sub>A seraient purs et actifs sont d'environ 17 000 pmol/mg pour la forme complète de la protéine et environ 22 000 pmol/mg pour la forme tronquée. Dans les conditions expérimentales utilisées ici, il apparaît donc qu'une large partie du pool de protéines purifiées est capable de lier un ligand. Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3, aussi bien au niveau du  $K_D$  que du  $B_{max}$ .



**Figure 32. Test de solubilisation de A<sub>2</sub>A\_MP2 avec différents polymères.** (A) Solubilisation par des polymères de SMA ou dérivés. 1,8 mg de protéines totales (30 mg de membranes) sont solubilisées par 2,5 % (m/v) de polymères pendant une heure ou trois heures. (B) Solubilisation par des CyclAPols. 2 mg de protéines totales sont solubilisées avec différentes quantités de polymère, soit 2 mg pour le ratio 1:1, 4 mg pour le ratio 1:2 et 10 mg pour le ratio 1:5. Pour contrôle, les protéines sont également solubilisées avec 1% de DDM/CHS et avec 2,5 % de SMA 2000. Anticorps anti-flag. MW : marqueur de poids moléculaire, T : total avant ultracentrifugation, S : surnageant, C : culot

## 1.4. Mise au point d'un protocole de purification à partir de polymères amphiphiles sur le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A

Afin de mettre au point le protocole de purification de la protéine A<sub>2</sub>A, nous avons travaillé dans un premier temps avec la construction thermostabilisée, A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3. Une fois le protocole de purification en partie validé, nous l'avons appliqué à la protéine A<sub>2</sub>A\_MP2. En effet, cette version de la protéine capable de lier à la fois ses ligands agonistes et antagonistes s'avère, à ce stade, plus adaptée à des caractérisations biochimiques et biophysiques plus poussées. De même, le tag biotine présent à l'extrémité C-terminale de la protéine permet d'envisager différentes stratégies d'immobilisation des objets purifiés. Dans un souci de clarté, et parce qu'ils sont très similaires à ceux obtenus avec A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3, seuls les résultats de A<sub>2</sub>A\_MP2 sont présentés ici, sauf mention contraire.

### 1.4.1. Criblage de différents polymères

Nous avons disposé de différents polymères de SMA ou dérivés pour ce projet : le SMA 2000, le SMA 3000, le DIBMA, le XIRAN, le SMA 1440. Par ailleurs, en cours de projet, une équipe de chimistes de NovAliX a synthétisé un SMA avec une fonction amine, le SMA-ED, en suivant la procédure décrite dans la publication de Ravula et collègues<sup>274</sup>.

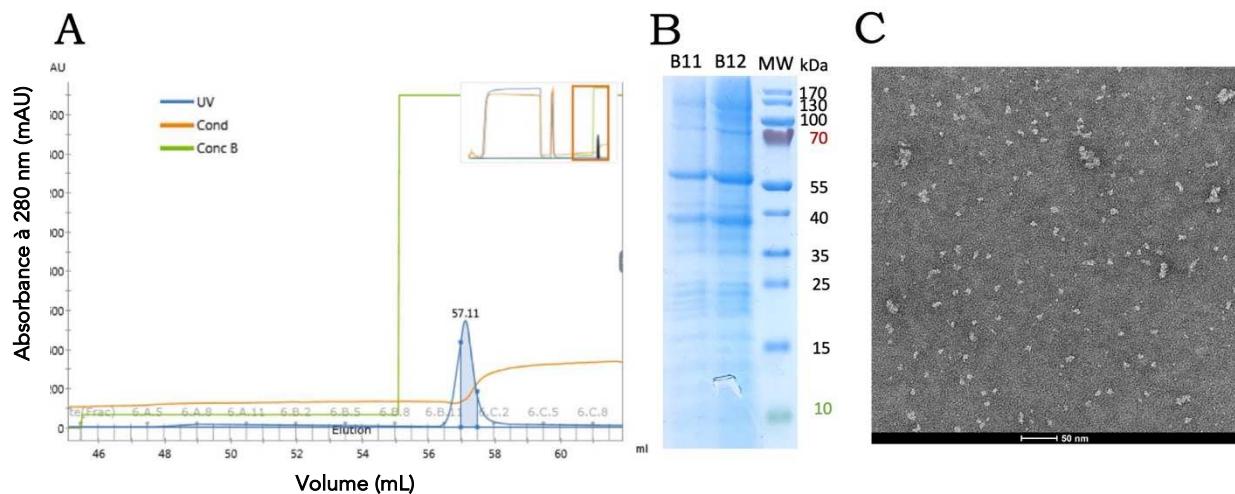
L'efficacité de solubilisation de ces différents polymères a été évaluée sur les deux constructions A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3 et A<sub>2</sub>A\_MP2. Les protocoles décrits dans la littérature<sup>370</sup> se basent sur la solubilisation d'une certaine masse de membranes par une certaine masse de polymères (classiquement 1 g de SMA pour 10 g (poids humide) de membranes). Dans ce test, nous avons mis en jeu 30 mg de membranes et 2,5 % (m/v) de SMA dans un volume final de 1 mL, comme le préconise le protocole. Pour cette quantité de membranes, la quantité de protéines est d'environ 1,8 mg. Les conditions de solubilisation sont donc similaires à celles que l'on effectue lors des criblages en détergent où les protéines sont diluées à une concentration protéique d'environ 2 mg/mL.

Nous avons décidé de tester un temps de solubilisation d'une heure mais certaines études solubilisent les protéines pendant des temps plus longs, c'est pourquoi nous avons également testé un temps de solubilisation de 3h. En parallèle des différents polymères, une condition contrôle de solubilisation avec le mélange DDM/CHS est également réalisée.

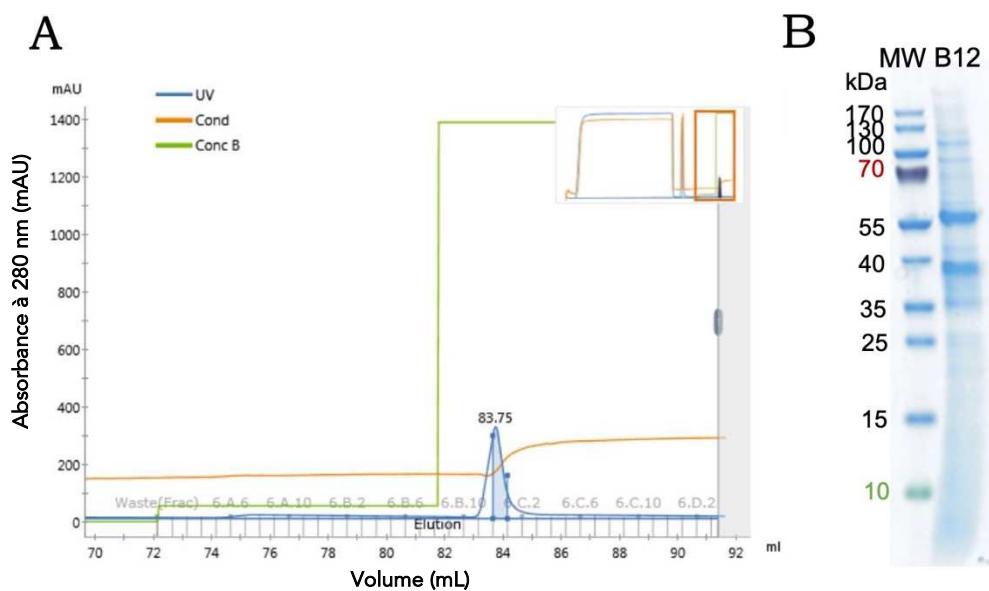


Dans un premier temps, il faut noter qu'il est beaucoup plus difficile de travailler avec le SMA 1440 qu'avec les SMA 2000 et 3000. En effet, ce SMA semble particulièrement sensible aux variations de pH et des précipités se forment lorsqu'il est mis en contact avec les membranes. Dans l'ensemble, nous pouvons constater que l'efficacité de solubilisation de tous les polymères testés est très faible si on compare à l'efficacité du DDM/CHS (Figure 32A). Une faible partie de récepteurs est solubilisée par les SMA 3000 et SMA 1440 (et ce malgré la précipitation du polymère) mais surtout par le SMA 2000. Les polymères XIRAN et DIBMA étaient inefficaces pour solubiliser A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3 (données non présentées), c'est pour cette raison qu'ils n'ont pas été testés sur A<sub>2</sub>A\_MP2. De même, l'augmentation du temps de solubilisation à 3h n'a pas permis d'améliorer les rendements d'extraction. Enfin, le SMA-EQ s'est révélé être très difficile à solubiliser dans un tampon HEPES/NaCl. Il a précipité instantanément lorsqu'il a été ajouté aux membranes et, logiquement, ce SMA s'est montré inefficace pour solubiliser les protéines. Les SMA 2000 et SMA 3000 apparaissent comme étant les plus intéressants pour solubiliser la protéine A<sub>2</sub>A. Ils sont sélectionnés pour les tests de purification.

Enfin, au cours du projet, nous avons également pu tester de nouveaux polymères amphipatiques, nommés CyclAPols. Deux amphipols différents ont pu être testés, le C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50 et le C<sub>8</sub>-C<sub>0</sub>-50 (cf partie « 3.2.6. Les technologies plus récentes » de l'introduction), à différents ratios protéine:polymère (m/m) (Figure 32B). Dans un premier temps, il faut noter que les CyclAPols sont très solubles et se remettent en suspension beaucoup plus facilement que les polymères SMA. De plus, il apparaît que ces 2 amphipols sont capables d'extraire A<sub>2</sub>A des membranes avec une efficacité équivalente. De même, il semblerait que le ratio mettant en jeu le moins de polymères (1:1) soit le plus efficace dans les deux cas. Enfin, l'efficacité de solubilisation des CyclAPols est supérieure à celle obtenue avec le SMA, bien que toutefois inférieure à celle obtenue avec le détergent. Pour les expériences de purification, nous garderons le ratio protéine:polymère de 1:1 car c'est celui qui permet d'utiliser moins de matériel à chaque essai.



**Figure 33. Purification de A<sub>2</sub>A\_MP2 avec le SMA 2000.** (A) Purification IMAC sur une colonne HisTrapHP 1mL. Les protéines sont éluées par un palier à 100 % de tampon B (500 mM). (B) SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie des fractions issues de l'IMAC. (C) Cliché de microscopie électronique par coloration négative de la fraction B12 issue de l'IMAC. MW : marqueur de poids moléculaire.



**Figure 34. Purification de A<sub>2</sub>A\_MP2 avec le SMA 3000.** (A) Purification IMAC sur une colonne HisTrapHP 1mL. Les protéines sont éluées par un palier à 100 % de tampon B (500 mM). (B) SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie de la fraction B12 issue de l'IMAC. MW : marqueur de poids moléculaire.

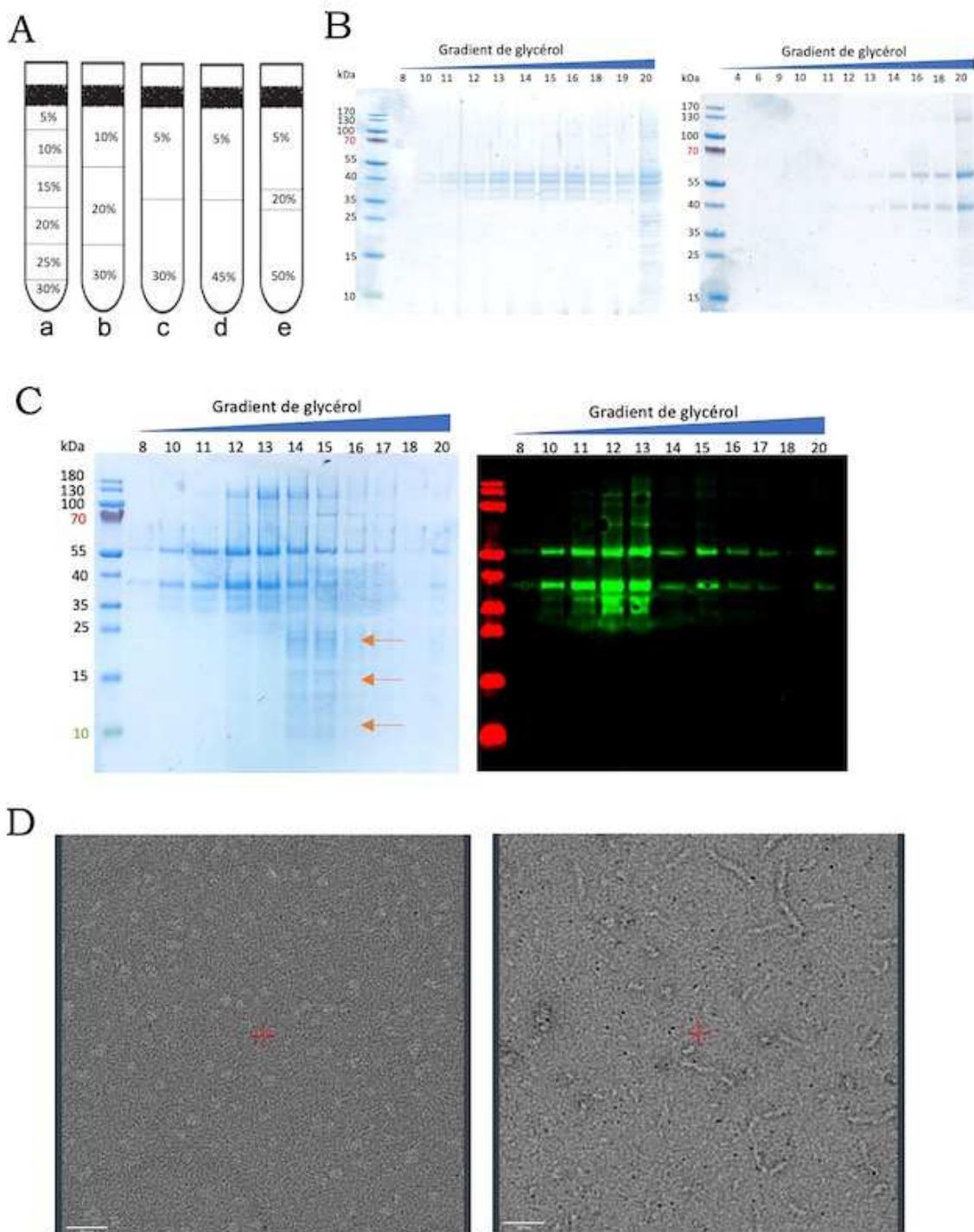
## 1.4.2. Solubilisation et purification en SMA 2000 et SMA 3000

### 1.4.2.1. Solubilisation et IMAC

Comme pour les tests à petite échelle, les membranes sont diluées à une concentration massique d'environ 30 à 40 mg/mL et solubilisées avec 2,5 % de SMA pendant 1h. Après ultracentrifugation, le surnageant est chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité. Le débit de chargement est fixé à 0,5 mL/min pour favoriser l'interaction des protéines avec les ions nickel de la résine. On ne détecte pas de protéines d'intérêt dans le flow-through (données obtenues avec A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3), ce qui indique que cette méthode d'immobilisation est efficace. Une première étape d'élution permet de décrocher quelques contaminants (en quantité plus ou moins importante selon les purifications) puis les protéines sont entièrement éluées de la colonne par 500 mM d'imidazole (Figure 33A pour le SMA 2000 et Figure 34A pour le SMA 3000). D'après le résultat des gels de SDS PAGE, les fractions d'élution contiennent bien le récepteur A<sub>2</sub>A mais aussi de nombreux autres contaminants (Figure 33B et Figure 34B). De même, l'analyse par microscopie électronique à coloration négative montre un certain degré d'hétérogénéité de l'échantillon, avec la présence notamment d'agrégats (Figure 33C). Enfin, des tests de liaison de radioligand réalisés sur A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3 ont montré une faible activité de liaison spécifique (données non présentées). Pour ces raisons, il nous a donc semblé indispensable d'introduire une deuxième étape de purification.

### 1.4.2.2. Optimisation d'une 2<sup>ème</sup> étape de purification

Le schéma classique de purification d'une protéine membranaire inclut une étape de chromatographie d'exclusion par la taille. Toutefois, l'injection sur une colonne Superdex200 10/300 Increase des échantillons de SMALPs-A<sub>2</sub>A purifiés par IMAC s'est traduit par la détérioration de la colonne qui s'est bouchée, la rendant ensuite inutilisable. Nous avons donc décidé d'adopter une stratégie alternative basée sur la séparation des objets selon leur taille par un gradient de glycérol, afin d'éliminer les agrégats visibles sur les images de microscopie électronique. Plusieurs essais avec différentes compositions de gradient ont été testés (Figure 35A). Les expériences ont été réalisées à partir de protéines A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3 dans un premier temps puis A<sub>2</sub>A\_MP2, protéines purifiées avec le SMA 2000.

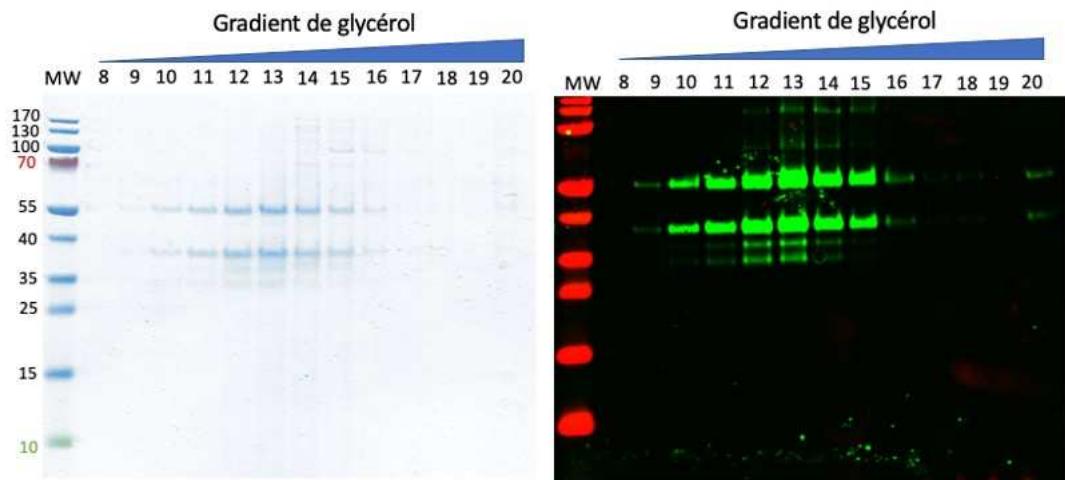


**Figure 35. Mise au point d'un protocole de gradient de glycérol à partir de protéines purifiées en SMA 2000.** (A) Schéma des différents gradients testés. (B) Exemples de gradient n'ayant pas permis une séparation optimale des protéines. SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie. A droite, le résultat du gradient a, obtenu avec A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3, à gauche le gradient b. (C) Résultat du gradient e obtenu à partir d'une purification avec le SMA 2000. A gauche SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie (10 µL par piste), à droite Western-Blot anti-flag (5 µL par piste). (D) Clichés de microscopie électronique à coloration négative obtenus à partir des fractions 12 (gauche) et 14 (droite). L'échelle représente 50 nm.

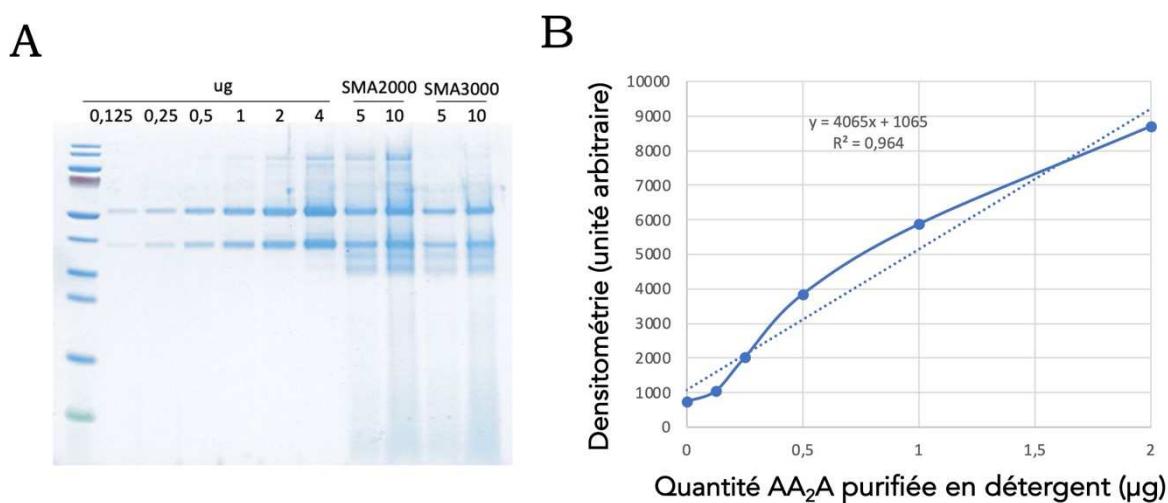
Gradient a : Les protéines ont été déposées sur un gradient discontinu contenant 6 couches de 1,9 mL de solution à 5, 10, 15, 20, 25 et 30 % de glycérol respectivement dans un tube de 14 mL. Des fractions de 1 mL ont été récupérées après l'ultracentrifugation dans un rotor SW41 et déposées sur un gel de SDS PAGE. Toutefois aucune bande n'était visible dans aucune des fractions, témoignant sans doute d'une dilution des protéines trop importante.

Gradient b : Afin de limiter la dilution des protéines, le tube de 14 mL a été remplacé par un tube de 4 mL et chaque couche de glycérol a été réduite à 600 µL. Le tube est ultracentrifugé dans un rotor SW60 et des fractions de 200 µL sont ensuite récupérées par le haut du tube. Les différentes couches de glycérol étant toutefois proches dans leur composition en glycérol, elles ont tendance à se mélanger entre elles, entraînant donc une dilution de l'échantillon que l'on retrouve dans de nombreuses fractions (Figure 35B).

Gradients c, d et e : Afin de concentrer les protéines dans un volume plus restreint, le nombre de couches de gradient a été réduit. Différentes autres stratégies ont été testées : 3 couches de 1,2 mL à 10, 20 et 30 % de glycérol, 2 couches de 1,8 mL à 5 et 30 % de glycérol, 2 couches à 5 et 45 % de glycérol. Les résultats n'ont pas été concluants, comme montré avec le résultat du gradient à 3 couches (Figure 35B), où les protéines sont retrouvées majoritairement dans les dernières fractions. Le gradient offrant le meilleur compromis entre séparation des contaminants et des particules de différentes tailles, le tout sans trop diluer les échantillons, est finalement présenté sur le schéma e (Figure 35A). En effet, on remarque nettement sur le gel de SDS PAGE (Figure 35C) une différence dans le profil de migration entre les fractions 10 à 13 et les fractions suivantes. On peut voir que les fractions 14 et 15 notamment contiennent plus de protéines de bas poids moléculaire que l'on ne retrouve pas dans les fractions 10 à 13 (flèches de couleur rouge), laissant penser que le contenu de ces fractions est plus hétérogène. Cette observation a été confirmée à l'aide d'analyses par microscopie électronique par coloration négative (Figure 35D) où l'on peut observer que la fraction 12 contient des objets de taille assez homogène, pouvant correspondre à la taille attendue de SMALPs-A<sub>2</sub>A, tandis que la fraction 14 semble beaucoup hétérogène.



**Figure 36. Application du protocole de gradient de glycérol à des protéines A<sub>2</sub>A\_MP2 purifiées par le SMA 3000. (A) SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. (B) Western-Blot anti-flag. Migration de 5 µL d'échantillon par piste.**



**Figure 37. Détermination de la concentration des SMALPs purifiées. (A) SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie. La gamme est faite à partir de protéines purifiées en détergent (B) Courbe d'étalonnage de la densitométrie en fonction de la quantité de protéines purifiées en détergent. L'analyse densitométrique est faite sur la somme des 2 bandes (C) Tableau illustrant l'utilisation de cette méthode pour déterminer la concentration des SMALPs.**

Ce protocole a ensuite été testé pour séparer des protéines A<sub>2</sub>A\_MP2 purifiées avec le SMA 3000. Sur le SDS PAGE (Figure 36), on constate que la séparation des particules se fait de façon similaire aux SMALPs 2000. On peut également remarquer que, d'une manière générale, il y a moins de contaminants dans les différentes fractions.

Ce protocole de séparation de gradient de glycérol a donc été validé et appliqué systématiquement lors des purifications des SMALP-A<sub>2</sub>A pour les études d'interaction protéine-ligands. Ces expériences ont été réalisées à partir du pool des fractions 11, 12 et 13 pour les purifications en SMA 2000 et des fractions 12 et 13 pour les purifications en SMA 3000.

#### *1.4.3. Détermination de la concentration des fractions de SMALPs purifiées*

Il est nécessaire de connaître la concentration des protéines purifiées, pour avoir une idée des rendements, mais surtout en vue des expériences de caractérisation des interactions ligands-protéine. Déterminer la concentration de protéines en SMALPs est toutefois plus contraignant que pour les protéines en micelles de détergent. En effet, à cause des groupements styrènes qui les composent, les SMA interfèrent avec le signal d'absorbance à 280 nm. Calculer la concentration en se basant sur une détermination UV au Nanodrop entraînerait donc une surestimation de la concentration protéique. Dans le protocole publié par Lee et collègues, les auteurs décrivent toutefois qu'après les différentes étapes de purification, la majorité des SMA libres sont retirés et que la concentration protéique peut être estimée par une méthode de détection à 280 nm. Comme nous ne pouvons pas estimer la quantité de SMA formant la particule et leur contribution au signal UV, nous avons fait le choix de ne pas utiliser cette méthode pour déterminer la concentration protéique. De même, les SMA interfèrent avec un dosage par la méthode de Bradford. Enfin, il n'est pas possible de faire un dosage BCA à cause de la présence de glycérol dans les échantillons. La concentration protéique est donc déterminée par une analyse densitométrique sur un gel de SDS PAGE contre une gamme étalon de protéines A<sub>2</sub>A purifiées par des détergents et dont la concentration a été précisément déterminée (Figure 37A). Deux volumes différents (typiquement 5 et 10 µL) de protéines purifiées en SMALP sont également déposés sur le même gel. L'intensité des bandes est ensuite analysée par le logiciel ImageJ puis la concentration des SMALPs est déterminée grâce à l'équation obtenue par la courbe d'étalonnage (Figure 37B et C).

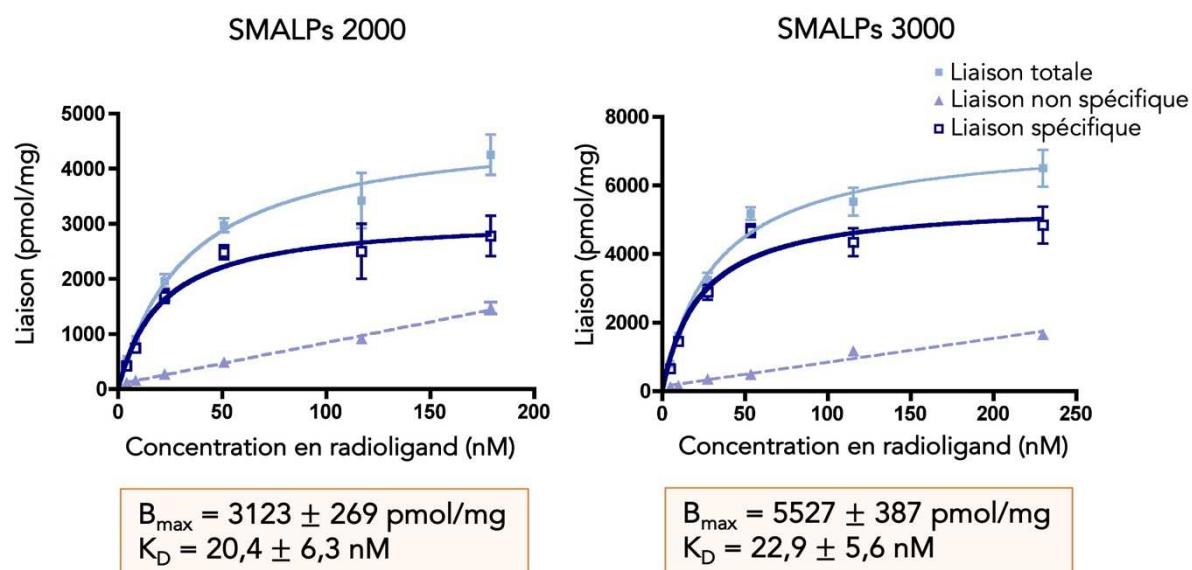


Figure 38. Courbes de saturation du  $[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$  de la protéine A<sub>2A</sub>\_MP2 purifiée en SMALPs 2000 et SMALPs 3000. La liaison non spécifique est mesurée par l'ajout d'un large excès de CGS15943.

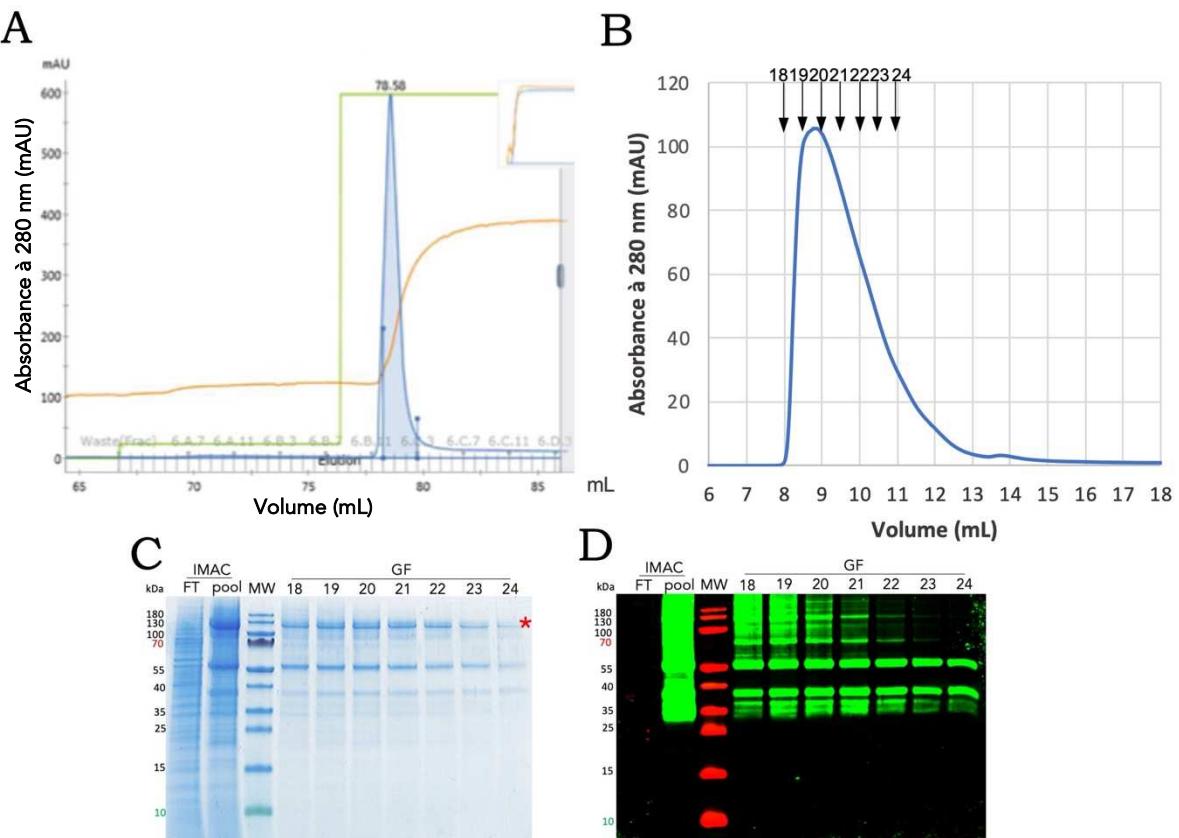
A titre indicatif, les protéines ont également été dosées par une mesure UV à 280 nm et les concentrations obtenues sont le double de celles obtenues par l'analyse sur le gel.

Pour les protéines purifiées avec le SMA 2000, les rendements obtenus sont compris entre 510 et 750  $\mu$ g de protéines par litre de culture avec une moyenne de 620  $\mu$ g/L (n=4). Pour les protéines purifiées avec le SMA 3000, les rendements obtenus sont plus faibles. Ils sont de l'ordre de 150  $\mu$ g par litre de culture (n=3). Ces rendements sont donc plus faibles que ceux que l'on obtient à partir de protéines A<sub>2</sub>A\_MP2 purifiées en DDM/CHS. A titre de comparaison, les quantités de récepteurs reconstitués en nanodisques lipidiques que nous obtenons à partir des mêmes échantillons de départ sont de l'ordre de 400  $\mu$ g (efficacité de reconstitution d'environ 50 % à partir du récepteur purifié en détergent). Ainsi, si on compare les procédures et rendements pour préparer des SMALPs ou préparer des nanodisques, objets comparables sur certains points, il est plus rapide de préparer des SMALPs que des nanodisques et ce avec des rendements plus importants pour le SMA 2000.

#### *1.4.4. Test de saturation par radiobinding*

Avant de réaliser les expériences de caractérisation pharmacologique du récepteur, la qualité des protéines produites est évaluée au moyen d'un test de fixation de radioligand à l'équilibre, où des concentrations croissantes de [<sup>3</sup>H]-ZM241385 sont mises en jeu afin d'atteindre une concentration saturante permettant ainsi de déterminer le nombre de sites capable de lier un ligand ( $B_{max}$ ) ainsi que l'affinité du SMALP-A<sub>2</sub>A pour le ligand ( $K_D$ ).

L'affinité mesurée du récepteur purifié en SMALPs 2000 et 3000 pour le [<sup>3</sup>H]-ZM241385 est généralement comprise entre 20 et 25 nM (n>10), soit des valeurs proches de celles obtenues dans des micelles de détergent et proche de la littérature<sup>81</sup>. Les valeurs de  $B_{max}$  obtenues sont assez variables d'un lot à l'autre de protéines mais aussi lors de réplicats effectués sur le même lot de protéines. Ils varient entre environ 1000 pmol/mg et 5000 pmol/mg. La Figure 38 montre des courbes de saturation classiquement obtenues avec les SMALPs 2000 et SMALPs 3000.

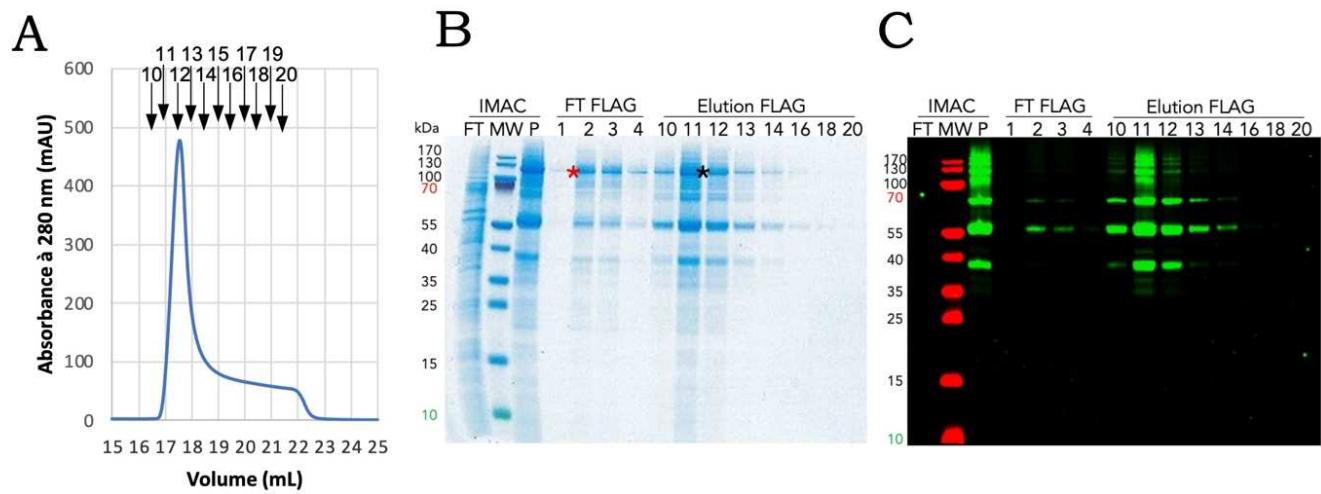


**Figure 39. Purification du récepteur A<sub>2A</sub>\_MP2 par le CyclAPol C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50.** (A) Purification IMAC de A<sub>2A</sub>\_MP2 sur une colonne HisTrapHP 1 mL. (B) Purification par gel filtration sur une colonne Superdex 200 10-300 Increase. (C) SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie des fractions de purification. Migration de 10 µL par piste. L'étoile rouge correspond à une protéine contaminante. (D) Western-Blot anti-flag. Migration de 5 µL par piste. MW : marqueur de poids moléculaire, FT : flow through.

Ces variations peuvent être expliquées de différentes manières. D'une part, il est assez difficile d'évaluer la concentration des SMALPs de manière très précise, or la détermination du  $B_{max}$  est basée sur une quantité exacte de protéines, théoriquement 100 ng, mise en jeu dans chaque puits, donc si la concentration est sur ou sous-estimée, la valeur de  $B_{max}$  calculée l'est également. De même, il existe une variabilité intrinsèque au format des expériences de liaison de radioligand. En effet, le protocole expérimental inclut la précipitation des échantillons testés par l'ajout de PEG et de  $\gamma$ -globuline avant leur filtration. On ne peut donc pas exclure un déplacement de l'équilibre réactionnel et il est également probable qu'une partie des particules contenant les récepteurs ne soit pas retenue sur le filtre. Enfin, cet essai a été mis au point au laboratoire pour des protéines purifiées en détergent. Il est possible que ces conditions expérimentales ne soient pas optimales pour des protéines en SMALPs. Par exemple, le tampon classique de liaison de A<sub>2</sub>A contient 10 mM de Mg<sup>2+</sup>, or cette concentration n'est pas compatible avec les SMA qui précipitent en présence d'ions divalents. Ainsi, les valeurs de  $B_{max}$  obtenues ne sont pas des valeurs absolues et sont probablement sous-évaluées. Elles sont difficilement comparables aux valeurs que l'on peut obtenir à partir de protéines purifiées en détergent, mais donnent des indications quant au nombre minimum de protéines capables de lier un ligand.

#### 1.4.5. Solubilisation et purification par le CyclAPol C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50

La protéine A<sub>2</sub>A\_MP2 a également été extraite et purifiée par le CyclAPol C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50. Les préparations membranaires sont diluées à une concentration protéique d'environ 2 mg/mL et solubilisées avec 2 mg/mL de CyclAPols pendant 1 h (soit un ratio protéine:polymère de 1:1). Après ultracentrifugation, le surnageant est chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité. Le protocole de purification et d'élution appliqué est le même que celui mis en œuvre pour les SMA. Les protéines sont éluées de la colonne (Figure 39A) dans un volume de 1 mL. D'après le résultat des gels de SDS PAGE, les fractions d'élution contiennent bien le récepteur A<sub>2</sub>A mais aussi d'autres contaminants (Figure 39C et D). Les protéines ont donc ensuite été purifiées en parallèle sur une colonne de gel filtration (500  $\mu$ L) (Figure 39B). Le tampon de course de la gel filtration ne contient pas de détergent. Dans un premier temps, on constate que la protéine est éluée de la colonne de gel filtration dans le volume mort (fraction 18) de la colonne, ce qui suggère que les objets purifiés sont d'une taille importante. Le pic s'étale ensuite jusqu'à la fraction 24, ce qui suggère que



**Figure 40. Purification anti-flag du récepteur A<sub>2A</sub>\_MP2 par le CyclAPol C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50.** (A) Chromatographie de purification anti-flag. (B) SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie des fractions de purification. Migration de 10 µL par piste. Les étoiles rouges et noires correspondent à une protéine contaminante. (C) Western-Blot anti-flag. Migration de 5 µL par piste. MW : marqueur de poids moléculaire, FT : flow through.

l'échantillon contient des particules de tailles assez hétérogènes. De plus, sur le SDS PAGE (Figure 39C et D), il apparaît que toutes ces fractions ne sont pas pures, avec notamment la présence d'une bande vers 130 kDa, matérialisée par une étoile rouge, qui semble être un contaminant. En effet, cette bande qui est bien visible dans toutes les fractions, y compris dans les fractions 23 et 24 n'est pas révélée sur le Western-Blot pour ces 2 fractions. Il est plus difficile de conclure pour les autres fractions, étant donné les nombreuses bandes révélées par le Western Blot, à des poids proches de 130 kDa, qui correspondent probablement à des formes oligomériques de A<sub>2</sub>A résistantes au SDS. Au laboratoire, nous retrouvons un contaminant migrant à 130 kDa lors de la purification de nombreuses autres protéines membranaires produites à partir de la levure *P. pastoris*. Dans le cadre d'un autre projet, cette bande a été identifiée par des analyses protéomiques comme étant PMA1, une pompe à proton de la levure. Il faudrait toutefois faire une analyse des bandes de cette purification afin d'identifier formellement ce contaminant.

Une deuxième stratégie de purification a donc été envisagée afin d'essayer d'éliminer ce contaminant. Celle-ci est basée sur une première étape de chromatographie d'affinité aux ions métal suivie d'une chromatographie d'affinité anti-flag. Le profil de la chromatographie anti-flag est présenté sur la Figure 40A. Sur le SDS PAGE et le Western-Blot (Figure 40B), on peut voir que si la protéine contaminante est en partie éliminée dans le flow through (étoile rouge), elle est toutefois encore présente dans les fractions d'élution (étoile noire).

Il apparaît donc que le CyclAPol C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50 permet d'extraire A<sub>2</sub>A des membranes de levures mais une protéine contaminante est co-purifiée avec A<sub>2</sub>A, et ce malgré les différentes stratégies de purification testées. Ce contaminant n'est pas retrouvé lorsque A<sub>2</sub>A est purifiée avec des détergents ou avec les polymères SMA. Au vu du manque de pureté de la protéine, les expériences de caractérisation n'ont pas été poussées plus loin pour ce complexe CyclAPol-A<sub>2</sub>A.

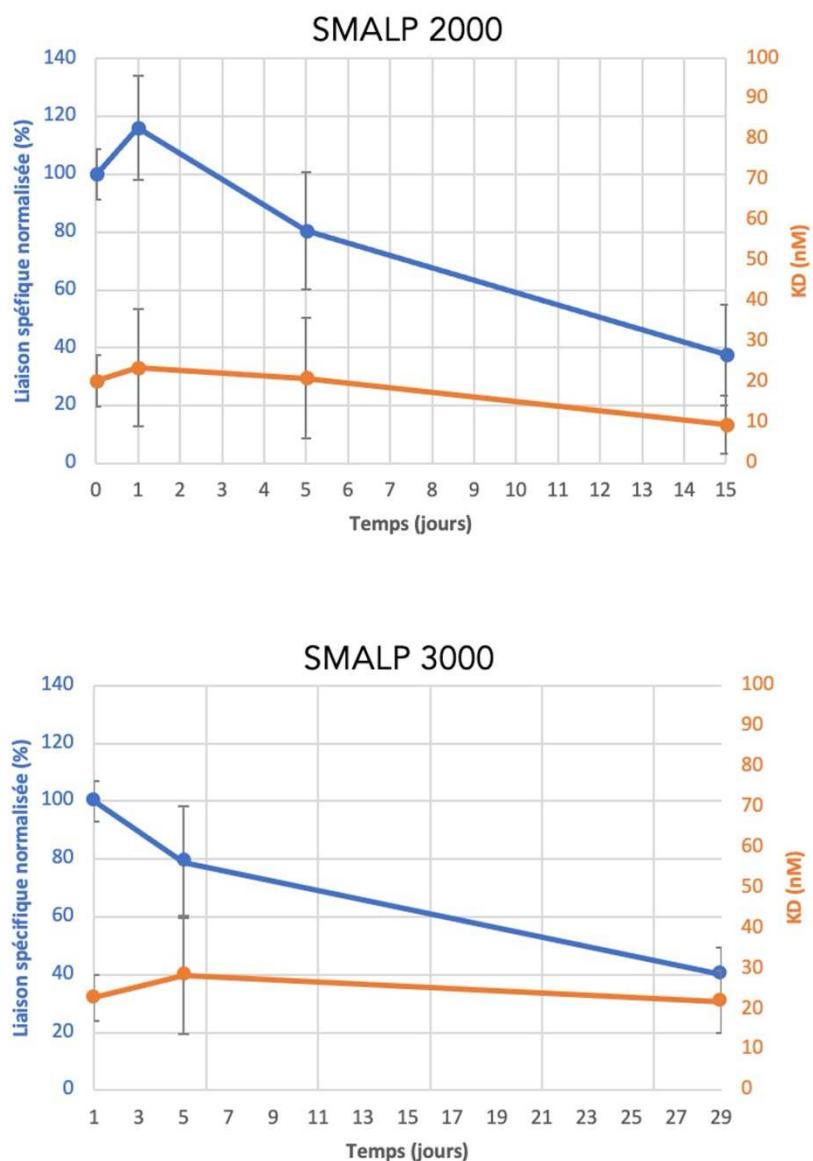


Figure 41. Étude de la stabilité du récepteur A<sub>2A</sub> purifié en SMALPs 2000 ou en SMALPs 3000. La liaison spécifique a été déterminée par des courbes de saturation du [<sup>3</sup>H]-ZM241385. La valeur B<sub>max</sub> a été normalisée à 100 % au premier jour de l'expérience.

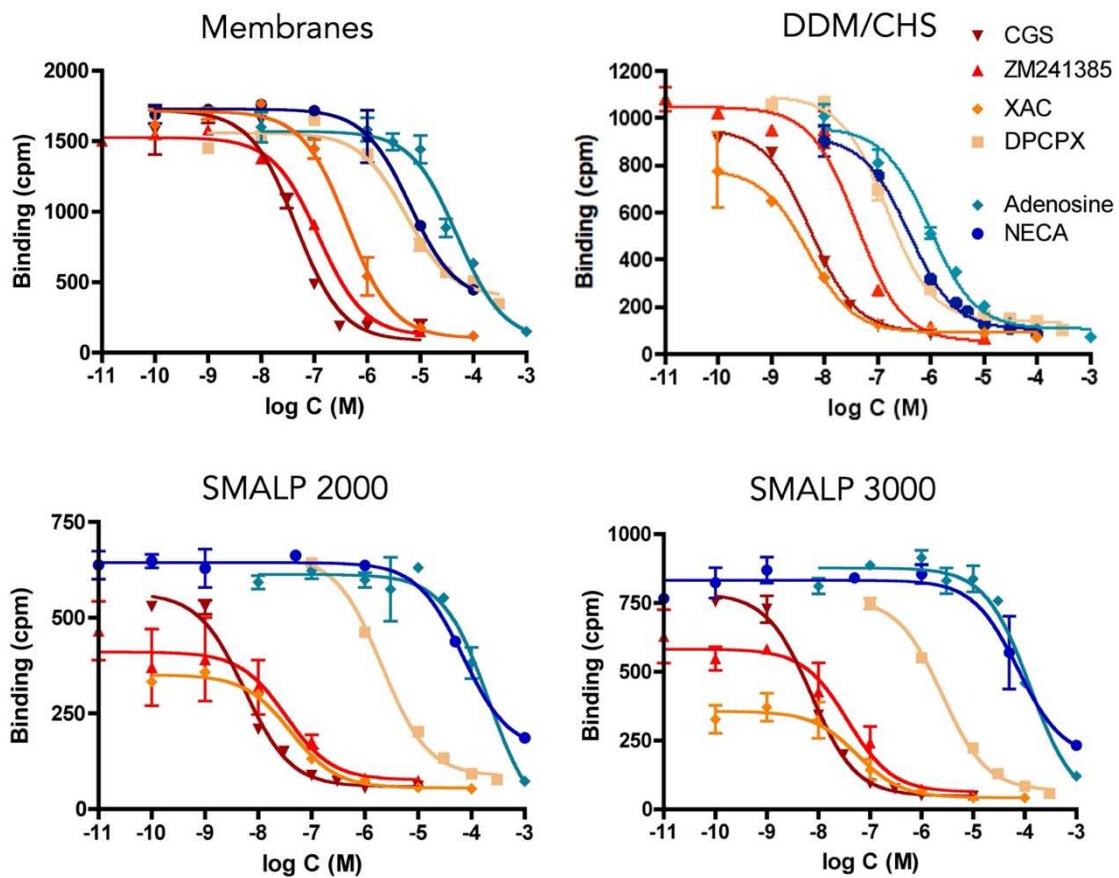
## 1.5. Caractérisation fonctionnelle des SMALPs-A<sub>2</sub>A

Les SMALPs-A<sub>2</sub>A ont été caractérisées de plusieurs façons. Tout d'abord, leur stabilité a été évaluée selon leur capacité à lier le [<sup>3</sup>H]-ZM241385. Ensuite, une caractérisation pharmacologique des récepteurs a été réalisée en déterminant les constantes d'inhibition (Ki) de différents ligands. Enfin, l'affinité de ces mêmes ligands a été mesurée par SPR.

### 1.5.1. Étude de la stabilité de la liaison dans le temps

Une fois purifiées par chromatographie d'affinité et sur le gradient de glycérol, les SMALPs sont congelées rapidement dans l'azote liquide et stockées à -80 °C. Leur stabilité est évaluée par des tests de saturation par radiobinding à différents jours après la purification, selon le même principe que décrit plus haut. Quand cela est possible, une mesure est réalisée le jour même de la purification (J0) sur un échantillon frais, non congelé. Ensuite toutes les autres mesures sont réalisées sur des aliquots ayant été flash congelés à J0 et stockés à -80 °C. Un aliquot différent est décongelé pour chaque nouvelle mesure. La valeur de  $B_{max}$  obtenue le premier jour de l'essai est normalisée à 100 %. Les résultats sont présentés dans la Figure 41.

Si l'affinité pour le ligand ne varie pas, il apparaît que le nombre de protéines purifiées en SMA 2000 capables de fixer le [<sup>3</sup>H]-ZM241385 ne cesse de diminuer au cours du temps. Cela semble donc indiquer que l'échantillon se détériore au cours du temps, avec une dénaturation et/ou l'agrégation des protéines. Ces résultats ont été confirmés lors d'un second essai effectué pendant 30 jours sur un autre lot de SMALPs purifiées. Au bout de 30 jours, la liaison spécifique s'élevait à environ 35 % de la liaison initiale. Les résultats obtenus pour les SMALPs 3000 sont similaires. Si l'affinité du ligand pour le récepteur ne varie pas au cours du temps, les valeurs de  $B_{max}$  ont tendance à diminuer. Au bout d'un mois, on observe une diminution de 60 % de la liaison spécifique (Figure 41).



**Figure 42. Caractérisation pharmacologique du récepteur A<sub>2A</sub>\_MP2 par des tests de compétition.** Courbes de compétition entre 10 nM de [<sup>3</sup>H]-ZM241385 et des concentrations croissantes de différents ligands froids. Différents systèmes membranaires ou mimétique de membranes sont évalués.

Ligand	Membranes	DDM/CHS	SMALP 2000	SMALP 3000	Nanodisque	Littérature
XAC	270 nM	2,7 nM	25,3 nM	35,4 nM	500 nM	1 nM
ZM241385	76,9 nM	22 nM	20,8 nM	23,3 nM	48 nM	80 nM
CGS	28,9 nM	3,0 nM	3,5 nM	4,6 nM	27 nM	4,2 nM
DPCPX	3400 nM	83 nM	1300 nM	1600 nM	/	129 nM
NECA	4,0 μM	0,22 μM	43,5 μM	46,2 μM	/	20 nM*
Adénosine	31,5 μM	0,53 μM	133 μM	79,3 μM	1,4 μM	0,18 μM

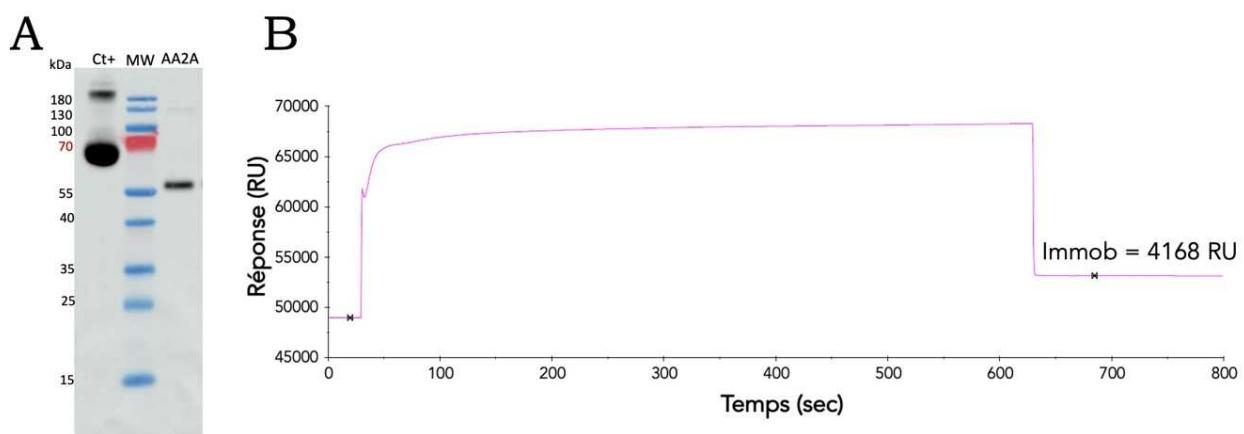
**Tableau 10. Constantes d'inhibition (Ki) de différents ligands sur la protéine A<sub>2A</sub>.** Les valeurs pour les membranes, les protéines purifiées en DDM/CHS et en SMALPs 2000 et 3000 ont été obtenues sur la construction d'A<sub>2A</sub>\_MP2 et les valeurs des nanodisques sur A<sub>2A</sub>\_MP3. Les valeurs de la littérature sont issues de Fredholm et collègues<sup>349</sup>. \*valeur obtenue par une courbe de saturation.

### 1.5.2. Caractérisation pharmacologique par des tests de compétition

Une caractérisation pharmacologique des SMALPs purifiées est réalisée en déterminant l'affinité de plusieurs ligands par des tests de compétition. Cet essai est basé sur la mise en jeu d'une concentration fixe du radioligand antagoniste [<sup>3</sup>H]-ZM241385 déplacé par des concentrations croissantes de ligands non radiomarqués (Figure 42). Six ligands non radiomarqués sont testés, quatre antagonistes (XAC, CGS15943, ZM241385 et DPCPX) en nuances de rouge sur le graphique, et deux agonistes (adénosine et NECA) en nuances de bleu. Ces expériences sont réalisées en parallèle sur des membranes de levures exprimant la protéine A<sub>2A</sub>\_MP2 et sur des protéines purifiées en micelles de détergents afin de comparer les valeurs obtenues. Les constantes d'inhibition (K<sub>i</sub>) déterminées par ces expériences et reflétant l'affinité de la protéine pour ces ligands, sont présentées dans le Tableau 10. Lorsque la protéine est purifiée en SMA, on constate que l'affinité du XAC et du DPCPX est diminuée d'un facteur d'environ 10 et 15 respectivement en comparaison avec les protéines purifiées en détergent. De même, la diminution de l'affinité est encore plus marquée pour les deux agonistes, d'un facteur d'environ 200. Des courbes de compétition avaient préalablement été obtenues au laboratoire sur la protéine A<sub>2A</sub>\_MP3 reconstituée en nanodisques et on remarque que les affinités des ligands antagonistes sont légèrement meilleures dans les SMALPs que dans les nanodisques. Pour l'adénosine (le NECA n'ayant pas été testé sur des nanodisques), l'affinité est meilleure dans les nanodisques d'un facteur 95 par rapport au SMALPs 2000 et d'un facteur 55 par rapport au SMALPs 3000. Ces expériences sont toutefois à reproduire, de préférence sur le construct A<sub>2A</sub>\_MP2.

Il semble donc que l'affinité des ligands est plus faible dans les SMALPs que dans les autres systèmes mimétiques de membranes testés et cela en particulier pour les agonistes. L'affinité des ligands agonistes est également plus faible en SMA que dans les membranes de levures.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de liaison de ligands par SPR sur les SMALPs purifiées.



**Figure 43. Immobilisation de la protéine A<sub>2</sub>A\_MP2 purifiée en SMALP 2000 sur une puce de SPR.** (A) Membrane de Western-Blot révélée en présence d'Extravidin-HRP. Ct+ : 3 µg BSA-biot (Thermo), MW : marqueur de poids moléculaire. (B) Sensorgramme de l'immobilisation de la protéine. Immob : niveau d'immobilisation. RU : relative unit

### 1.5.3. Étude par résonance plasmonique de surface

#### 1.5.3.1. Capture du récepteur sur une puce SPR

La stratégie mise en œuvre consiste à immobiliser le récepteur A<sub>2</sub>A\_MP2 par le groupement biotine du côté C-ter sur une puce de SPR couverte de streptavidine. Sachant que le site de fixation des ligands est localisé sur la face du récepteur opposée à celle de l'extrémité C-terminale, on peut penser que ce type d'immobilisation permet d'orienter les récepteurs de façon à favoriser l'accessibilité du site. Préalablement à ces expériences, la biotinylation effective du récepteur A<sub>2</sub>A\_MP2 a été vérifiée par Western-Blot révélé en présence d'un réactif se liant à la biotine. Cette analyse confirme que seule la forme complète de la protéine est biotinylée (Figure 43A), qui est donc la seule forme de la protéine immobilisée sur la puce de SPR.

La protéine purifiée en SMALP 2000 et en SMALP 3000 a été immobilisée avec succès sur la puce jusqu'à un niveau d'environ 4 000 RU. La Figure 43B montre le sensorgramme de l'immobilisation des SMALPs 2000-A<sub>2</sub>A (niveau d'immobilisation = 4168 RU). Des résultats similaires ont été obtenus avec les SMALPs 3000-A<sub>2</sub>A (niveau d'immobilisation = 3989 RU). Dans le cas d'une interaction de stoechiométrie 1:1, il est habituellement possible de calculer le signal maximum d'interaction ( $R_{max}$ ) en tenant compte du niveau d'immobilisation et des masses moléculaires des ligands injectés et du récepteur immobilisé. En revanche, si nous connaissons la masse de la protéine seule (58 kDa), nous ne connaissons pas la contribution des polymères et des éventuels lipides pour déterminer la masse exacte de la particule. Nous ne pouvons donc pas calculer avec certitude la réponse maximale attendue dans le cas où 100 % des protéines seraient capables de fixer un ligand.

#### 1.5.3.2. Étude cinétique en multi-cycles de l'interaction de ligands

Nous avons ensuite étudié l'interaction des SMALPs 2000 et des SMALPs 3000 avec le ZM241385, le XAC, le CGS15943, le DPCPX, l'adénosine et le NECA. Pour cela, nous avons réalisé une étude cinétique en multi-cycles (*multi-kinetics cycles*). Les courbes obtenues pour chaque ligand sur les SMALPs 2000 sont montrées dans la Figure 44 (les résultats obtenus avec les SMALPs 3000 sont très similaires). On peut observer une liaison sur le récepteur pour les composés antagonistes XAC, ZM241385 et CGS15943. Les niveaux de réponses sont assez bas, ce qui était attendu compte

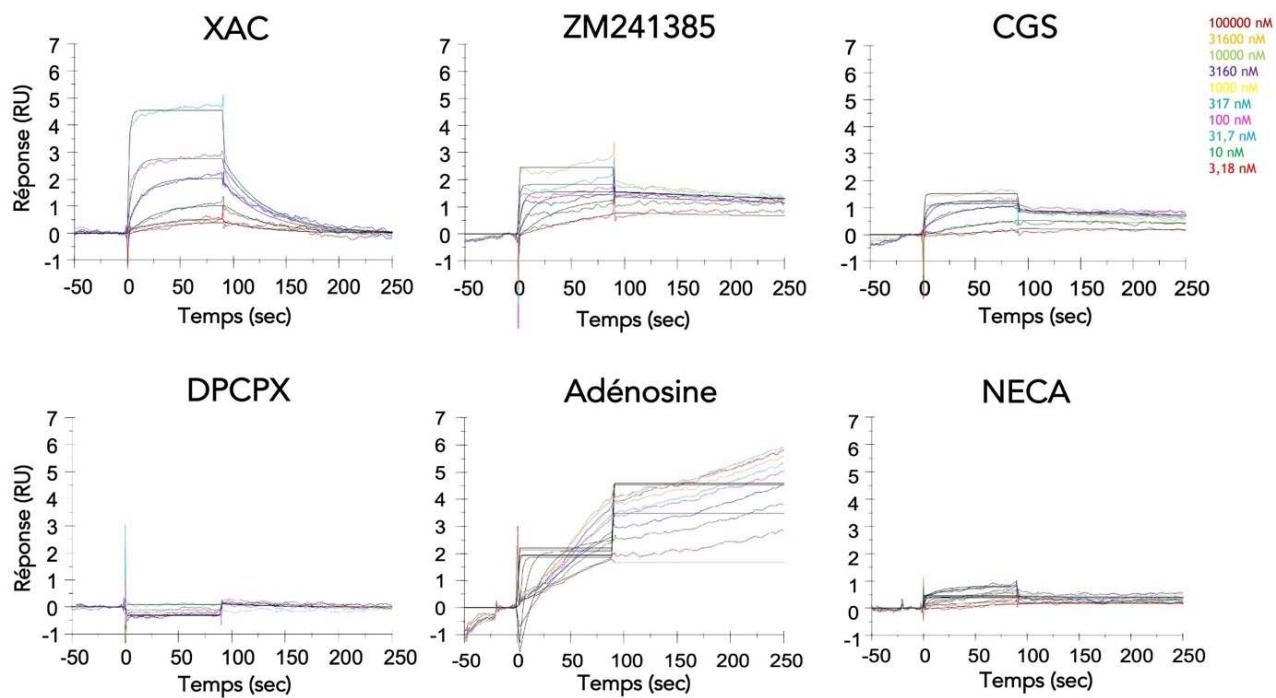


Figure 44. Sensogrammes de l'étude cinétique de l'interaction de différents ligands avec le récepteur A<sub>2A</sub> purifié en SMA 2000.

	$K_D$ (nM)	
	SMALP 2000	SMALP 3000
XAC	51,9	42,9
ZM241385	1,3	4,2
CGS	4,2	8,0
DPCPX	NA	NA
Adénosine	NA	NA
NECA	NA	NA

Tableau 11. Valeurs des constantes de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) obtenues par SPR sur les SMALPs purifiés. NA : non applicable

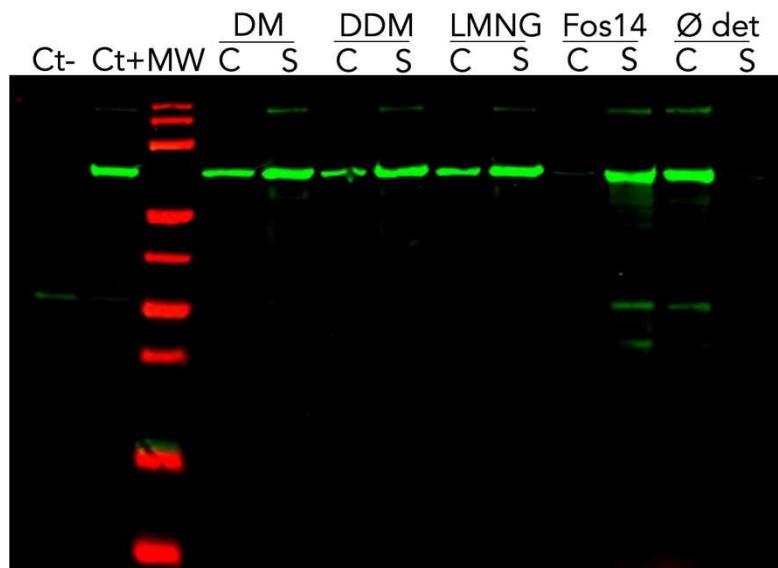
tenu des masses faibles de ces molécules, mais on observe une liaison dose-dépendante. En faisant correspondre des courbes théoriques de liaison (en noir), le logiciel a pu déterminer les constantes de l'interaction pour ces ligands. Ces expériences ont été répétées sur les SMALPs 3000-A<sub>2</sub>A, montrant des résultats très similaires en termes de niveau des réponses obtenues et de K<sub>D</sub> mesurés (Tableau 11). Les niveaux de réponse (en RU) et les constantes de ces composés pour la protéine sont du même ordre de grandeur que celles que nous avions précédemment obtenues au laboratoire sur des nanodisques de A<sub>2</sub>A\_MP3 (*données non publiées*). De même, dans leur étude réalisée sur la protéine A<sub>2</sub>A\_Rant21 reconstituée en nanodisques, Bocquet et collègues ont déterminé un K<sub>D</sub> de 0,14 ± 0,16 nM pour le ZM241385 et de 9,9 ± 2,13 nM pour le XAC lorsque la protéine est immobilisée sur une puce<sup>216</sup>. Ainsi, les valeurs de K<sub>D</sub> que nous obtenons sur les SMALPs-A<sub>2</sub>A\_MP2 sont similaires à celles de la littérature.

Aucune liaison n'est significativement détectée pour le DPCPX, ce qui est cohérent avec la valeur d'affinité faible obtenue par les courbes de compétition. De même, le format expérimental utilisé ne permet de détecter aucune liaison pour aucun des deux ligands agonistes, l'adénosine et le NECA, en SMALP 2000 comme en SMALP 3000.

Il apparaît donc que les ligands antagonistes (à l'exception du DPCPX) sont capables de lier le récepteur avec des affinités similaires à celles précédemment obtenues sur des nanodisques. De même, les valeurs d'affinités obtenues par SPR sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par radiobinding. Toutefois, la liaison des agonistes sur les SMALPs n'a pas été mesurée par SPR.



**Figure 45.** Représentation du construct recombinant de la protéine TRPV4 exprimée dans la levure *Pichia pastoris*. L'étoile rouge symbolise la mutation N647Q. 10 : étiquette décahistidine.



**Figure 46.** Test de solubilisation de TRPV4 par différents détergents. 2 mg de protéines totales sont solubilisées par 1 % (v/v) de détergent pendant 30 minutes. Migration de 10 µL d'échantillon par puits. Anticorps anti-his. MW : marqueur de poids moléculaire, C : culot, S : surnageant, Ø det : absence de détergent, Ct- : levure SMD1163 non transformée, Ct+ : échantillon membranaire initial.

## 2. Études structurales du canal TRPV4 purifié par des polymères amphiphiles

Si le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A est une protéine modèle très fréquemment utilisée au laboratoire depuis plusieurs années, il n'en est pas de même pour le canal TRPV4 pour lequel nous n'avions aucune expérience préalable au laboratoire.

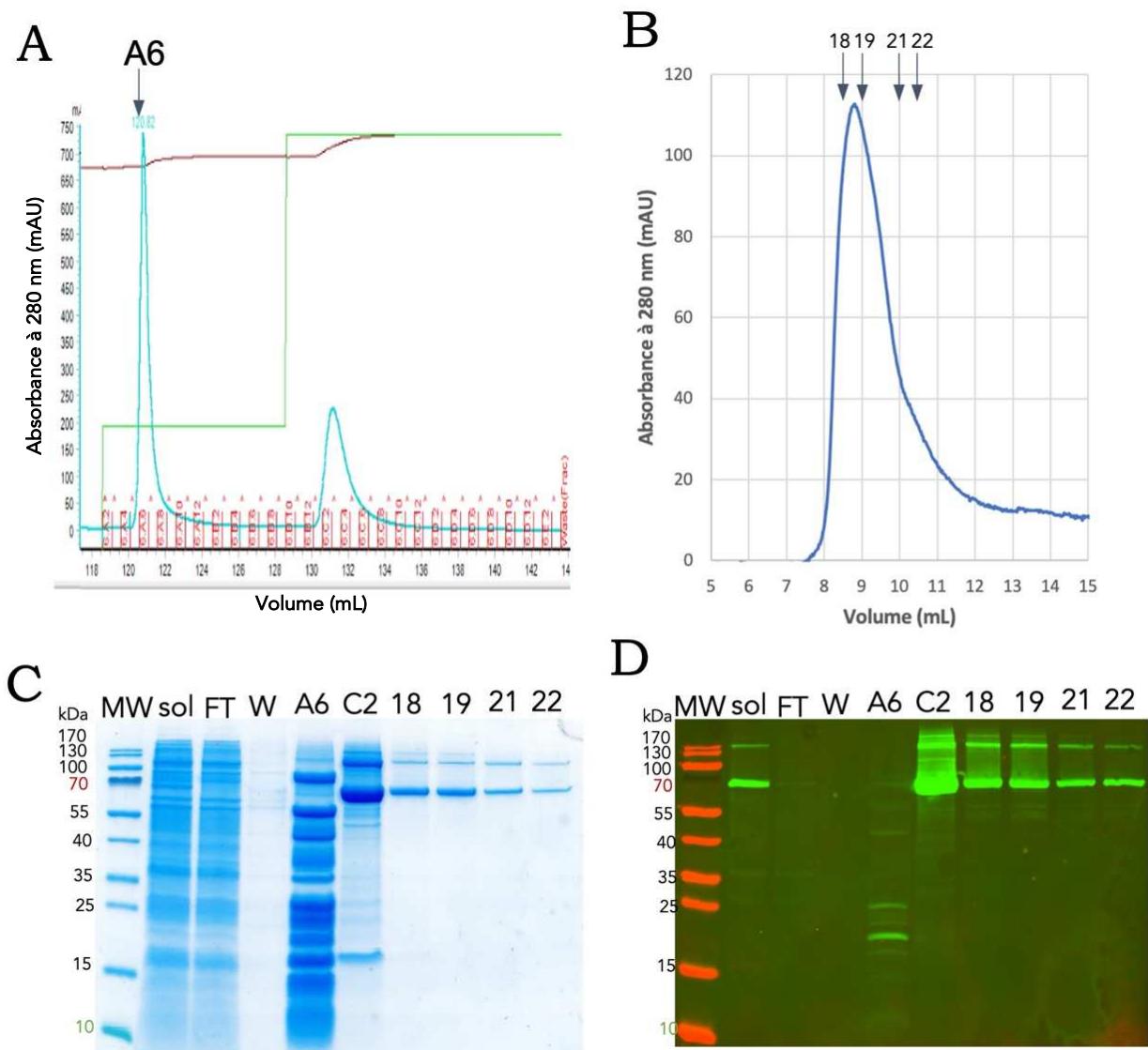
### 2.1. Constructions recombinantes du récepteur et clonage dans la levure

Nous disposons d'une unique construction recombinante du canal TRPV4, obtenue au laboratoire juste avant le début de ce projet de thèse. Il s'agit de la séquence du TRPV4 de *Xenopus tropicalis* incluant les résidus 144 à 797 et en remplaçant l'arginine en position 647 par une glutamine, telle qu'elle a été décrite dans la publication de Deng et collègues<sup>333</sup>. Cette construction contient du côté C-ter une étiquette décahistidine permettant sa purification par chromatographie d'affinité et sa détection par Western-Blot (Figure 45), en revanche nous n'avons pas intégré de tag GFP à la différence du construct décrit dans cette publication.

Comme pour les protéines A<sub>2</sub>A, cette construction est introduite dans un vecteur pPIC9K, sous le contrôle du promoteur P<sub>AOX1</sub>. Après que le vecteur ait été intégré dans le génome de la levure, deux clones, exprimant le canal à des niveaux satisfaisants, ont été sélectionnés et stockés à -80°C en milieu glycérolé.

### 2.2. Production et préparations membranaires de levures

La production de TRPV4 se fait de manière très similaire à celle des protéines A<sub>2</sub>A, avec une phase de culture à 30 °C puis une induction de la production de la protéine d'intérêt à 22 °C pendant 18 h. Ces productions permettent de récolter environ 28 g de cellules (poids humide du culot) par litre de culture, générant en moyenne 500 mg de préparations membranaires (quantité de protéines totales dosées par BCA) resuspendues dans 50 mL de tampon (soit une concentration d'environ 10 mg/mL).



**Figure 47. Purification du canal TRPV4 en DDM.** (A) Chromatographie d'élution de la colonne d'affinité au nickel. L'élution s'effectue au moyen d'un palier à 30 % de tampon B (vert) puis un palier à 100 % de tampon B. (B) Chromatogramme de gel filtration de la fraction C2. Les fractions 18, 19, 21 et 22 sont matérialisées par les flèches. (C) Analyse SDS-PAGE des fractions par coloration au Bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. (D) Western Blot anti-his. Migration de 5 µL d'échantillon par piste. MW : marqueur de poids moléculaire. Sol : solubilisât après l'ultracentrifugation, FT : flow through, W : wash.

## 2.3. Purification en détergent

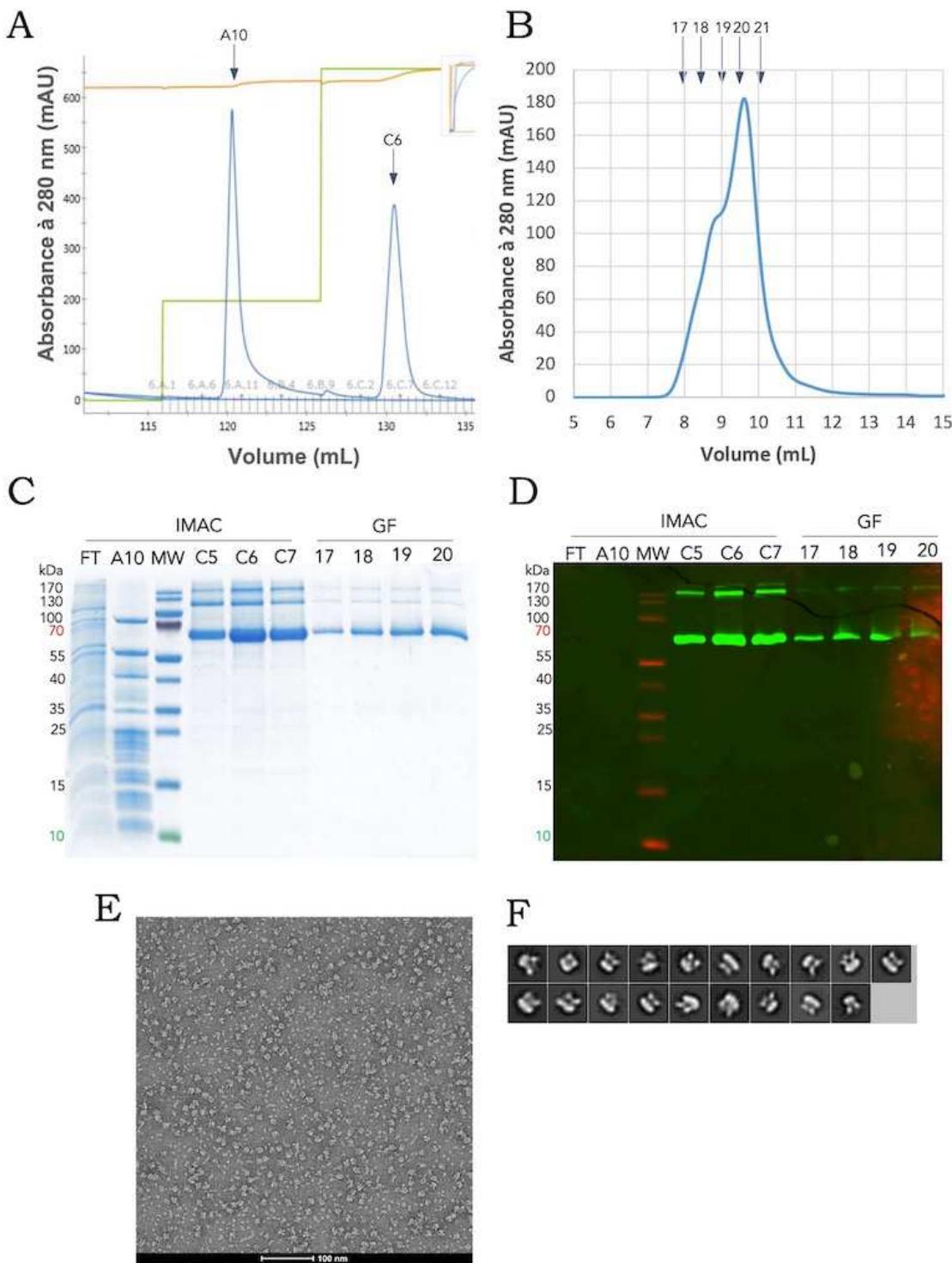
### 2.3.1. Criblage de détergents

Une première étape avant la purification a consisté à effectuer un criblage d'un petit nombre de détergents (DM, DDM, LMNG et foscholine 14) pour identifier ceux permettant la meilleure extraction de TRPV4 à partir des membranes de levure. Les membranes sont solubilisées dans 1 mL à une concentration de 2 mg/mL par 1 % de détergent pendant 30 minutes. La solution est ultracentrifugée à 100 000 g pour séparer le culot et le surnageant contenant les protéines solubilisées. Les différentes fractions ont été analysées sur un gel de SDS PAGE transféré sur une membrane de nitrocellulose, puis exposées à un anticorps anti-His (Figure 46). Le DM, le DDM et le LMNG sont efficaces d'une manière similaire pour extraire TRPV4 des membranes de levures. Si la Foscholine-14 semble plus efficace pour solubiliser TRPV4, ce détergent s'est déjà avéré trop dénaturant pour les protéines. Comme nous ne disposons pas de test d'activité pour cette protéine, nous avons préféré écarter ce détergent.

### 2.3.2. Solubilisation et purification en détergent

De nombreux essais de purification ont été réalisés afin d'en optimiser les conditions et d'obtenir un échantillon homogène analysable par microscopie électronique. Seuls les résultats les plus significatifs sont présentés ici.

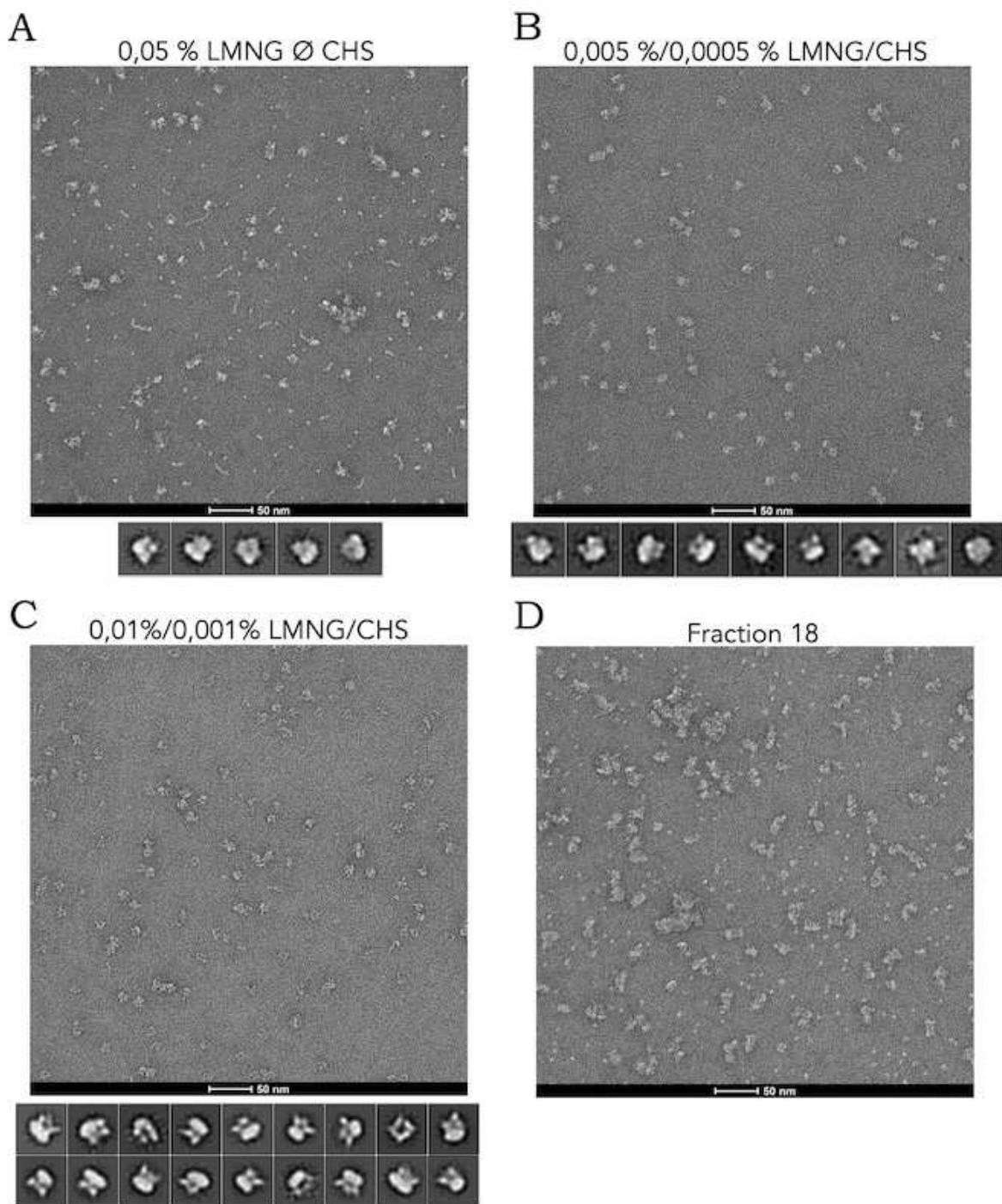
À la suite des résultats obtenus par le criblage et parce que ce détergent a déjà fait ses preuves dans une précédente étude<sup>333</sup>, nous avons choisi d'extraire et purifier TRPV4 en présence de DDM. Après quelques essais préliminaires pour optimiser l'élution lors de l'IMAC, nous avons obtenu les résultats présentés dans la Figure 47. Lors de l'IMAC (Figure 47A), un premier palier à 30 % de tampon B (150 mM d'imidazole) permet de décrocher de nombreux contaminants (fraction A6, Figure 47A, C et D). Puis la protéine est élueée lors d'un palier à 500 mM d'imidazole. Le canal TRPV4 est bien visible sur gel de SDS PAGE à la taille attendue de 70 kDa, les protéines de plus haut poids moléculaire observées (Coomassie et Western-Blot) correspondant très probablement à des dimères ou des tétramères de TRPV4 ayant résisté à l'action du SDS (Figure 47C et D). La fraction C2 de l'IMAC est purifiée par gel filtration (Figure 47B). On constate toutefois que les protéines sont élues majoritairement dans le volume mort de la colonne (fractions 18/19), ce qui suggère



**Figure 48. Purification du canal TRPV4 en LMNG/CHS.** (A) Chromatogramme d'élution de la colonne d'affinité au nickel. L'élution s'effectue au moyen d'un palier à 30 % de tampon B (vert) puis un palier à 100 % de tampon B. (B) Chromatogramme de gel filtration de la fraction C2. Les fractions 18, 19, 21 et 22 sont matérialisées par les flèches. (C) Analyse SDS-PAGE des fractions par coloration au Bleu de Coomassie. Migration de 10 µL d'échantillon par piste. (D) Western Blot anti-his. Migration de 5 µL d'échantillon par piste. (E) Cliché de microscopie électronique par coloration négative. (F) Classes 2D. MW : marqueur de poids moléculaire. Sol : solubilisât après l'ultracentrifugation, FT : flow through.

la présence de formes oligomériques ou agrégées du canal, mais très peu sous forme fonctionnelle tétramérique.

D'autres tests, réalisés en présence de LMNG associé au CHS s'inspirant de conditions de purification d'autres canaux<sup>110</sup>, se sont montrés plus concluants. Les protéines ont ainsi été extraites en présence de LMNG/CHS (0,5% / 0,05%) maintenus dans tous les tampons de purification à raison de 0,05 %/0,005%. Le profil d'IMAC obtenu est identique à celui que l'on obtient lors de la purification en DDM, avec un premier pic contenant exclusivement des contaminants et un second pic contenant les canaux TRPV4 (Figure 48A). La chromatographie d'exclusion par la taille montre que ce mélange de détergent permet de séparer les protéines dans la gamme de résolution de la colonne. En effet, alors qu'elles étaient éluées autour de 8-9 mL en DDM, en LMNG/CHS on observe un premier pic de protéines non résolu à partir de 8 mL, puis un pic entre 9 et 10 mL qui peut correspondre à une protéine tétramérique d'environ 280 kDa (Figure 48B). Les profils de migration sur le gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 48C) et le Western-Blot (Figure 48D) sont similaires à ceux obtenus lors de la purification en DDM, avec une bande majoritaire à 70 kDa, une bande au-dessus du marqueur de 170 kDa qui pourrait correspondre à une forme trimérique ou tétramérique de TRPV4 non dénaturée par le SDS. On observe également une bande de plus faible intensité vers 130 kDa qui n'est pas révélée sur Western-Blot et qui correspond à une protéine contaminante. Comme nous l'avons mentionné pour la purification de A<sub>2</sub>A\_MP2 avec le CyclAPols C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50, nous pensons que ce contaminant pourrait être la protéine PMA1 de *Pichia pastoris*. Au vu de sa faible proportion par rapport à la bande majoritaire de TRPV4, ce contaminant ne devrait pas trop interférer avec les études structurales envisagées. La fraction 20 issue de la gel filtration a été analysée par microscope électronique à coloration négative (Figure 48E). On constate que l'échantillon est relativement hétérogène, avec des particules de taille et de forme qui correspondent au canal tétramérique (comme le montrent les classes 2D obtenues sur la Figure 48F) mais aussi de plus gros agrégats et des particules de plus petites tailles, qui peuvent correspondre à des monomères ou des dimères de protéines. Toutefois, lorsque ces échantillons ont été analysés par cryo-EM, les classes obtenues ne s'alignaient pas bien, avec un rapport signal sur bruit ne permettant pas d'obtenir une structure 3D (données non présentées).

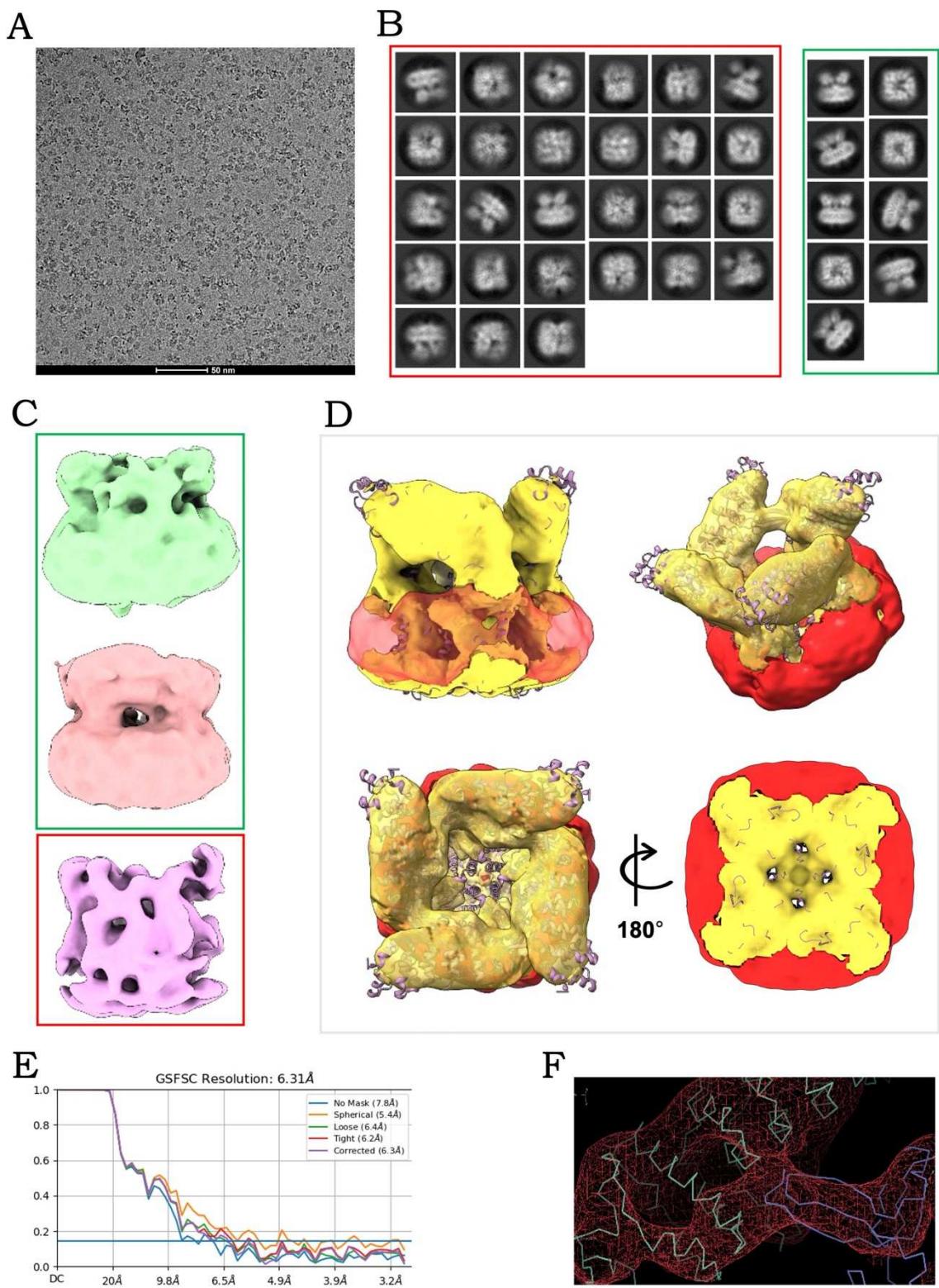


**Figure 49. Clichés de microscopie électronique à coloration négative obtenus selon différentes conditions de purification.** Les tampons de purification contiennent (A) 0,05% LMNG sans CHS, (B) 0,005%/0,0005% de LMNG/CHS ou (C) 0,01%/0,001% de LMNG/CHS. (D) Fraction 18 issue de la GF. Sous les clichés, sont montrées les classes 2D sélectionnées.

Ces conditions expérimentales ont été utilisées pour réaliser différents essais d'analyse par spectrométrie de masse native, en collaboration avec l'équipe de Sarah Cianférani (LSMBO, Strasbourg). Ces essais n'ont toutefois pas permis de détecter le canal, le LMNG interférant avec l'analyse (*données non présentées*). Si des stratégies d'échange de détergents pendant la purification ont été testées pour remplacer la micelle de LMNG par du DDM, ces stratégies n'ont pas non plus permis d'obtenir des résultats probants car la multiplication des étapes de purification a trop dilué la protéine, rendant impossible les analyses par spectrométrie de masse native. De même, il est assez difficile de contrôler l'échange du détergent, surtout si l'on prend en compte que le LMNG a une CMC assez basse (0,001 %) et qu'il est donc assez difficile de l'échanger complètement.

Plusieurs optimisations dans la composition des tampons et la préparation des échantillons ont été réalisées afin d'améliorer l'homogénéité des échantillons observés par microscopie électronique à coloration négative. Ces modifications ont inclus des variations dans la concentration en détergents, l'effet de l'absence de CHS, l'effet de la congélation de la protéine, la stabilisation du tétramère par des approches de crosslinking des sous-unités ou par l'ajout d'un ligand antagoniste pendant l'extraction et la purification, l'ajout d'une étape de séparation sur un gradient de glycérol inverse à un gradient de LMNG permettant d'éliminer les micelles de LMNG vides tout en stabilisant la protéine (stratégie GraDeR<sup>376</sup>). Toutes ces conditions ont été évaluées par microscopie électronique en coloration négative pour lesquelles des classes 2D ont été acquises. Quelques exemples sont présentés sur la Figure 49. On peut par exemple voir que l'absence de CHS conduit à une forte hétérogénéité de l'échantillon et que sa présence semble donc importante pour purifier TRPV4 (Figure 49A). Par ailleurs, le fait de diminuer le LMNG d'un facteur 10 réduit le nombre de classes 2D analysables (Figure 49B). La réduction de la concentration en LMNG/CHS à 0,01%/0,001% semblait prometteuse (Figure 49C), avec un nombre de classes analysables similaires au résultat précédent (Figure 48F), mais cette condition n'a pas donné de résultats probants en cryo-EM, du fait d'une haute flexibilité et instabilité des particules (*données non présentées*). La fraction 18, quant à elle, correspond bien à des agrégats (Figure 49D).

Les meilleurs résultats en microscopie électronique (décrits dans le paragraphe suivant) ont été obtenus en purifiant TRPV4 avec un mélange de LMNG/CHS à



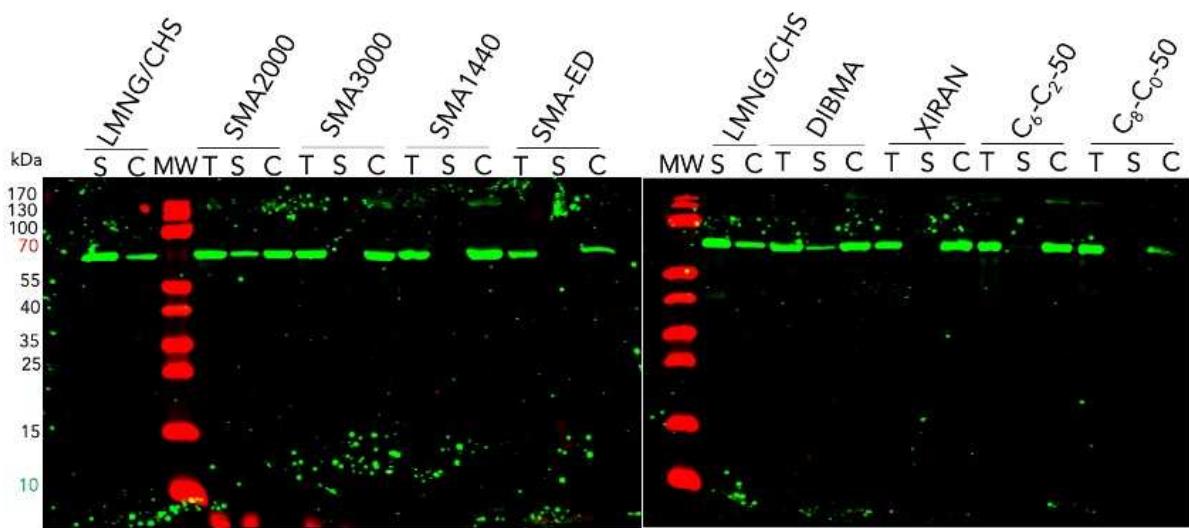
**Figure 50. Cryo-microscopie électronique sur le canal TRPV4 purifié en détergent.** (A) Micrographe de cryo-EM. (B) Classes 2D. En rouge les classes non retenus pour la reconstruction 3D et en vert les classes sélectionnées. (C) Classes 3D. En vert, les classes servant à la reconstruction finale, en rouge les classes écartées. (D) Différentes orientations du volume 3D final. (E) Courbes de corrélation de Fourier. (F) Interaction entre deux domaines ankyrines.

0,05%/0,005% et en présence de lipides (POPC:POPG à un ratio de 3:2) et d'un ligand antagoniste (le GSK2193874 à 1  $\mu$ M) dans les tampons de purification. Les profils de purification obtenus avec ces conditions sont identiques à ceux montrés sur la Figure 48A et B.

### 2.3.3. Caractérisation structurale par microscopie électronique

La fraction 21 de la purification en présence de lipides et de ligand a été analysée par cryo-EM (Figure 50). Le micrographe présenté sur la Figure 50A montre que l'échantillon est assez homogène et présente une concentration et un contraste de bonne qualité. 4000 micrographes ont été traités pour obtenir 820 000 particules classées en différentes classes 2D (Figure 50B) dont certaines ont été écartées (encadrées en rouge) (Figure 50C). Une petite partie de ces classes (encadrées en vert) a servi à obtenir des classes 3D (86 000 particules). Au final, 62 000 particules, soit moins de 10 % du nombre initial de particules, ont servi à obtenir la structure 3D présentée (Figure 50D). Les courbes de corrélation de Fourier (FSC) montrent un niveau de résolution proche de 6,3  $\text{\AA}$  (Figure 50E). Le *B*-factor obtenu par le plot de Guinier<sup>377</sup> est plutôt élevé, 388,8, ce qui traduit un haut dynamisme du complexe, et ce qui explique pourquoi la résolution n'est pas meilleure. Si le niveau de résolution n'est pas aussi haut qu'espéré, la structure obtenue permet toutefois d'observer certains détails et notamment l'interaction entre deux domaines ankyrines (Figure 50F), ce qui confirme bien que le canal est structuré.

Si la structure obtenue est d'une résolution qui pourrait être améliorée, elle constitue toutefois un bon point de départ pour les études structurales envisagées en purifiant le canal par des polymères.



**Figure 51. Test de solubilisation du canal TRPV4 avec différents polymères.** 2 mg de protéines totales (environ 40 mg de membranes) sont solubilisées par 2,5 % (m/v) de polymères SMA et dérivés, 2 mg de CyclAPols ou 0,5%/0,05% de LMNG/CHS pendant une heure. Anticorps anti-his. MW : marqueur de poids moléculaire, T : total avant ultracentrifugation, S : surnageant, C : culot

## 2.4. Purification en polymères amphiphiles

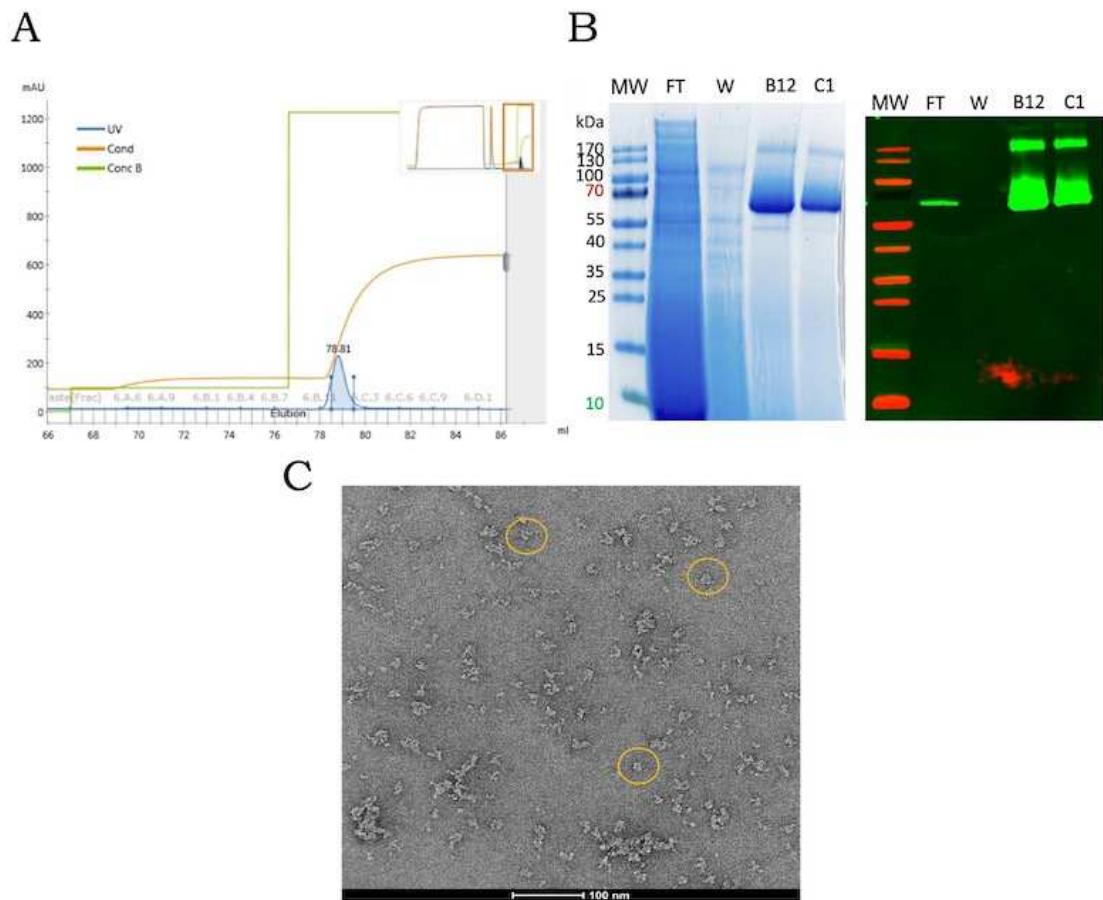
### 2.4.1. Criblage de polymères

Tout comme pour le récepteur A<sub>2</sub>A, nous avons testé différents polymères pour extraire TRPV4 des membranes de levures, des polymères de SMA et dérivés et les CyclAPols. Les polymères testés incluent le SMA 2000, le SMA 3000, le DIBMA, le XIRAN, le SMA 1440, le SMA-ED, le C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50 et le C<sub>8</sub>-C<sub>0</sub>-50 (Figure 51). Les protéines ont été solubilisées pendant 1 h avec 2,5 % (m/v) de SMA et dérivés ou 2 mg de CyclAPols (ratio protéine:polymère de 1:1), dans un format de test mettant en jeu 2 mg de protéines totales. En parallèle des différents polymères, une condition contrôle de solubilisation avec du LMNG/CHS a également été réalisée.

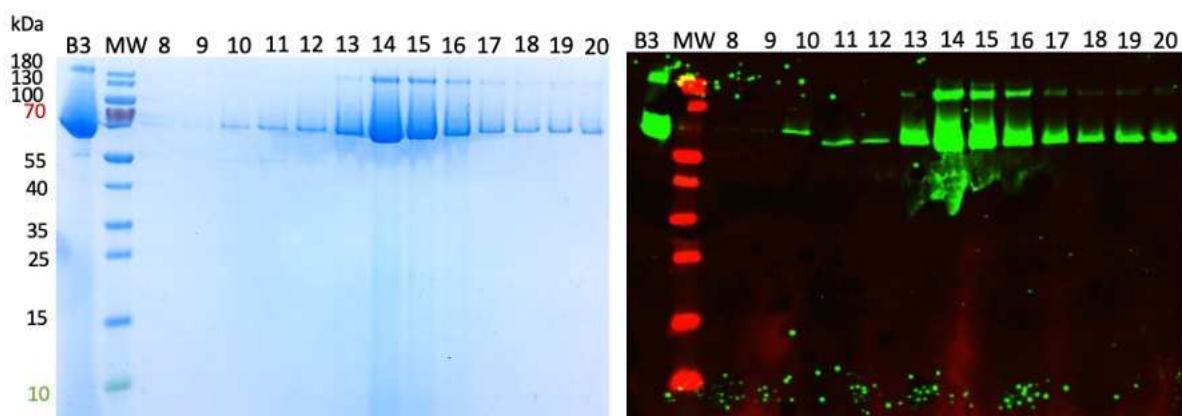
Dans l'ensemble, nous pouvons constater que l'efficacité de solubilisation de tous les polymères testés est plus faible que celle du LMNG/CHS. Le SMA 2000 semble le polymère le plus efficace pour extraire le canal des membranes. Le polymère DIBMA semble également capable d'extraire une faible proportion de protéines. Ce résultat nécessite toutefois d'être confirmé car d'autres tests de solubilisation ont montré un résultat opposé. Les autres SMA testés semblent inefficaces. Enfin, contrairement aux résultats obtenus avec la protéine A<sub>2</sub>A, les deux CyclAPols sont également inefficaces pour solubiliser le canal dans les conditions testées. Ainsi, seul le SMA 2000 a été utilisé dans les essais de purification du canal.

### 2.4.2. Purification par le SMA 2000

Les membranes sont d'abord diluées à une concentration massique d'environ 40 mg/mL et les protéines sont solubilisées avec 2,5 % de SMA 2000 pendant 1h. Après ultracentrifugation, le surnageant est chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité. Malgré un débit de chargement diminué à 0,5 mL/min, une partie non négligeable de l'échantillon n'interagit pas avec la résine et est retrouvée dans le flow-through. Les protéines sont entièrement éluées de la colonne par 500 mM d'imidazole (Figure 52A). D'après le résultat des gels de SDS PAGE colorés au bleu de Coomassie et révélés par Western-Blot, les fractions d'élution contiennent bien la protéine TRPV4, à un niveau de pureté relativement élevé (Figure 52B). Toutefois, il faut noter que la bande correspondant à TRPV4 a un aspect « smeareux » que l'on n'observe pas lors de purification en détergent, suggérant ainsi que des objets de tailles plus ou moins homogènes ne sont pas complètement



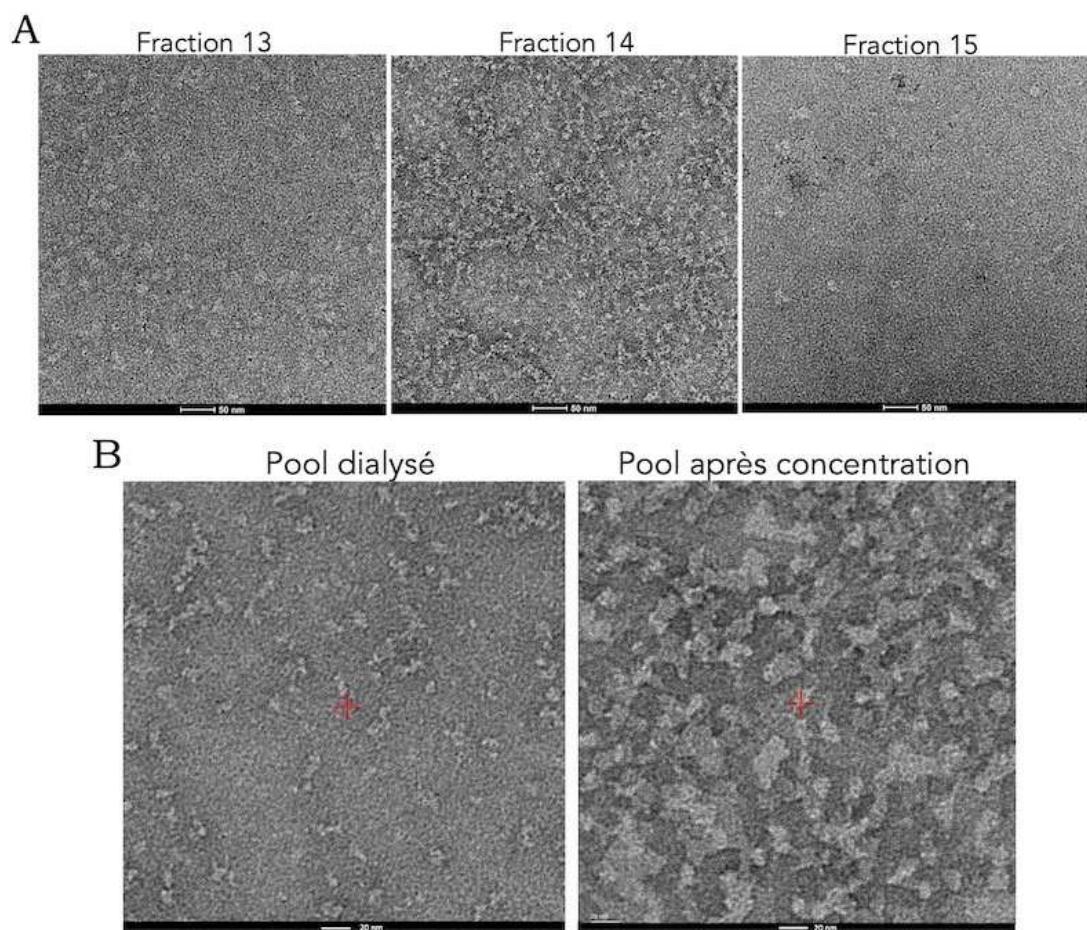
**Figure 52. Purification du canal TRPV4 par le SMA 2000 par IMAC.** (A) Chromatographie de l'IMAC. (B) SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie et Western-Blot anti-his associés à la purification. FT : flow through, W : lavage de la colonne avec du tampon A, MW : marqueur de poids moléculaire. (C) Cliché de microscopie électronique à coloration négative de la fraction B12. En jaune, les particules caractéristiques de TRPV4.



**Figure 53. Purification du canal TRPV4 sur un gradient de glycérol.** Les différentes fractions issues du gradient (8 à 20) sont déposées sur un gel de SDS PAGE coloré au Bleu de Coomassie ou analysé par Western Blot (anti-his). B3 : fraction issue de l'IMAC, MW : marqueur de poids moléculaire.

dénaturés par le SDS. Enfin, l'analyse par microscopie électronique à coloration négative montre que l'échantillon est très hétérogène, avec la présence notamment de nombreux gros agrégats (Figure 52C). Les échantillons ne sont pas exploitables en tant que tels par des approches de microscopie électronique. De ce fait, une deuxième étape de purification sur un gradient de glycérol est indispensable pour améliorer l'homogénéité de l'échantillon.

L'optimisation du gradient réalisée pour A<sub>2</sub>A a été appliquée à TRPV4. Les particules ont donc été séparées sur un gradient discontinu d'environ 4 mL contenant trois couches différentes de glycérol, la première à 5 %, une seconde à 20 % pour concentrer les particules et une dernière à 50 % de glycérol. Après ultracentrifugation, des fractions de 200 µL ont été récupérées par le haut du gradient et leur contenu a été analysé sur un gel SDS PAGE (Figure 53). Il n'y a pas de différence marquée dans le profil de migration des différentes fractions, contrairement à la protéine A<sub>2</sub>A dont les fractions 14 et 15 contenait de nettes bandes de protéines contaminantes. Ainsi plusieurs de ces fractions ont été utilisées pour réaliser des analyses par microscopie électronique sur des SMALPs-TRPV4.



**Figure 54.** Clichés de microscopie électronique à coloration négative de SMALPs-TRPV4. (A) Images des différentes fractions du gradient de glycérol. (B) Images du pool dialysé avant (gauche) et après concentration (droite).

## 2.5. Analyse des SMALPs-TRPV4 par microscopie électronique

Après purification des SMALPs-TRPV4 par chromatographie d'affinité puis sur un gradient de glycérol, différentes fractions issues du gradient de glycérol ont été analysées par microscopie électronique à coloration négative. Il faut noter que le contraste des images n'est pas très bon, probablement à cause de la présence de glycérol, ce qui ne facilite pas l'analyse. Aussi, on ne distingue pas de différences majeures en termes d'homogénéité des échantillons entre les différentes fractions analysées (Figure 54A). Les fractions 13, 14 et 15 ont donc été poolées, soit un volume final d'environ 600 µL, en vue des études par cryo-EM. La présence de glycérol dans l'échantillon est toutefois incompatible avec la vitrification des protéines. Les échantillons ont donc été dialysés pendant 18 h contre un tampon ne contenant pas de glycérol. La concentration des protéines dialysées a ensuite été évaluée par une mesure UV à 280 nm (l'aspect « smeareux » des SMALPs-TRPV4 ne permet en effet pas de réaliser une analyse densitométrique fiable). La concentration du pool dialysé est de 0,140 mg/mL, soit une concentration étant trop faible pour une analyse par cryo-EM. Les échantillons ont donc été concentrés jusqu'à environ 0,650 mg/mL. Si l'homogénéité de l'échantillon dialysé n'est déjà pas idéale (Figure 54B), il apparaît clairement que la concentration a eu un effet délétère majeur sur la qualité de l'échantillon (Figure 54C). Ainsi, nous n'avons pas pu réaliser les études de cryo-EM qui étaient initialement envisagées.

### 3. Discussion générale des résultats et perspectives

#### 3.1.1. Purification des protéines par des détergents

Le premier objectif de ce projet était de mettre au point des protocoles de purification robustes des protéines A<sub>2</sub>A et TRPV4 en détergent afin d'obtenir un point de comparaison solide en vue des études avec des polymères amphiphiles.

##### 3.1.1.1. A<sub>2</sub>A

L'utilisation du système d'expression *Pichia pastoris* permet d'obtenir aisément une quantité satisfaisante du récepteur A<sub>2</sub>A purifié en DDM/CHS, de plusieurs centaines de microgrammes pour la construction A<sub>2</sub>A\_MP2 à plus d'un milligramme pour la construction thermostabilisée A<sub>2</sub>A\_Rant21\_MP3. Dans les deux cas, la levure produit une version du récepteur clivé du côté C-terminal mais une étude réalisée au laboratoire<sup>374</sup> avait précédemment montré que les capacités de liaison de ligands du récepteur ne sont pas impactées par cette troncature. Avec un nombre de sites capables de lier un ligand pouvant atteindre 12 000 pmol par milligramme de protéine purifiée, la majorité des protéines isolées selon la procédure que nous avons établie se trouvent dans un état conformationnel fonctionnel selon ce critère d'activité. Si des valeurs de  $B_{max}$  obtenues sont parfois plus faibles, cela est probablement lié à la variabilité intrinsèque du format expérimental des tests de radiobinding effectués. En effet, il a préalablement été montré au laboratoire, pour des protéines A<sub>2</sub>A\_MP3 reconstituées en nanodisques, des différences dans le taux de protéines capables de fixer un ligand selon la méthode de mesure utilisée (environ 40 % par radiobinding<sup>378</sup> contre environ 90 % par SPR (données non publiées) ou par chromatographie de faible affinité<sup>74</sup>). Il parait donc important de souligner que les résultats obtenus par cette technique de liaison de ligand radioactif à l'équilibre correspondent toujours à une estimation minimale.

Ainsi, nous obtenons des protéines à des coûts réduits (si l'on compare aux coûts de production en cellules d'insectes ou en cellules de mammifères<sup>379</sup>), avec des rendements et des niveaux de pureté satisfaisants, et étant probablement correctement repliées car capables de fixer un ligand. Ces protéines purifiées en détergent ne sont toutefois pas très stables, d'autant plus à température ambiante<sup>378</sup>, ce qui limite leur durée d'utilisation et ne permet pas d'envisager certaines méthodes d'analyse telles que la SPR par exemple. Nous disposons ainsi d'un protocole de purification robuste, qui constitue un point de comparaison solide pour le

développement d'un protocole de purification alternatif, basé sur l'utilisation de polymères.

### 3.1.1.2. TRPV4

La protéine TRPV4 est également produite à des niveaux relativement importants dans la levure *Pichia pastoris*. Après plusieurs essais et plusieurs conditions testées, nous avons pu mettre au point un protocole de purification basé sur un mélange de LMNG/CHS et sur l'ajout de lipides et d'un ligand lors de la purification, nous permettant d'obtenir de bons rendements, d'environ 1 à 1,3 mg de protéines par litre de culture. Cette condition a permis l'obtention d'une structure d'une résolution de 6,3 Å. Le B factor témoigne d'une haute flexibilité de la protéine, ce qui explique que la résolution ne soit pas plus basse. Bien que le niveau de résolution puisse être amélioré, cette étude nous permet toutefois de confirmer que nous obtenons bien un canal tétramérique et que la protéine est structurée, comme le montre l'interaction entre deux domaines ankyrines (Figure 50F). Différentes stratégies pourraient être envisagées pour stabiliser davantage le complexe et ainsi obtenir une meilleure résolution de la structure. On pourrait ainsi optimiser les conditions de production et de purification, notamment en affinant le choix du détergent et la composition des tampons. La digitonine ou son dérivé glycodiosgenin (Anatrace) sont par exemple les détergents les plus utilisés (un tiers de toutes les structures résolues au cours des dix dernières années)<sup>114</sup> notamment pour leur capacité apparente à établir des interactions hydrophobes plus stables avec les protéines membranaires en solution.

Si nous disposons d'informations structurales sur la protéine purifiée, nous n'avons toutefois pas de données nous permettant d'évaluer sa fonctionnalité. Nous avions essayé de mettre au point un test de fixation du rouge de ruthénium (ruthenium red) sur TRPV4, en nous inspirant d'un test spectrophotométrique décrit par Charuk et collègues<sup>380</sup>, mais à cause d'une sensibilité du test trop faible, nous n'avons pas pu obtenir des conditions compatibles avec la mise en œuvre d'expériences de liaison. Pour évaluer la fonctionnalité des canaux, il faudrait donc réaliser, à travers une collaboration, des études d'électrophysiologie, en reconstituant par exemple les protéines purifiées dans les liposomes géants.

### 3.1.2. Criblage et purification par des polymères amphiphiles

Au cœur de ce projet de thèse, l'objectif de cette deuxième phase était d'évaluer le pouvoir solubilisant d'une sélection de polymères amphiphiles sur nos systèmes modèles, puis de mettre au point des protocoles de purification à l'aide des polymères les plus performants.

Différents polymères de différentes natures ont pu être testés au cours de cette étude, tels que les co-polymères de styrène et d'acide maléique, dont les plus utilisés SMA 2000 et SMA 3000, mais aussi d'autres SMA comme le SMA 1440, ayant fait l'objet de peu d'études dans la littérature. Le SMA-ED synthétisé par NovAliX à partir du SMA 2000 s'est malheureusement révélé très difficilement soluble. Ce SMA présente l'intérêt de posséder une fonction amine libre, avec laquelle nous avions envisagé de faire réagir des réactifs biotinylés tel que l'EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo) afin de fonctionnaliser le polymère pour développer des stratégies d'immobilisation des SMALPs généralisables à toute protéine d'intérêt. Nous avons également pu tester les CyclAPols, une nouvelle génération d'amphipols très récemment décrite dans la littérature. Contrairement aux APol précédents, ces polymères ont la capacité de déstabiliser les membranes et d'en extraire les protéines. Si les premières études ont été menées sur des protéines bactériennes produites dans des systèmes bactériens<sup>271</sup>, nous avons pu mettre en évidence qu'ils sont également capables d'extraire une protéine eucaryote, le récepteur A<sub>2</sub>A, produit dans le système *Pichia pastoris*, un système eucaryote. Il est intéressant de noter que ces polymères sont efficaces à des quantités largement inférieures à celles utilisées pour les SMA. En effet, lorsque les protéines sont solubilisées avec 2,5 % de SMA, concentration recommandée dans les protocoles<sup>370</sup> et utilisée dans la large majorité des publications, 750 mg de polymères sont nécessaires pour solubiliser 100 mg de protéines totales, soit un ratio 1:7,5 contre un ratio de 1:1 pour les CyclAPols. En revanche, ces amphipols n'ont pas permis d'extraire TRPV4 des membranes à un ratio de 1:1. A l'heure actuelle, l'efficacité des CyclAPols a principalement été testée sur des protéines globalement de petite taille (moins d'une centaine de kDa) (à l'exception de la protéine AcrB qui fait plus de 300 kDa et dont la structure a pu être résolue<sup>381</sup>) et il serait donc intéressant d'augmenter la quantité de polymères mis en jeu à des concentrations proches de celles utilisées pour les SMA afin de voir si ces conditions sont plus favorables pour solubiliser des complexes plus gros tel qu'un canal de près de 300 kDa.

Lors de la purification des protéines par les SMA (SMA 2000 et SMA 3000), il est apparu que, contrairement à ce qui est publié dans la littérature, il n'est pas forcément nécessaire d'incuber la résine dans le surnageant de purification pendant plusieurs heures (incubation souvent décrite sur la nuit<sup>370</sup>, voire pendant 20 h à 24 °C<sup>254</sup>). Les SMALPs sont également capables d'interagir avec des résines pré-coulées dans des colonnes, réduisant ainsi le temps nécessaire pour l'expérience mais limitant également des phénomènes éventuels de dégradation protéique pouvant survenir lors de longs temps de solubilisation. L'aspect des bandes correspondant aux SMALPs-TRPV4 est toutefois « smeareux ». L'analyse de la bande du gel par des techniques de protéomique pourrait permettre de déterminer si on retrouve uniquement la protéine TRPV4 ou si d'autres protéines interagissent ou sont copurifiées avec les SMALPs, expliquant ce phénomène de smear.

Si des protocoles de purification par chromatographie d'affinité ont pu être adaptés au récepteur A<sub>2</sub>A et au canal TRPV4, il n'en est pas de même pour la chromatographie d'exclusion par la taille. Dans les conditions testées, il s'est avéré impossible voire délétère pour la colonne de faire une étape de SEC après l'IMAC. De même, nous avons également essayé d'injecter les SMALPs-A<sub>2</sub>A après l'étape de purification sur gradient de glycérol mais aucune protéine n'a été détectée en sortie de colonne (*données non présentées*). Nous pouvons donc nous interroger quant à la nature et à l'hétérogénéité des polymères de SMA, et leur capacité à interagir avec ce type de colonne. Pour autant, cette stratégie de purification a été utilisée dans plusieurs études<sup>305,382</sup>, y compris dans l'étude sur A<sub>2</sub>A<sup>254</sup>, sans que les auteurs ne mentionnent ce type de problème. Par ailleurs, dans leur étude sur le SERT, les auteurs indiquent ajouter 0,2 M d'arginine dans le tampon de GF pour réduire les liaisons non spécifiques<sup>297</sup>. Dans d'autres études, les auteurs ne réalisent toutefois qu'une étape unique de purification par IMAC<sup>294,295,298</sup>, laissant légitimement spéculer sur les raisons de l'absence d'analyse par SEC.

Au vu de l'hétérogénéité des échantillons obtenus après IMAC, aussi bien pour A<sub>2</sub>A que pour TRPV4 où cela est encore plus visible, il s'avère toutefois nécessaire d'effectuer une deuxième étape de purification. Lors de ce projet, nous avons pu mettre en place un protocole de purification basé sur la séparation des particules sur gradient de glycérol. La procédure établie a été répétée plus d'une dizaine de fois pour A<sub>2</sub>A et a donné des résultats très reproductibles à chaque essai. Les particules ainsi purifiées ont pu être caractérisées de différentes façons. Pour TRPV4, la procédure de purification ne semble pas encore tout à fait optimale car les fractions

les plus concentrées manquent d'homogénéité d'après les résultats obtenus sur les grilles de microscopie. En partant du postulat selon lequel les fractions 14 et 15 contiennent probablement des objets de grosses tailles (Figure 53), nous aurions pu analyser uniquement les fractions 12 et 13 comme pour A<sub>2</sub>A, mais leurs concentrations étaient bien trop faibles pour envisager des analyses structurales.

Il est également intéressant de noter que, bien que ce problème ne soit quasiment jamais évoqué dans les publications, il n'est pas aussi simple de doser des SMALPs purifiées que des protéines purifiées en détergent, étant donné l'interférence des SMA avec diverses techniques. L'estimation de la concentration des SMALPs purifiées sur un gel de SDS PAGE s'avère être une alternative intéressante, bien que toutefois plus longue et moins précise, la courbe d'étalonnage n'étant jamais parfaite. Cette méthode a toutefois été utilisée dans deux études récentes : pour le NTSR1, où les auteurs ont également déterminé la concentration des SMALPs-NTSR1 sur un gel contre de la protéine purifiée en détergent<sup>303</sup>, et pour la protéine A<sub>2</sub>A où la concentration des SMALPs-A<sub>2</sub>A a été déterminée par SDS PAGE contre des protéines standards<sup>290</sup>. Cette technique n'a toutefois pas pu être utilisée pour les SMALPs-TRPV4 à cause de l'aspect « smeareux » des bandes qui fausse l'analyse. La concentration a donc été déterminée par une mesure à 280 nm tout en étant conscient d'une certaine surestimation liée à l'absorbance du styrène à 280 nm.

Enfin, le CyclAPol C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-50 s'est montré plus efficace que le SMA 2000 pour extraire A<sub>2</sub>A des membranes de levure et la nature des particules obtenues après une étape de purification par chromatographie d'affinité s'est révélée tout à fait compatible avec une étape de SEC, contrairement au SMA 2000. Toutefois deux problèmes majeurs ont été rencontrés. Tout d'abord, les protéines sont élues majoritairement dans le volume mort de la colonne. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. On peut par exemple supposer que les CyclAPols ont solubilisé une importante proportion de protéines oligomériques et/ou agrégées et donc non fonctionnelles ou que les particules extraites sont de tailles importantes. Ces hypothèses pourraient être confirmées par des analyses par microscopie électronique. De plus, un contaminant est co-purifié avec le récepteur A<sub>2</sub>A. Ce contaminant n'a d'ailleurs pas pu être totalement éliminé lors d'une étape supplémentaire de purification anti-FLAG. Nous ne savons pas si le contaminant interagit avec la protéine ou avec les polymères CyclAPols, ou si une même particule pourrait contenir à la fois A<sub>2</sub>A et ce contaminant. A l'inverse des SMA, il serait

intéressant d'augmenter la quantité de CyclAPols mis en jeu pour solubiliser les PMs afin d'étudier si cela peut permettre de déstabiliser d'autres populations de protéines.

### *3.1.3. Caractérisations fonctionnelle et structurale des particules purifiées*

#### *3.1.3.1. A<sub>2</sub>A*

Les particules de A<sub>2</sub>A purifiées par le SMA 2000 et le SMA 3000 ont été caractérisées par différentes techniques. Dans un premier temps, la stabilité des protéines lors du stockage à -80°C a été évaluée par des tests de radiobinding. Des courbes de saturation ont été réalisées à intervalles de temps réguliers afin d'évaluer l'éventuelle évolution du  $B_{max}$  et du  $K_D$ . Si l'affinité du ligand pour le récepteur reste inchangée dans le temps, il n'en est pas de même pour le nombre de sites disponibles pour la liaison du ligand qui tend à diminuer au cours du temps. Toutefois, au vu de la variabilité intrinsèque de l'expérience, il serait intéressant de confirmer ces résultats par une autre technique comme la SPR par exemple qui permettrait de vérifier si les niveaux de réponse obtenus sont stables et si on retrouve les mêmes constantes de liaisons. A ce propos, il est intéressant de souligner que les résultats tout à fait exploitables de SPR ont été obtenus sur des échantillons conservés pendant 10 à 15 jours à -80 °C. Ainsi, si les SMALPs semblent moins stables à -80°C que des nanodisques (résultats préalablement obtenus au laboratoire<sup>378</sup>), on peut toutefois raisonnablement affirmer que les SMALPs restent utilisables au moins 1 mois après leur purification pour des tests de caractérisation pharmacologique tels que ceux que nous avons réalisés.

La fonctionnalité des SMALPs-A<sub>2</sub>A a ensuite été évaluée par des tests de liaisons de différents ligands agonistes et antagonistes du récepteur. Deux formats de tests différents ont été mis en œuvre : des courbes de compétitions basées sur le déplacement d'un radioligand antagoniste et des études d'interactions directes par SPR. Ces deux techniques ont permis d'obtenir des résultats similaires : l'affinité des ligands antagonistes pour les SMALPs-A<sub>2</sub>A est globalement similaire à celle que l'on obtient sur des protéines purifiées en détergent ou sur des protéines reconstituées en nanodisques. La différence de  $K_i$  que nous observons pour le XAC et le DPCPX nécessiterait d'être confirmée par des réplicats expérimentaux, d'autant plus qu'aucune différence de  $K_D$  n'a été observée en SPR pour le XAC entre les SMALPs et les nanodisques. Les résultats sont plus tranchés pour les agonistes. En effet, la diminution de l'affinité est très nette entre les SMALPs, les protéines en détergent et

la protéine en nanodisques pour l'adénosine. Nous n'avons toutefois pas d'information sur l'affinité du NECA sur des nanodisques, aussi bien pour les tests de compétition que par SPR. De même, il faudrait vérifier que nous arrivons à mesurer une liaison par SPR entre l'adénosine et la protéine A<sub>2</sub>A reconstituée en nanodisques afin d'avoir des données complètes. Il faut également noter que l'affinité de la protéine pour différents ligands, obtenue sur des échantillons membranaires, est plus faible que lorsque les protéines sont purifiées en détergent. Enfin, si on compare les valeurs d'affinité de la littérature obtenues sur des membranes de cellules de mammifères (cellules CHO ou HEK)<sup>349</sup> à celles obtenues sur des membranes de *Pichia pastoris*, on constate que l'affinité de la protéine est globalement plus faible dans les membranes de levures.

De ces constats, nous émettons deux hypothèses majeures pour expliquer la baisse d'affinité des ligands agonistes. Au vu des différences d'affinité observées entre des cellules de mammifères et les membranes de *Pichia pastoris*, la première hypothèse tient à l'environnement lipidique des membranes de *Pichia pastoris* et donc des SMALPs. En effet, les membranes de levures ont une composition lipidique différente de celle des cellules de mammifères. Hormis les phospholipides, les acides gras et les sphingolipides classiquement retrouvés chez tous les mammifères, la membrane plasmique des levures contient de l'ergostérol comme stérol majoritaire et non du cholestérol<sup>383</sup>. Il est établi depuis plusieurs années que le cholestérol joue un rôle crucial dans la structure et dans la fonction de nombreux RCPG<sup>384</sup>, y compris le récepteur A<sub>2</sub>A. Par exemple, Liu et collègues ont montré que l'hélice transmembranaire VI est stabilisée par le cholestérol, ce qui pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la fixation des ligands dans le site de liaison<sup>385</sup>. Une étude récente montre que le cholestérol serait un modulateur allostérique faible du récepteur A<sub>2</sub>A<sup>386</sup>. Enfin, dans une autre étude, les auteurs ont étudié l'impact de la déplétion du cholestérol par des cyclodextrines dans des cellules HEK sur l'activité du récepteur A<sub>2</sub>A et ils ont montré une réduction de la production d'AMPc bien que la liaison de différents ligands radioactifs ou fluorescents soit inchangée<sup>387</sup>. De même, l'ajout de CHS lors de la purification de A<sub>2</sub>A en détergent permet de stabiliser la protéine, ce qui peut également expliquer les différences d'affinités observées entre les SMALPs et les protéines en détergent.

Pour tester cette hypothèse, dans un premier temps, il serait intéressant d'évaluer la composition des lipides présents dans les SMALPs purifiées. Ce type d'analyse a été menée par diverses méthodes comme la chromatographie gazeuse

ou la spectrométrie de masse sur différents types de protéines purifiées<sup>258</sup>. Routledge et collègues ont montré par LC-MS/MS que les profils des phospholipides présents dans les SMALPs-A<sub>2</sub>A sont généralement similaires à ceux de la membrane totale<sup>290</sup>. Le contenu en stérols n'a toutefois pas été analysé. De façon intéressante, dans cette même étude, les auteurs décrivent que le récepteur montre peu de changements conformationnels en réponse à l'agoniste NECA, contrairement aux changements observés lors de la liaison du ZM241385. Dans un deuxième temps, nous souhaiterions évaluer l'impact du cholestérol en utilisant une souche de *Pichia pastoris* qui a été modifiée pour synthétiser non plus de l'ergostérol mais du cholestérol<sup>388</sup>. Nous souhaitons évaluer les propriétés pharmacologiques des SMALPs-A<sub>2</sub>A isolées à partir de cette souche en comparaison avec les résultats obtenus avec la souche SMD1163 utilisée lors de ce projet.

La deuxième hypothèse que nous émettons serait que le polymère de SMA exerce une pression trop importante sur les protéines, ce qui modifierait leur conformation et donc les affinités de liaison de ligands. Pour tester cette hypothèse, nous souhaiterions évaluer la capacité de fixation de ligands d'autres récepteurs. Dans cette optique, des expériences préliminaires ont été menées au laboratoire sur le récepteur à la dopamine D2DR. Les résultats de purification obtenus avec le SMA 2000 sont très encourageants (données non présentées) et il s'agit maintenant de poursuivre ces essais de purification et d'étudier la capacité des protéines purifiées à lier des ligands.

Enfin si nous disposons d'un faisceau d'indices sur la capacité du récepteur à fixer ces ligands, une des critiques que nous pouvons faire vis-à-vis de ce travail est que nous ne disposons d'aucune information quant à la fonctionnalité de la protéine à activer les protéines G ou à recruter l'arrestine. Il serait donc intéressant d'évaluer l'efficacité de stimulation de la protéine G<sub>s</sub> par un test d'échange du GDP par exemple.

### 3.1.3.2. TRPV4

Pour ce projet, la protéine TRPV4 était destinée à évaluer l'apport des SMA pour la réalisation d'études structurales. Comme indiqué précédemment, les fractions les plus concentrées issues du gradient de glycérol ne sont pas très homogènes. Les fractions les plus en amont du gradient étaient quant à elles trop peu concentrées

pour envisager des études structurales. De même, la présence de glycérol dans les échantillons n'est pas compatible avec la cryo-EM, nécessitant donc une étape supplémentaire pour retirer le glycérol, ce qui va généralement diluer d'autant plus les protéines. De plus, la concentration des SMALPs-TRPV4 a altéré la qualité de l'échantillon, rendant impossible toute étude. Ainsi, il semble nécessaire de revoir la procédure de purification pour TRPV4 avant d'envisager des études structurales plus approfondies. Si les tests de solubilisation avec le DIBMA ont donné des résultats contradictoires, il serait toutefois intéressant de confirmer ces résultats afin de vérifier si cela pourrait permettre d'améliorer l'homogénéité de l'échantillon.

De la même façon que nous l'avons soulignée pour les protéines purifiées en détergent, nous ne disposons d'aucune information quant à la fonctionnalité des SMALPs-TRPV4. Le canal KcsA purifié en SMALPs a pu être directement reconstitué dans une bicouche de lipide planaire, ce qui a permis une caractérisation fonctionnelle du canal par électrophysiologie sans priver au préalable la protéine de son environnement natif<sup>256</sup>. Une stratégie similaire pourrait donc être envisagée pour les SMALPs-TRPV4. De même il existe de nombreux ligands de TRPV4<sup>366</sup>. Nous pourrions ainsi envisager des études de liaison de ligand par SPR en immobilisant le SMALPs-TRPV4 par le tag histidine de la protéine, sur une puce NTA. Cette stratégie n'a pour le moment pas encore été appliquée pour des protéines purifiées en SMA mais elle a déjà été mise en œuvre pour cribler des fragments sur le récepteur  $\beta$ 1AR<sup>128</sup> ou pour étudier l'interaction entre le récepteur CXCR4 et un fragment d'anticorps de camélidés (nanobody)<sup>389</sup>.

# CONCLUSION GENERALE

Le travail réalisé au cours de cette thèse donne des premiers éléments de réponse quant à l'évaluation de polymères amphiphiles pour l'extraction, la purification et la caractérisation de protéines membranaires produites à partir de la levure *Pichia pastoris*, en comparaison avec les résultats obtenus à partir de protéines purifiées en détergent.

Une procédure de purification robuste du récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A a pu être mise au point à partir des SMA 2000 et SMA 3000, avec des rendements particulièrement significatifs. Cette procédure inclut une première étape de chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés et une deuxième étape de séparation sur un gradient de glycérol. Les propriétés pharmacologiques des protéines ainsi purifiées ont été déterminées par deux techniques différentes, selon des courbes de déplacement d'un ligand radioactif et par SPR. Si les SMALPs-A<sub>2</sub>A lient des ligands antagonistes de manière relativement similaire lorsque l'on compare SMALPs, protéines purifiées en détergent ou nanodisques, ce n'est pas le cas pour les ligands agonistes pour lesquels l'affinité de la protéine semble nettement diminuée. Ces résultats valident ainsi la capacité des polymères testés à isoler des particules contenant ce RCPG dans une conformation active, mais ils soulignent également l'importance de l'environnement lipidique sur cette activité et en particulier sur la modulation des interactions entre la protéine et ses ligands. Nos données suggèrent notamment que les lipides des membranes de la levure *Pichia pastoris* avec lesquels le récepteur A<sub>2</sub>A a été isolé dans les SMALPs ne fournissent pas les conditions idéales à un repliement optimal du récepteur. Il conviendra ainsi d'évaluer cette hypothèse en comparant différentes SMALP-A<sub>2</sub>A préparées à partir de différents systèmes recombinants, tels que des souches de levure au profil lipidique modifié, des cellules d'insectes et des cellules de mammifères.

Ce travail a également porté sur l'étude d'une autre protéine modèle, le canal TRPV4, pour lequel il a d'abord été nécessaire de sélectionner des clones de levures *ad hoc* puis de mettre au point un protocole de purification à l'aide de détergent. L'optimisation des conditions de purification a finalement permis d'obtenir une structure du canal à 6,3 Å par cryo-EM. Différentes conditions expérimentales sont tout à fait envisageables pour améliorer ce niveau de résolution, même si cela ne fait pas partie des objectifs initiaux de ce projet de thèse. Cette structure constitue en

effet un point de départ intéressant pour pouvoir évaluer la performance et l'utilité des SMA dans le cadre d'études structurales de protéines membranaires. La procédure de purification par le polymère SMA 2000 initialement mise au point sur le récepteur A<sub>2</sub>A a ainsi été transposée à TRPV4 en vue de réaliser des études structurales des SMALPs. Si TRPV4 a pu être extrait efficacement par le SMA 2000, montrant ainsi le potentiel intéressant de ce polymère comme moyen d'isoler ce canal modèle à partir des membranes de levure, la procédure de purification reste encore à affiner pour pouvoir pleinement progresser vers les études structurales par cryo-EM envisagées.

De manière globale, les objectifs fixés au début de ce projet ont été relativement atteints dans la mesure où nous avons pu montrer que certains polymères amphiphiles ont la capacité de déstabiliser les membranes de levure de manière relativement efficace et d'en extraire des particules contenant les deux protéines eucaryotes modèles que nous avions sélectionnées. Même si des investigations plus poussées sont encore nécessaires pour pouvoir caractériser finement ces particules, ce travail a néanmoins identifié un certain nombre de difficultés et de limites expérimentales qui ne nous permettent pas pour le moment de conclure sur l'apport substantiel des SMA comme alternative aux détergents pour l'étude de protéines membranaires en solution.

## **ANNEXES**

*Publications Scientifiques*



## Publication 1.

Preparation of recombinant membrane proteins from *Pichia pastoris* for molecular investigations.

Guyot L., Hartmann L., Mohammed-Bouteben S., Caro L., Wagner R.

*Current Protocols in Protein Science*, 100, e104 (2020)

# Preparation of Recombinant Membrane Proteins from *Pichia pastoris* for Molecular Investigations

Lucile Guyot,<sup>1,2</sup> Lucie Hartmann,<sup>1</sup> Sarah Mohammed-Bouteben,<sup>1</sup>  
Lydia Caro,<sup>1</sup> and Renaud Wagner<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>IMPRess Facility, Biotechnology and Cell Signaling UMR 7242, CNRS—University of Strasbourg, Illkirch, Cedex, France

<sup>2</sup>NovAliX, Illkirch, France

<sup>3</sup>Corresponding author: [renaud.wagner@unistra.fr](mailto:renaud.wagner@unistra.fr)

*Pichia pastoris* is a eukaryotic microorganism reputed for its ability to mass-produce recombinant proteins, including integral membrane proteins, for various applications. This article details a series of protocols that progress towards the production of integral membrane proteins, their extraction and purification in the presence of detergents, and their eventual reconstitution in lipid nanoparticles. These basic procedures can be further optimized to provide integral membrane protein samples that are compatible with a number of structural and/or functional investigations at the molecular level. Each protocol provides general guidelines, technical hints, and specific recommendations, and is illustrated with case studies corresponding to several representative mammalian proteins. © 2020 by John Wiley & Sons, Inc.

**Basic Protocol 1:** Production of membrane proteins in a *P. pastoris* recombinant clone using methanol induction

**Basic Protocol 2:** Preparation of whole-membrane fractions

**Alternate Protocol 1:** Preparation of yeast protoplasts

**Basic Protocol 3:** Extraction of membrane proteins from whole-membrane fractions

**Basic Protocol 4:** Purification of membrane proteins

**Alternate Protocol 2:** Purification of membrane proteins from yeast protoplasts

**Alternate Protocol 3:** Simultaneous protoplast preparation and membrane solubilization for purification of membrane proteins

**Basic Protocol 5:** Reconstitution of detergent-purified membrane proteins in lipid nanoparticles

Keywords: detergent • extraction • integral membrane proteins • lipid particles reconstitution • *Pichia pastoris* • protoplast • purification • recombinant expression

## How to cite this article:

Guyot, L., Hartmann, L., Mohammed-Bouteben, S., Caro, L., & Wagner, R. (2020). Preparation of recombinant membrane proteins from *Pichia pastoris* for molecular investigations. *Current Protocols in Protein Science*, 100, e104. doi: 10.1002/cpps.104

## INTRODUCTION

As a methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* combines the simplicity of manipulation and genetic engineering of a unicellular organism with the sophisticated physiology and cell organization of a eukaryotic host, as well as a peculiar and strongly regulated

Guyot et al.

1 of 27

methanol-dependent metabolism (Ahmad, Hirz, Pichler, & Schwab, 2014; Gasser & Mattanovich, 2018; Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005). These features make it ideally suited to mass production of a large variety of proteins and compounds, fitting the quality, regulatory, and cost requirements of a number of industrial fields, including the food, pharmaceutical, biotechnology, and chemical industries (Love, Dalvie, & Love, 2018; Mattanovich, Sauer, & Gasser, 2014; Spohner, Müller, Quitmann, & Czermak, 2015; Zhu, Sun, Wang, & Li, 2019).

*P. pastoris* is also a system of choice for difficult-to-express proteins, particularly for eukaryotic integral membrane proteins (IMPs) that are investigated in functional and structural studies or for screening applications. IMPs assume a large panel of functions that are essential for cellular homeostasis and integrity (e.g., sensing and transport of molecules and ions, signal transduction, energy conversion, lipid metabolism, cell-to-cell communication). As these biological processes are finely tuned, the corresponding IMPs are generally poorly abundant in their natural environment and have to be recombinantly overexpressed in order to recover workable amounts. In addition, they necessarily require the hydrophobic environment of a lipid bilayer (or a membrane mimic) to achieve the proper spatial folding responsible for their specific function. Overall, these critical aspects strongly contribute to the challenge in producing and studying IMPs at the molecular level. As a strong illustration of the versatility and potency of *P. pastoris*, hundreds of these demanding IMPs have been successfully produced using this system (see numerous references in Alkhalfioui, Logez, Bornert, & Wagner, 2011, much more since), dozens of them in qualities and quantities compatible with 3D structure resolution (updated list available at <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>).

Complete general guidelines, detailed protocols, and optimization strategies can be found for expression and production of IMPs with *P. pastoris* (Bornert, Alkhalfioui, Logez, & Wagner, 2012; Hartmann, Kugler, & Wagner, 2016; Logez, Alkhalfioui, Byrne, & Wagner, 2012; Singh et al., 2012a,b). The aim of this article is to detail a set of procedures we routinely apply to generate a panel of IMP samples for further investigation. These protocols describe a series of preparative methods, ranging from whole-cell and membrane-fraction preparations down to isolation of proteins maintained in detergents or reconstituted in lipid nanoparticles. Each protocol is exemplified with representative results we obtained for a variety of eukaryotic IMPs.

Starting from a yeast clone of interest (see Bornert et al., 2012) for upstream cloning and selection strategies, Basic Protocol 1 presents a standard and straightforward procedure for production of a recombinant IMP in a 2-L baffled flask culture format accessible to every commonly equipped biology lab. This culture volume often yields recombinant IMPs in the low milligram range (i.e., amounts compatible with a number of biochemical and biophysical analyses) and can be easily upscaled to 10–12 L.

Basic Protocol 2 details a robust method for efficiently disrupting the very resistant membrane envelope of *P. pastoris* to generate whole-membrane preparations. In addition to this rather classical protocol, Alternate Protocol 1 depicts a method employing treatment with a Zymolyase enzyme mixture to form protoplasts, i.e., yeast cells devoid of the surrounding cell wall.

Basic Protocol 3 focuses on the extraction of IMPs from membrane samples with detergent compounds. The procedure is technically rather straightforward, but represents a crucial step, as it aims at identifying the best experimental conditions leading to effective membrane solubilization without IMP destabilization, which is always a protein-dependent process. When this procedure is set up, detergent-solubilized IMPs can then be isolated following various chromatography purification approaches.

Basic Protocol 4 details a two-step purification strategy that we routinely apply as a starting point before IMP-specific optimizations and adjustments. In two subsequent protocols, IMP solubilization and purification are achieved from yeast protoplasts, either sequentially (Alternate Protocol 2) or concomitantly (Alternate Protocol 3), with the double aim of reducing procedure time and improving the quality of the purified sample.

Finally, a protocol aiming at replacing IMPs in a membrane-mimicking lipid environment is exemplified with a human G protein-coupled receptor self-assembling into nanodiscs, i.e., nanoscale phospholipid bilayers stabilized by membrane scaffold proteins.

The protocols presented in this article are mainly focused on preparative approaches. As further discussed in the Commentary section, the various types of IMP samples generated with these procedures are ready to be evaluated by a panel of analytical methods for qualifying their activity, purity, homogeneity, topology, dynamics, and any other parameter, allowing one to investigate their structure and function at the molecular level.

## PRODUCTION OF MEMBRANE PROTEINS IN A *P. pastoris* RECOMBINANT CLONE USING METHANOL INDUCTION

This production step presupposes an existing yeast clone expressing the IMP of interest. If such a clone is not available, preliminary and substantial work must be done to isolate a *P. pastoris* recombinant clone. The *Current Protocols in Protein Science* article Bornert et al. (2012) and another recent report (Hartmann et al., 2016) are dedicated to this issue. Briefly, this includes the design and cloning of the desired sequence in a dedicated *P. pastoris* expression vector, the integrative transformation of *P. pastoris*, and the phenotypic selection of recombinant clones. These clones are then screened under expression-inducing growth conditions in a small-scale culture format in order to select the most valuable clones. These ideally correspond to the best balance between high protein production and properly folded/active proteins. Once the best clone and optimal expression conditions are identified, production can start using the present protocol.

Although a number of alternative and valuable expression strategies have been described (Fischer & Glieder, 2019), the immense majority of IMPs produced using *P. pastoris* are expressed under a methanol-induced regimen based on the strongly regulated *P<sub>AOX1</sub>* promoter (for detailed descriptions, see Logez et al., 2012; Ahmad et al., 2014). In these conditions, yeast are first cultured in a glycerol-containing medium (where recombinant protein expression is repressed) until an appropriate cell density is achieved. They are then transferred to a methanol-containing medium to induce IMP production.

Baffled shaker flasks are the system of choice for producing significant amounts of IMPs (in the milligram range) in reasonable culture volumes (usually 2–10 L). Importantly, flasks designed to favor optimal gas exchange are highly recommended, such as Ultra Yield flasks (Thomson) with AirOTop seals that include a 0.2- $\mu$ m resealable and sterile membrane barrier.

For larger production volumes, bioreactors can be adapted to optimize production and proper folding. Parameters such as aeration, temperature, pH, and medium composition can be tightly regulated with these systems, with a number of fed-batch and co-feeding strategies available. Such approaches and their recent developments and applications for heterologous protein production can be found in several references (Liu et al., 2019; Singh et al., 2012b).

The procedure detailed below describes the standard conditions for inducing 2 L of culture in baffled shaker flasks and generating eight cell pellets that can be used immediately or stored for later use. As outlined in Bornert et al. (2012), a number of parameters may

## BASIC PROTOCOL 1

Guyot et al.

3 of 27

be adjusted, such as the temperature and duration of the methanol induction phase, the composition of the two media, and the addition of chemical chaperones such as DMSO and/or specific ligands. These protein-dependent optimizations may have a critical impact on the production outcome by increasing the proportion of properly folded and active IMPs, as already shown (André et al., 2006).

### Materials

Isolated recombinant clone on a freshly streaked YPD agar plate (see recipe for plates)

BMGY medium (see recipe)

BMMY medium (see recipe)

Phosphate-buffered saline (PBS; e.g., Euromedex, cat. no. ET330)

2.5-L baffled flasks (e.g., Ultra Yield, Thomson, cat. no. 931136-B)

1-L sterile centrifuge bottle

50-ml conical tubes

30° and 22°C shaking incubators

Spectrophotometer

Centrifuge

1. Inoculate 500 ml freshly prepared BMGY medium in a 2.5-L baffled flask with a fresh recombinant colony isolated on a YPD agar plate. Incubate overnight on a shaker at 250 rpm, 30°C.

*This protocol can be applied to other culture formats, ranging from 50-ml conical tubes to 5-L baffled flasks. For optimal aeration during induction, it is important to maintain a 1:5 ratio between the volume of the yeast culture and the total volume of the vessel.*

2. Measure the OD<sub>600</sub> of the culture. Dilute cells in fresh BMGY medium to achieve a volume of 1 liter with an OD<sub>600</sub> of ~2.5 (~10<sup>8</sup> cells/ml). Split the culture into two baffled flasks and incubate on a shaker at 250 rpm, 30°C, until the culture reaches an OD<sub>600</sub> of ~10 (~4-5 hr).

*When measuring cell turbidity at OD<sub>600</sub>, be aware of the linearity limit of the method/instrument. We usually fix this limit at 0.3 OD and dilute the measured sample accordingly.*

3. Pellet cells by centrifuging in a sterile 1-L bottle for 5 min at 2000 × g, room temperature.
4. Decant supernatant and resuspend pellet in 2 L fresh BMMY medium to induce expression. Split into four baffled flasks and incubate 18-24 hr in a shaker at 22°C, 250 rpm.
5. Pool cultures in two 1-L centrifuge bottles and harvest cells by centrifuging for 10 min at 3000 × g, 4°C.
6. Decant supernatants and wash each cell pellet (corresponding to 1 L culture) with 200 ml PBS, pH 7.4. Split each into four 50-ml conical tubes and centrifuge for 10 min at 3000 × g, 4°C.
7. Discard supernatant and weigh cell pellets.

*Pellets can be snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C or kept on ice to be used directly for membrane (see Basic Protocol 2) or protoplast (see Alternate Protocol 1) preparations.*

*In this format, each conical tube content corresponds to 250 ml culture. The wet cell pellet in each tube is expected to be between 6 and 8 g.*

## PREPARATION OF WHOLE-MEMBRANE FRACTIONS

*P. pastoris* cells are surrounded by a thick protective cell wall containing  $\beta$ -1,3-glycan,  $\beta$ -1,6-glycan, chitin, and mannoproteins (Cabib & Arroyo, 2013), so a robust cell lysis method is required. Methods of choice usually include vigorous mechanical shaking with microbeads because they are very efficient and compatible with various sample volumes and tubes. The widest-known and simplest method is to lyse the cell membranes through several cycles of vigorous shaking and ice-cooling phases. To achieve reproducible cell lysis efficacy, programmable devices are recommended, such as the TissueLyser from Qiagen or the FastPrep-24 from MP Biomedicals, which are suitable for volumes up to 50 ml, or the more sophisticated Dyno Mill agitators, which can handle larger sample volumes. Besides mechanical shaking techniques, pressure-based instruments are also efficient for lysing *P. pastoris* cells. In addition to the well-known French press, several cells disruptors are available from Constant Systems that can handle samples from one to hundreds of milliliters with pressure application from 1 to 2.7 kbar.

Whatever the lysis method, addition of protease inhibitors is strongly recommended to prevent degradation of recombinant proteins by intracellular proteases released upon cell disruption.

Following the cell lysis step, large debris and unbroken cells are removed by low-speed centrifugation and the resulting supernatant is subsequently ultracentrifuged. The membrane pellet is then recovered in an appropriate buffer with a Potter homogenizer to constitute a whole-membrane preparation. Optionally, several steps of stringent washes and ultracentrifugation may be applied to optimize the removal of membrane-associated proteins, resulting in samples enriched with the IMP of interest; such a protocol is exemplified in Bornert et al. (2012). Finally, the cell lysis efficacy can be evaluated by determining the total protein concentration, typically by BCA (e.g., Thermo Scientific, cat. no. 23225) or Bradford assay (e.g., BioRad cat. no. 5000006), and the expression and activity of the protein of interest in the preparation can be determined by immunoblotting and a specific activity assay, if available.

The protocol described below is a bead-based disruption method we routinely apply for preparing membranes of *P. pastoris* overexpressing various IMPs of interest.

### Materials

Yeast cell pellets from 1 L culture (four pellets, ~6-8 g each; see Basic Protocol 1)

TNGE buffer (see recipe)

TNG buffer (see recipe)

Acid-washed glass beads (425- to 600- $\mu$ m diameter; Sigma-Aldrich, cat. no. G8772-1KG)

Cell breaking device (e.g., FastPrep-24 high-speed benchtop homogenizer, MP Biomedicals)

Ultracentrifuge-compatible bottles

Ultracentrifuge equipped with an appropriate fixed-angle rotor

50-ml Potter homogenizer

15- and 50-ml conical disposable tubes

Additional reagents and equipment for BCA assays and immunoblot analysis (see *Current Protocols* articles Olson & Markwell, 2007 [BCA]; Gallagher, 2012 [SDS-PAGE]; Goldman, Ursitti, Mozdzanowski, & Speicher, 2015 [electrotransfer]; Bornert et al., 2012 [immunoblotting of expressed IMPs])

1. Resuspend each of four 6- to 8-g yeast pellets with 25 ml ice-cold TNGE buffer.

*Pellets corresponding to 1-5 L can be conveniently processed in one day.*

Guyot et al.

5 of 27

2. Add 10 ml acid-washed glass beads to each.
3. Place tubes on a cell breaking device and lyse cells by performing three cycles of alternating shaking (40 s at 6 m/s on a FastPrep-24) and cooling (40 s on ice).
4. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C. Transfer all four supernatants to a single flask.
5. Dissolve each pellet in up to 25 ml ice-cold TNGE buffer and repeat steps 3-4 for two additional rounds, adding all supernatants to the same flask.
6. Centrifuge supernatant in 50-ml tubes for an additional 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
7. Transfer supernatant to appropriate bottles and separate by ultracentrifuging for 30 min at  $100,000 \times g$ , 4°C.

*Carefully weigh the bottles and check that the rotor is properly balanced.*

8. Discard supernatant and resuspend pelleted whole membranes in 45 ml ice-cold TNG buffer using a 50-ml Potter homogenizer until the suspension is homogenous.
9. Split membrane preparation into five 15-ml conical tubes containing  $\sim 10$  ml each. Store at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Membrane preparations can be used directly for further analyses and downstream processing of the IMP of interest. When stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , they are usually stable for several months.*

10. Determine protein concentration of the membrane preparation by BCA.

*When using a FastPrep homogenizer under these conditions, protein concentrations are usually  $\sim 10$  mg/ml, (i.e.,  $\sim 500$  mg for four cell pellets obtained from 1 L culture).*

11. Evaluate production of the IMP of interest by immunoblotting and a specific activity assay, if available.

## **ALTERNATE PROTOCOL 1**

### **PREPARATION OF YEAST PROTOPLASTS**

Although *P. pastoris* is a very efficient overexpression system, a variable but significant proportion of misfolded and/or aggregated protein is often produced and co-purified when using standard IMP protocols. This phenomenon is poorly characterized in the context of membrane protein production, but it is widely recognized that overexpression overwhelms cell biosynthesis and translocation machineries and often elicits improper IMP folding (Vogl et al., 2014). Such events cause a number of stresses and responses, with various outcomes including retention of misfolded proteins within the secretory pathway and formation of protein aggregates before their eventual degradation (Buck et al., 2015; Schlebach & Sanders, 2015).

In this context, we have found it strongly useful in some cases to preferentially purify specific membrane subfractions (in particular the plasma membrane) where properly folded IMPs are the most often located. This strategy is highly valuable for extraction and purification of a number of IMPs as presented in Alternate Protocols 2 and 3. This approach requires cells compatible with such fractionation approaches, however, and further requires the use of weaker yeasts devoid of their thick cell wall, such as protoplasts.

The procedure presented here is based on degradation of the *P. pastoris* cell wall using glucanase enzymes (e.g., glucanases from snail digestive juice, Zymolyase or Lyticase from microbial sources) to result in protoplast cells. These can then serve as a starting material for several applications, including IMP activity assays performed on whole cells, subcellular fractionation approaches (von Hagen & Michelsen, 2013), or direct extraction of IMPs using detergents (as further described in Alternate Protocols 2 and 3). The

following proportions are given for a cell pellet of ~6-8 g, obtained from 250 ml induced culture (see Basic Protocol 1), but can be upscaled proportionally.

### Materials

Yeast cell pellet (see Basic Protocol 1)  
Milli-Q-purified water  
SED buffer (see recipe)  
1 M sorbitol (Sigma-Aldrich, cat. no. S6021)  
CG buffer (see recipe)  
200 U/ml Zymolyase 20 T (Amsbio, ref. 120491-1)

50-ml conical disposable tubes

Centrifuge

Tube rotator

1. Resuspend cell pellet in 50 ml Milli-Q water. Split to two 50-ml conical tubes and fill to 50 ml with Milli-Q water.
2. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
3. Discard supernatant and wash pellet with 50 ml SED buffer.
4. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
5. Discard supernatant and wash pellet with 50 ml of 1 M sorbitol.
6. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
7. Discard supernatant and resuspend pellet in CG buffer to give a cell concentration of ~80 g/L (~40 ml buffer).
8. Add 20 U Zymolyase per gram of initial cell pellet and incubate for 15-30 min at room temperature under gentle agitation.

*The amount of Zymolyase and/or duration of treatment may impact the integrity of proteins and thus have to be adjusted to the IMP of interest.*

9. Harvest protoplasts by centrifuging for 5 min at  $750 \times g$ , 4°C. Use minimal acceleration and deceleration to avoid rupturing the protoplasts.
10. Carefully discard supernatant using a pipette.

*Protoplasts are ready for detergent solubilization and IMP purification (see Alternate Protocols 2 and 3). They should not be stored.*

### EXTRACTION OF MEMBRANE PROTEINS FROM WHOLE-MEMBRANE FRACTIONS

When planning the investigation of IMPs isolated in aqueous solutions, a critical challenge is determining the experimental conditions that allow efficient extraction from membranes without destabilizing the protein's structure or impairing its function. This crucial step is realized by the use of amphiphilic molecules, most generally detergents, although very recent detergent-free approaches using amphiphilic polymers are being developed (Bada Juarez, Harper, Judge, Tonge, & Watts, 2019; Overduin & Klumperman, 2019).

As often stated in biochemistry, selection of IMP solubilization methods and detergents is regarded as an art rather than a science. Step-by-step guidelines and very useful tips can be found in excellent comprehensive reviews and book chapters (Duquesne, Prima, & Sturgis, 2016; Seddon, Curnow, & Booth, 2004; Tate, 2010) to help optimize conditions for your IMP of choice. In particular, key concepts are detailed such as the critical

### BASIC PROTOCOL 3

Guyot et al.

7 of 27

micellar concentration (CMC), which represents the concentration above which a given detergent forms micelles. These concepts are important to understand because they determine the way each detergent is used to extract IMPs and maintain them in solution.

If no information is available for solubilization of a targeted IMP, the initial step usually consists in screening a panel of extraction conditions by varying a number of parameters, such as the choice and concentration of detergent, the ionic strength, the membrane protein concentration, and the addition of stabilizing compounds (Champeil et al., 2016; Kotov et al., 2019). The ideal combination is hardly predictable, as it depends on the nature of the IMP, its local lipid environment in the membrane, and the physicochemical properties of the detergent. The choice of detergent is often guided by its efficient extraction capacity, which is frequently correlated with unfolding or instability issues for the IMP of interest. Therefore, as far as a specific functional test is available, solubilization conditions are evaluated in terms of both IMP yields and protein activity and stability.

Here we present a general protocol for IMP extraction from whole *P. pastoris* membranes. In our experience, a simple initial screening using a small number of representative detergents and conditions often leads to successful extraction for a panel of eukaryotic IMPs. When a satisfying set of solubilization conditions is identified, it can be directly transposed to a preparative scale.

### Materials

Membrane suspension (see Basic Protocol 2)

Solubilization buffer S0 (see recipe)

10× concentrated detergent solutions (Anatrace)

Benchtop tube rotator (e.g., RotoFlex tube rotator)

Benchtop ultracentrifuge with appropriate microtubes

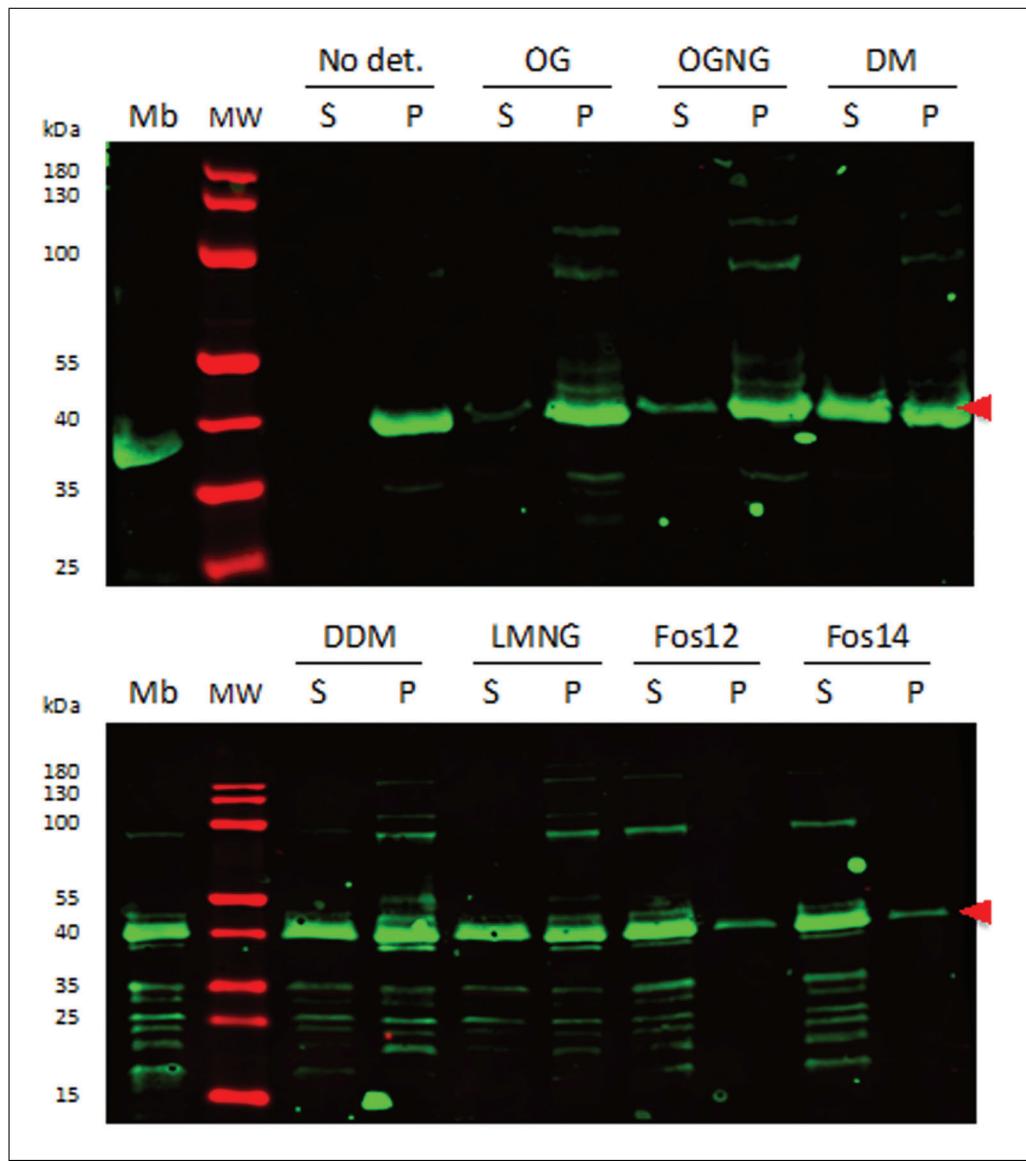
Disposable pestle for microtubes

Additional reagents and equipment for BCA assays and immunoblot analysis (see *Current Protocols* articles Olson & Markwell, 2007 [BCA]; Gallagher, 2012 [SDS-PAGE]; Goldman et al., 2015 [electrotransfer]; Bornert et al., 2012 [immunoblotting of expressed IMPs])

1. In ultracentrifuge-compatible microtubes, dilute membrane suspension to 2 mg/ml in 1 ml solubilization buffer S0 supplemented with the selected 1× detergent solutions.

*For the detergents in Figure 1, the final 1× concentrations were 2% (w/v) for OG and 1% (w/v) for all others.*
2. Incubate for 30 min at room temperature on a benchtop tube rotator.
3. Ultracentrifuge for 30 min at 100,000 × *g*, 4°C.
4. Carefully transfer supernatant (containing solubilized material) to a new microtube.
5. Resuspend remaining membrane pellet in 1 ml solubilization buffer S0 using a disposable pestle.
6. Evaluate IMP solubilization efficiency by comparing the content of the supernatant and resuspended pellet using standard immunoblotting and a specific activity assay, if available.

*Figure 1 shows a typical immunoblot analysis from a solubilization screening experiment conducted on a human 4TM cell surface receptor expressed in *P. pastoris*. Membrane preparations were incubated in the presence of seven representative detergents. The data highlight the differential extraction potentials of the detergents tested, with yields of solubilized receptor ranging from low (OG, OGNG) to medium (DM, DDM, LMNG) to high (Fos12, Fos14).*

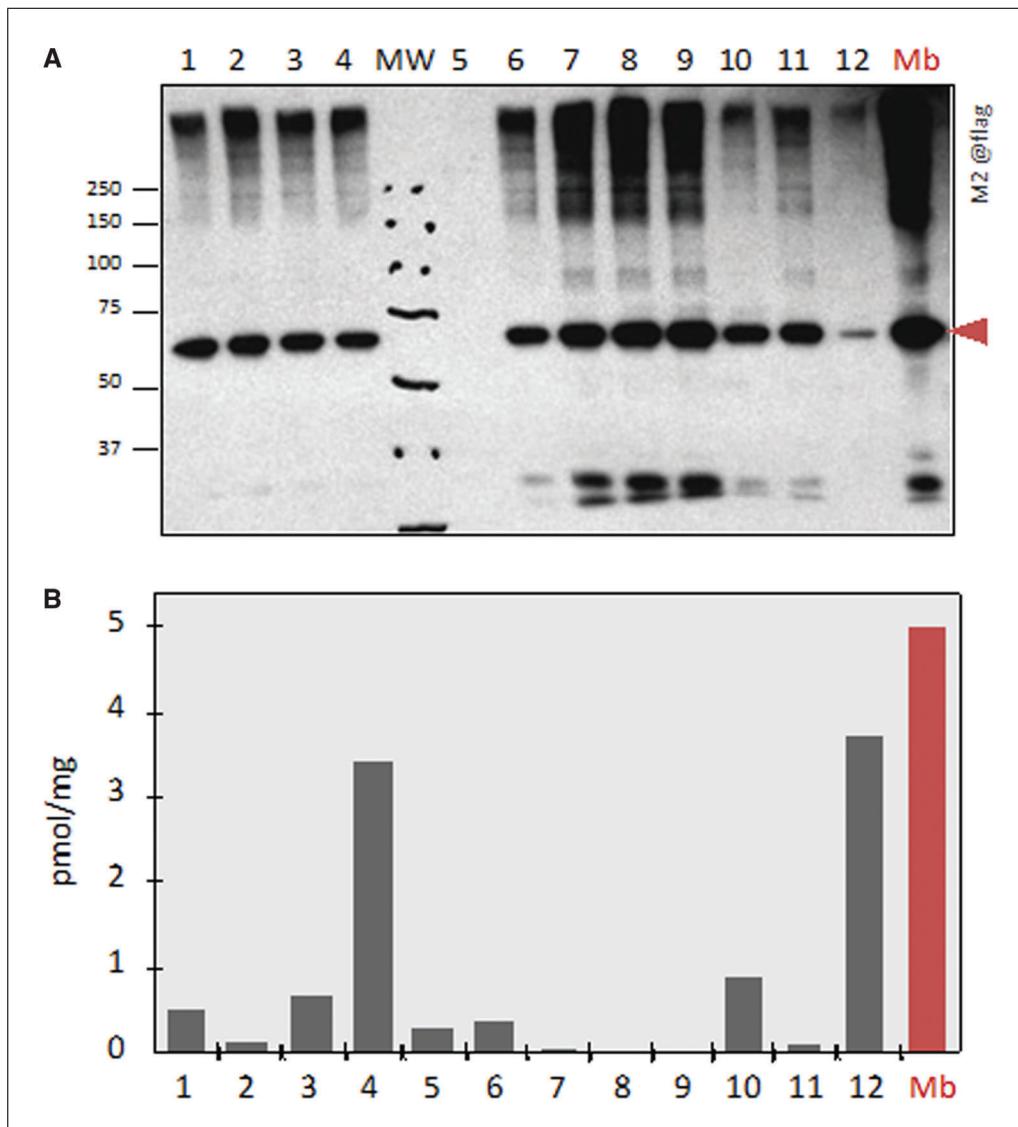


**Figure 1** Immunoblot analysis of a human 4TM cell surface receptor extracted with seven different detergents. Proteins were extracted with 2% (w/v) OG or 1% (w/v) of each other detergent. Equal volumes (15  $\mu$ l) of samples (S, supernatant; P, resuspended pellet) were loaded. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 10% (w/v) polyacrylamide gel and immunoblotted with a mouse penta-His antibody (1/1000 v/v; Qiagen, cat. no. 34660). The secondary antibody was donkey anti-mouse DyLight 800 (1/10,000 v/v; Euromedex, cat. no. A90-337D8). Molecular masses (kDa) are indicated on the left. The band corresponding to the immunodetected protein of interest is indicated by an arrow on the right. MW: Molecular weight; Mb: membrane; No det.: no detergent; OG: *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; OGNG: 2,2-dihexylpropane-1,3-bis- $\beta$ -D-glucopyranoside; DM: *n*-decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside; DDM: *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside; LMNG: 2,2-didecylpropane-1,3-bis- $\beta$ -D-maltopyranoside; Fos12, *n*-dodecylphosphocholine (Fos-choline 12); Fos14, *n*-tetradecylphosphocholine (Fos-choline 14).

Figure 2 illustrates the benefit of combining an immunodetection assay and an activity assay when selecting optimized solubilization conditions. *P. pastoris* membranes expressing the human ADRA2B GPCR were solubilized with a selection of twelve detergents, and the resulting solubilized fractions were analyzed by immunoblotting and a specific radioligand-binding assay. In this representative example, the most efficient extraction obtained with detergents from the Fos-choline series correlate with the complete loss of detectable activity, suggesting a strong denaturing effect from these molecules. On the other hand, the relatively low immunoblot signal observed with CHAPS corresponds to the highest amount of ligand binding to solubilized ADRA2B.

Guyot et al.

9 of 27



#### BASIC PROTOCOL 4

Guyot et al.

10 of 27

#### PURIFICATION OF MEMBRANE PROTEINS

Strategies for purification of membrane proteins are numerous and are roughly similar to those developed for soluble proteins. They rely mainly on fusion tag-based techniques and/or methods exploiting the intrinsic properties of the protein, and are detailed in several comprehensive reviews and book sections (Lórenz-Fonfría, Perálvarez-Marín, Padrós, & Lazarova, 2011; Pandey, Shin, Patterson, Liu, & Rainey, 2016; Smith, 2017). One main concern for IMPs is related to the presence of the solubilizing detergent, which may directly impact purification strategies and yields, and thus the choice of techniques

to use (or not use). For instance, tag sequences that are spatially too close to a transmembrane domain may be buried in the detergent micelle after solubilization, and thus be poorly accessible to the affinity chromatography support. Similarly, any ion exchange-based chromatography may be inefficient if the IMP of interest is solubilized with a charged detergent. The purpose of this section is not to list and detail the multitude of purification strategies and technique combinations available in the literature, especially because they are often tailored and optimized for each IMP of interest. Instead, we describe a simple and standard two-step purification protocol that we routinely apply as a first intention procedure, and that we refine further, if needed. It consists of an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) step exploiting the 10His tag N- or C-terminally fused to the recombinant IMP, followed by a size-exclusion chromatography (SEC) step.

The protocol starts with solubilization of the membrane preparation obtained in Basic Protocol 2. The relatively high concentration of detergent that is usually required at this step to efficiently destabilize membranes and extract IMPs can affect the folding and stability of proteins during purification and may interfere with the subsequent analyses. Therefore, the detergent concentration is usually decreased in the running buffers during purification. It is crucial, however, to maintain a minimum detergent concentration (above the CMC) during all purification steps to avoid micelle dissociation and protein precipitation. Furthermore, the addition of stabilizing compounds such as glycerol, specific ligands, or lipid derivatives during the purification process is often highly valuable.

When using IMAC resins, a number of options exists, including the choice of the immobilization approach (batch incubation or flowing through packed resins), the binding capacities and physicochemical properties of the resin (bead size and chemistry), the metal ions that are grafted ( $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$ ), and the elution strategy (linear gradient or fixed concentration steps of imidazole). Here again, the choices are important and are dependent on the protein itself, the objective sought, and the optimizations that can be achieved.

The following protocol is designed for automated purification on an FPLC instrument (e.g., ÄKTA Purifier or ÄKTA Pure, GE Healthcare), which is particularly crucial for the SEC step, where the flow rate and pressure need to be tightly controlled. In addition, because the volume of the solubilized sample is often quite significant (from 50 ml to several hundreds of ml when scaled up), the use of a sample pump connected to the FPLC instrument is highly recommended.

Here we present a typical protocol for routine purification of TRPV4, a tetrameric calcium channel that we extract and purify with the detergent LMNG in the presence of cholesteryl hemisuccinate (CHS) as a stabilizing compound.

## Materials

10 ml membrane preparation at  $\sim$ 10 mg/ml (see Basic Protocol 2)

Solubilization buffer S1 (see recipe)

Imidazole (Sigma-Aldrich, cat. no. I0250)

Buffer A1 (see recipe)

Buffer B1 (see recipe)

SEC running buffer GF1 (see recipe)

Tube rotator

Ultracentrifuge with appropriate fixed-angle rotor and ultracentrifuge bottles

0.22- $\mu\text{m}$  membrane filters and filter holder (e.g., Nalgene, cat. no. DS0320)

1-ml prepacked nickel affinity chromatography column (e.g., HisTrap HP, GE Healthcare, cat. no. 17524701)

Guyot et al.

11 of 27

SEC column (e.g., Superdex 200 Increase 10/300, GE Healthcare, cat. no. 28990944)

Automated FPLC purification system (e.g., ÄKTA Purifier, GE Healthcare)

Sample pump or superloop

Fraction collection tubes

Additional reagents and equipment for BCA assays and immunoblot analysis (see *Current Protocols* articles Olson & Markwell, 2007 [BCA]; Gallagher, 2012 [SDS-PAGE]; Goldman et al., 2015 [electrotransfer]; Bornert et al., 2012 [immunoblotting of expressed IMPs])

#### ***Solubilize membrane preparation***

1. Add 10 ml membrane preparation (~100 mg protein) to solubilization buffer S1 to give a final protein concentration of 2 mg/ml.
2. Incubate for 30 min at room temperature with gentle agitation.
3. Separate the solubilized fraction by ultracentrifuging for 30 min at 100,000  $\times g$  at 4°C.
4. Take a 50- $\mu$ l aliquot of solubilized IMPs (supernatant) and store at 4°C for further analyses.

#### ***Perform IMAC purification***

5. Add imidazole to solubilized IMPs at a final concentration of 25 mM.
6. Filter suspension using a 0.22- $\mu$ m membrane filter and keep on ice.
7. Equilibrate a 1-ml HisTrap HP column with at least 10 column volumes (CV) buffer A1 at 1 ml/min.

*The same flow rate is used in the following steps.*

8. Inject filtered solubilized IMPs onto the column using a sample pump or superloop, depending on the volume.
9. Wash with 10 CV buffer A1.
10. Wash with 10 CV of 30% buffer B1 (150 mM imidazole) and collect 500- $\mu$ l fractions.

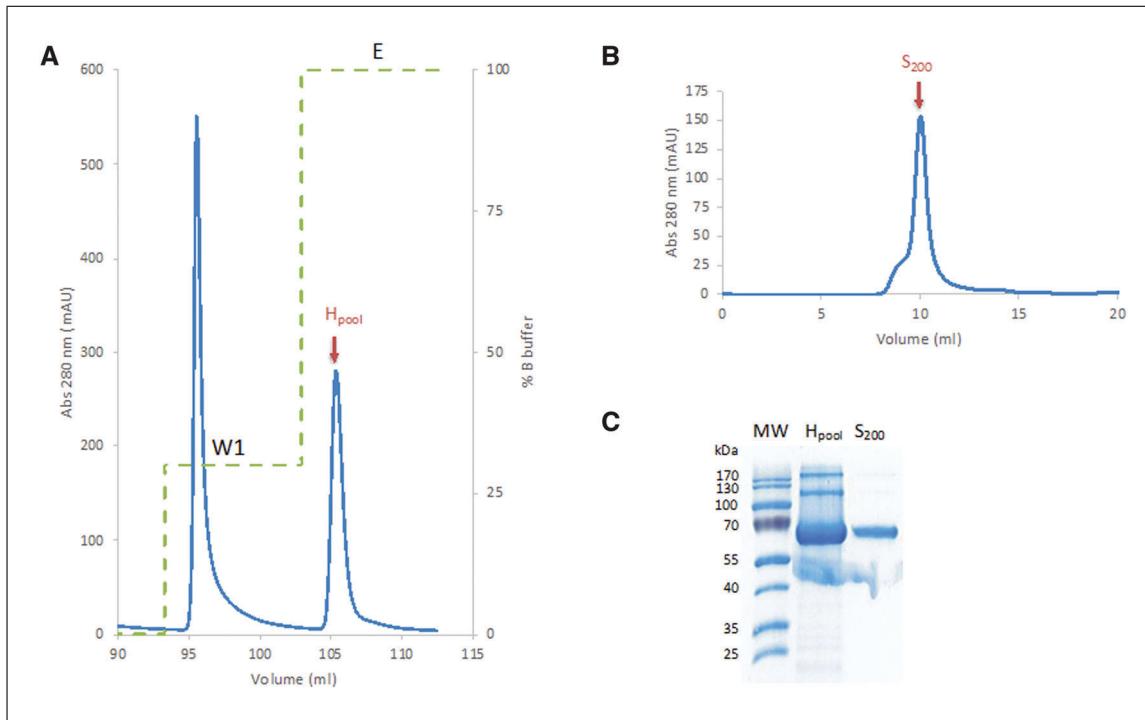
*The imidazole concentrations applied here and in the following step are optimized for purification of our TRPV4 construct. When setting up an IMP purification for the first time, we strongly recommend managing the elution by applying a linear gradient of imidazole (over 25 CV, for instance) before optimizing the procedure to a multistep scheme.*

11. Elute with 10 CV of 100% buffer B1 (500 mM imidazole) and collect 500- $\mu$ l fractions.
12. Take a 50- $\mu$ l aliquot from each fraction of interest and analyze by SDS-PAGE with Coomassie blue staining and by immunoblotting. Include the solubilized IMPs taken in step 4. Select the appropriate fraction(s) for further purification.

#### ***Perform SEC purification***

13. Equilibrate an SEC column with at least 2 CV SEC running buffer GF1 at 0.5 ml/min.
14. Inject the appropriate fraction(s) onto the column and run at a flow rate of 0.3 ml/min, collecting 500- $\mu$ l fractions.

*The maximum volume that can be injected on a Superdex 10/300 column is 500  $\mu$ l. If the volume of fractions from the IMAC step is greater, they can be concentrated with*



**Figure 3** Two-step purification of a TRPV4 ion channel. **(A)** IMAC profile obtained using a HisTrap HP column. The dashed trace represents the percentage of buffer B applied to the column. W1 (wash 1), 30% B, 150 mM imidazole; E (elution), 100% B, 500 mM imidazole. The fraction indicated with a red arrow was injected on the size-exclusion column. **(B)** SEC profile obtained on a Superdex 200 10-300 column. **(C)** SDS-PAGE with Coomassie Blue staining. Equal volumes (10  $\mu$ l) of analyzed fractions were loaded in each lane. MW, molecular weight markers with masses (kDa) indicated on the left; H<sub>pool</sub>, elution fractions from HisTrap HP; S<sub>200</sub>, elution fraction from Superdex 200.

appropriate centrifugal filters (e.g., Vivaspin concentrators from Sartorius or Amicon concentrators from Merck).

15. Take a 50- $\mu$ l aliquot from each fraction of interest and analyze as in step 12.

Figure 3 shows a typical purification profile for TRPV4 extracted from *P. pastoris* membranes using this protocol. The data exemplify an optimized two-step IMAC/SEC elution strategy that allows the separation of an almost pure and homogenous IMP.

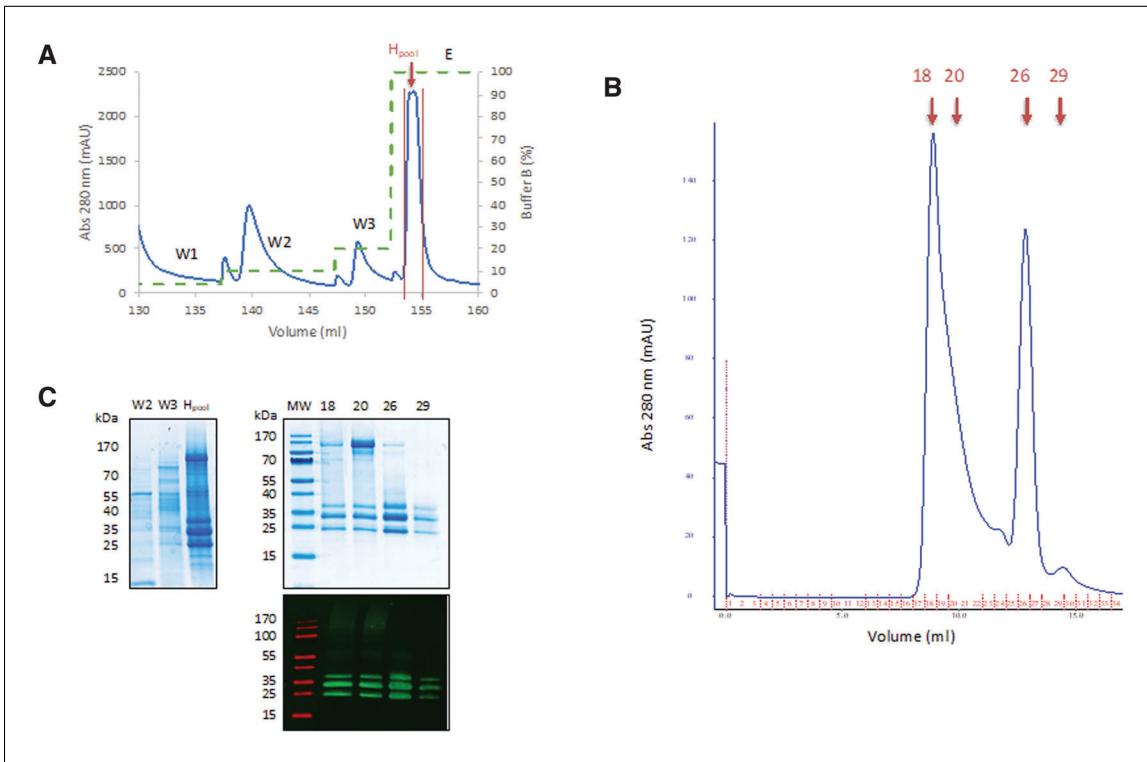
## PURIFICATION OF MEMBRANE PROTEINS FROM YEAST PROTOPLASTS

As mentioned in Alternate Protocol 1, the actual overexpression of IMPs with the *P. pastoris* system often yields properly folded, functional proteins and a variable proportion of their misfolded and/or aggregated counterparts that are stacked in the membranes of intracellular compartments. When preparing whole-membrane fractions for further solubilization and purification purposes, these different populations of IMPs are mixed together and are often co-purified in affinity chromatography approaches through the tag sequence they have in common. The subsequent SEC step then separates these different populations according to size, but sometimes with limited success due to co-elution effects or to amplified aggregation events during the purification process. In these cases, alternative methods are needed to better isolate these unwanted aggregates. During IMAC purification (see Basic Protocol 4), because the aggregated forms potentially interact more strongly with the resin support due to their higher number of tags, finely tuned differential elution strategies may prove useful, but are often challenging to set up.

Another valuable option requires applying the solubilizing detergent solution to protoplasts. Under these conditions, the detergent likely extracts IMPs according to

## ALTERNATE PROTOCOL 2

Guyot et al.



**Figure 4** Purification of a human TREK1 channel from *P. pastoris* protoplasts. **(A)** IMAC profile obtained with a HisTrap HP column. The dashed trace represents the percentage of buffer B applied to the column. W1 (wash 1), 20 mM imidazole; W2, 50 mM imidazole; W3, 100 mM imidazole; E (elution), 500 mM imidazole. Fractions between red lines were pooled ( $H_{pool}$ ), concentrated to 500  $\mu$ L, and injected on a size-exclusion column. **(B)** SEC profile of  $H_{pool}$  obtained on a Superdex 200 10-300 Increase column. Arrows indicate fractions that were further analyzed by SDS-PAGE. **(C)** SDS-PAGE (10% (w/v) polyacrylamide) with Coomassie Blue staining of representative fractions from IMAC and SEC. SEC fractions were also immunoblotted with an M2 anti-flag primary antibody (1/8000 v/v) and IRDye 800CW goat anti-mouse secondary antibody (1/10,000 v/v). MW, molecular weight markers with molecular masses (kDa) indicated on the left.

relative accessibility and in a kinetic mode, favoring solubilization of proteins located in the plasma membrane or in close proximity over those stacked in inner compartments. This method has been successfully applied to several eukaryotic (mainly human) IMPs we have expressed in *P. pastoris*, including GPCRs, ion channels, and enzymes (Hartmann, Metzger, Ottelard, & Wagner, 2017; Vasseur et al., 2019; unpublished data). This technique is much faster than standard cell lysis and membrane preparation procedures. In addition, a significantly reduced proportion of protein aggregates were released for several of the IMPs investigated.

The following protocol describes the extraction of an engineered version of the TREK1 potassium channel from yeast protoplasts and its subsequent purification under conditions similar to those in Basic Protocol 4.

#### Additional materials (also see Basic Protocol 4)

Yeast protoplast pellet (see Alternate Protocol 1)  
 Solubilization buffer S2 (see recipe)  
 Buffer A2 (see recipe)  
 Buffer B2 (see recipe)  
 SEC running buffer GF2 (see recipe)

1. Carefully resuspend freshly prepared yeast protoplasts in solubilization buffer S2 to reach a cell concentration of  $\sim$ 80 g/L.
2. Incubate 30 min at room temperature under very gentle agitation.

3. Ultracentrifuge for 30 min at 100,000  $\times$  *g*, 4°C.
4. Perform IMAC/SEC as described (see Basic Protocol 4, starting with step 4) with the following adjustments:
  - a. Equilibrate a HisTrap HP column with 4% buffer B2 (20 mM imidazole).
  - b. Successively wash with 10 CV of 4% buffer B2 (20 mM imidazole), 10 CV of 10% buffer B2 (50 mM imidazole), and 10 CV of 20% buffer B2 (100 mM imidazole).
  - c. Elute with 10 CV of 100% buffer B2 (500 mM imidazole).
  - d. Perform SEC using SEC running buffer GF2.

*Figure 4 illustrates the purification profile obtained for an engineered TREK1 channel. In this example, the purification procedure starting from yeast protoplasts helped us to significantly reduce the presence of aggregated channels compared to the standard protocol starting from whole membrane preparations. Further mass spectrometry and in vitro processing analyses performed on the final purified fraction (not shown here) reveal that the three different bands visible on the SDS-PAGE correspond to differentially glycosylated forms of the channel.*

## SIMULTANEOUS PROTOPLAST PREPARATION AND MEMBRANE SOLUBILIZATION FOR PURIFICATION OF MEMBRANE PROTEINS

### ALTERNATE PROTOCOL 3

The present protocol is a very convenient variation of Alternate Protocol 2 in which preparation of protoplasts and solubilization of IMPs are performed simultaneously. This method avoids manipulation of the delicate and easily breakable protoplasts prior to solubilization and reduces the time required for the whole purification process. It has proven very successful in our hands for several IMPs (unpublished work), and the procedure and results presented here for a 1TM human lipase are a typical illustration of its effectiveness. In this example, the serine hydrolase activity of the IMP is irreversibly inhibited by standard protease inhibitors, so their use is withheld during the purification process. The present strategy is further adapted to this enzyme as the short lapse of time between extraction and purification limits degradation events by proteases.

This particular example also provides a demonstrative illustration of how the choice of resin support may be helpful. To further prevent proteolysis events, we have found that adding 2 mM EDTA to the solubilization buffer is highly beneficial. Therefore, a special Ni Sepharose resin bearing a chemistry designed for minimized Ni leakage (i.e., HisTrap Excel, GE HealthCare) adapted well to this relatively high concentration of EDTA. Finally, a preparative-grade Superdex 200 column is used in the SEC step in order to accommodate the sample volume eluted from the HisTrap Excel.

#### ***Additional materials (also see Basic Protocol 4)***

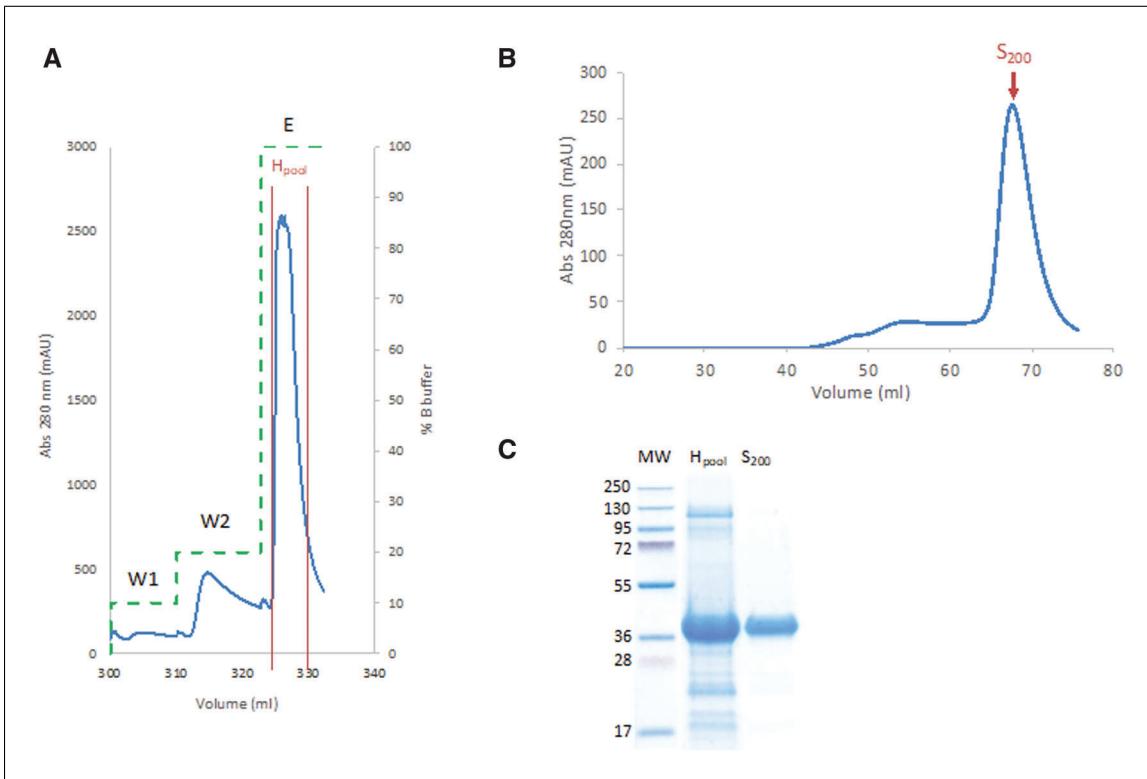
Yeast cell pellet (see Basic Protocol 1)  
Milli-Q-purified water  
SED buffer (see recipe)  
1 M sorbitol (Sigma-Aldrich, cat. no. S6021)  
Solubilization buffer S3 (see recipe)  
200 U/ml Zymolyase 20 T (Amsbio, ref. 120491-1)  
10% (w/v) DDM solution  
Buffer A3 (see recipe)  
Buffer B3 (see recipe)  
SEC running buffer GF3 (see recipe)

1-ml prepacked nickel affinity chromatography column (e.g., HisTrap Excel, GE Healthcare, cat. no. 17371205)

SEC column (e.g., HiLoad 16/600 Superdex 200 Increase PG, GE Healthcare, cat. no. 28989335)

**Guyot et al.**

**15 of 27**



**Figure 5** Purification profiles of a human lipase extracted from *P. pastoris* protoplasts. **(A)** IMAC profile obtained with a HisTrap Excel column with absorbance measured at 280 nm. The dashed trace represents the percentage of buffer B applied to the column. W1 (wash 1), 20 mM imidazole; W2, 50 mM imidazole; E (elution), 500 mM imidazole. Fractions between red lines were pooled and concentrated to 2 ml prior to injection on a size-exclusion column. **(B)** SEC profile obtained with a Superdex 200 HiLoad PG column. **(C)** SDS-PAGE with Coomassie Blue staining. Equal volumes (10  $\mu$ l) of membrane proteins were loaded in each lane. MW, molecular weight markers with molecular masses (kDa) indicated on the left. H<sub>pool</sub>, elution fractions from HisTrap HP; S<sub>200</sub>: elution fraction from Superdex 200.

1. Resuspend yeast cell pellet in 40 ml Milli-Q water.
2. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
3. Discard supernatant and wash pellet with 40 ml SED buffer.
4. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
5. Discard supernatant and wash pellet with 40 ml of 1 M sorbitol.
6. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4°C.
7. Discard supernatant and resuspend cell pellet in 40 ml solubilization buffer S3.
8. Place suspension in a standard bottle and gently agitate with a magnetic stirrer.
9. Add, in dropwise fashion, 10 U Zymolyase per gram of initial cell pellet.  
*The amount of Zymolyase and/or duration of digestion must be adjusted to the IMP of interest.*
10. Add, in dropwise fashion, DDM solution to reach a 1% final concentration.
11. Incubate for 30 min at room temperature under gentle agitation.
12. Ultracentrifuge for 30 min at  $100,000 \times g$ , 4°C.
13. Recover supernatant containing the solubilized fraction.
14. Perform IMAC/SEC as described (see Basic Protocol 4, starting from step 4) with the following adjustments:

- a. Equilibrate a 1-ml HisTrap Excel column with 4% buffer B3 (20 mM imidazole).
- b. Successively wash with 10 CV of 4% buffer B3 (20 mM imidazole), 10 CV of 10% buffer B3 (50 mM imidazole), and 10 CV of 20% buffer B3 (100 mM imidazole).
- c. Elute with 10 CV of 100% buffer B3 (500 mM imidazole).
- d. Perform SEC using a HiLoad 16/600 Superdex 200 column with SEC running buffer GF3.

*Figure 5 presents the classical IMAC, SEC, and SDS-PAGE profiles obtained for a human lipase enzyme purified with the present procedure. Of importance, only a very homogeneous peak of monomeric lipase is eluted from the SEC, whereas a significant additional population of multimeric/aggregated forms of the protein can be observed when starting from membrane preparations as described in Basic Protocol 4 (data not shown).*

## RECONSTITUTION OF DETERGENT-PURIFIED MEMBRANE PROTEINS IN LIPID NANOPARTICLES

### BASIC PROTOCOL 5

A common challenge regarding IMPs isolated in detergent is keeping them stable in solution for a reasonable period of time. Indeed, the hydrophobic environment engendered by detergents significantly differs from the one of lipids in native membranes. In general, the weaker hydrophobicity of detergents leads to more dynamic molecular interactions with the IMP's hydrophobic domains. This may result in looser packing of the protein, which in turn facilitates insertion of detergent within its hydrocarbon core. Overall, this combination of events contributes to the structural destabilization of IMPs and often to their denaturation (Chipot et al., 2018). In addition, during the manipulation of membrane proteins, detergents may co-concentrate with the protein and then amplify these phenomena. Strategies aimed at minimizing these instability issues are regularly reported, including the development of better-adapted detergents (Breyton et al., 2019, and references therein) and the engineering of more stable IMPs (deletion of unstructured and flexible regions of the protein, introduction of stabilizing point mutations or fusion sequences; Chun et al., 2012).

Alternatively, because the presence of free detergents and/or detergent micelles may also interfere with a number of techniques and assay formats, trapping purified IMPs in detergent-free lipid particles may prove highly beneficial for further analysis. A number of strategies have been developed for isolating IMPs in lipid-based membrane mimetics, including liposomes (Jørgensen, Kemmer, & Pomorski, 2017), disc-shaped structures such as bicelles (Dürr, Gildenberg, & Ramamoorthy, 2012), and lipid nanoparticles stabilized with styrene maleic acid co-polymers (Overduin & Klumperman, 2019) or with lipoproteins (Bayburt & Sligar, 2010; Frauenfeld et al., 2016). With different strengths and limitations, these approaches have proven successful for stabilizing various IMPs in aqueous solutions for a period of time compatible with a number of biochemical and biophysical investigations.

We here describe a protocol allowing recovery of lipoprotein nanoparticles containing the adenosine A2A receptor (AA2A), a prototypic class A GPCR. These so-called nanodiscs are obtained from a detergent-purified AA2A that, upon detergent removal, self-assembles within a lipid bilayer encircled by two amphipathic membrane scaffold proteins (MSPs).

### Materials

- 25 mg/ml 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC) in chloroform (Avanti Polar, cat. no. 850457C)
- 25 mg/ml 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG) in chloroform (Avanti Polar, cat. no. 840457C)

Guyot et al.

17 of 27

Argon (or nitrogen) gas  
Lipid resuspension buffer (see recipe)  
Membrane scaffold protein MSP1E3D1(–) (MSP) produced and purified as described in Denisov, Grinkova, Lazarides, and Sligar (2004) in 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA  
Detergent-purified AA2A (AA2A is produced as described in Basic Protocol 1; membranes are prepared as described in Basic Protocol 2; AA2A is purified as in Basic Protocol 3 using solubilizing buffer S4 [see recipe])  
Polystyrene Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad, cat. no. 1523920)  
Buffer A4 (see recipe)  
Buffer B4 (see recipe)  
SEC running buffer G4 (see recipe)

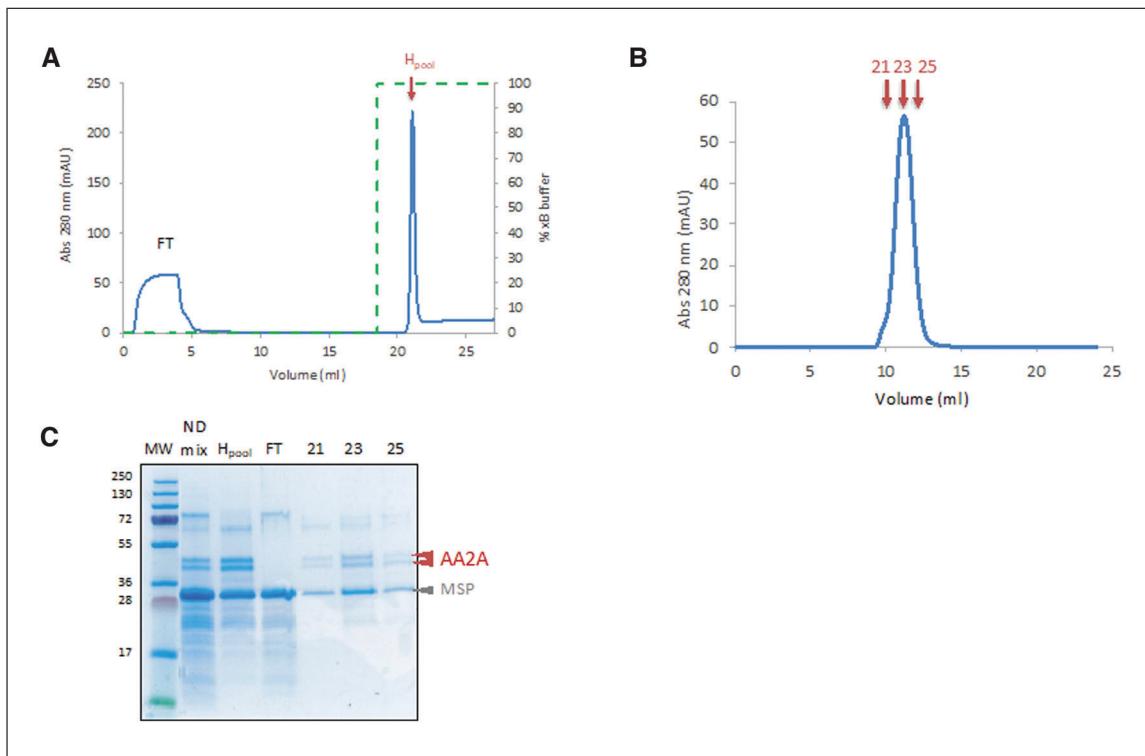
5-ml glass tube  
Vacuum desiccator  
Fritted glass support  
Benchtop tube rotator (e.g., RotoFlex tube rotator)  
Benchtop centrifuge

1. Mix POPC and POPG at a 3:2 molar ratio in a 5-ml glass tube.
2. Evaporate chloroform under an argon (or nitrogen) stream to form a lipid film at the bottom of the tube.
3. Let the lipid film dry thoroughly overnight in a vacuum desiccator.
4. Suspend the lipid mixture at a final concentration of 24 mM in lipid resuspension buffer. Allow mixture to hydrate above the transition temperature of the lipids (typically at room temperature) for 30-60 min with regular vortexing.
5. Add purified MSP to lipid suspension at a 1:70 MSP/lipid molar ratio and incubate on ice for 15 min.
6. Add detergent-purified AA2A receptor to the MSP/lipid mixture at a 1:10 AA2A/MSP molar ratio and incubate on ice for an additional 60 min.
7. Add 0.25 g dry Bio-Beads SM-2 per ml reconstitution mixture to initiate nanodisc self-assembly.

*Batches of dry Bio-Beads should be prepared in advance by three successive washes with 20 ml methanol, then deionized-water, followed by vacuum filtration on a fritted glass support.*

8. Incubate overnight at 4°C on a tube rotator.
9. Decant Bio-Beads by centrifuging briefly at 3000  $\times$  g, room temperature.
10. Carefully recover supernatant with a syringe and 0.8-mm gauge needle.
11. Proceed to IMAC/SEC purification as described (see Basic Protocol 4) using buffers A4 and B4 and SEC running buffer G4.

*Figure 6 illustrates the IMAC, SEC, and SDS-PAGE profiles that we typically obtain for isolation of AA2A-containing nanodiscs. Whereas the flowthrough (FT) fraction from IMAC purification contains mainly free MSP or empty nanodiscs, the eluted fractions correspond to homogeneous populations of AA2A-nanodiscs, as confirmed by SDS-PAGE and by negative staining EM analyses (not shown). The two bands observed for AA2A correspond to wild-type (upper band) and C-terminally truncated (lower band) populations of the receptor as determined by mass spectrometry analyses.*



**Figure 6** Purification of nanodisc-reconstituted human AA2A receptor. **(A)** IMAC elution profile of self-assembled nanodisc mixture (ND mix) on a HisTrap HP column. Elution was achieved with 500 mM imidazole (100% B buffer, dashed line). Eluted fractions were pooled ( $H_{pool}$ ), concentrated to 500  $\mu$ l, and injected on a size-exclusion column. **(B)** SEC profile obtained on a Superdex 200 10-300 Increase column. Fractions 21, 23, and 25 were further analyzed by SDS-PAGE. **(C)** SDS-PAGE with Coomassie Blue staining of representative fractions. MW, molecular weight markers with molecular masses (kDa) indicated on the left. FT: IMAC flowthrough.

## REAGENTS AND SOLUTIONS

**NOTE:** Except where noted below, all buffers should be prepared fresh before use. See Figures 1 and 2 for full names of detergents abbreviated below.

### BMGY medium

*For 1 L, prepare 700 ml YEP:*

10 g yeast extract (e.g., Formedium, cat. no. YEA03)

20 g peptone (e.g., Formedium, cat. no. PEP03)

Bring to 700 ml with deionized water

Sterilize by autoclaving

*Just before use add the following filter-sterilized stock solutions:*

100 ml 13.4% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids (10 $\times$ ; Formedium, cat. no. CYN0410)

100 ml 10% (v/v) glycerol (10 $\times$ ; Euromedex, cat. no. EU3550)

100 ml 1 M phosphate buffer, pH 6 (10 $\times$ )

*YEP and 10 $\times$  stock solutions can be stored up to 1-2 months at 4°C.*

### BMMY medium

Prepare as for BMGY medium (see recipe), but replace glycerol with 100 ml of 5% methanol (10 $\times$ ; Sigma-Aldrich, cat. no. 179957).

### Buffer A1 (TRPV4)

50 mM HEPES, pH 7.4

500 mM NaCl (Euromedex, cat. no. 1112-A)

Guyot et al.

19 of 27

0.05% (w/v) LMNG (Anatrace, cat. no. NG310)  
0.005% (w/v) CHS (Anatrace, cat. no. CH210)  
25 mM imidazole (Sigma-Aldrich, cat. no. I0250)

**Buffer A2 (TREK1)**

50 mM Tris-Cl, pH 7.4 (Euromedex, cat. no. 26-128-30-94-B)  
150 mM KCl (Euromedex, cat. no. P017-A)  
0.01% (w/v) DDM (Anatrace, cat. no. D310S)

**Buffer A3 (lipase)**

50 mM Tris-Cl, pH 7.4  
300 mM NaCl  
0.1% (w/v) DDM

**Buffer A4 (AA2A)**

50 mM HEPES, pH 7.4  
500 mM NaCl  
0.05% (w/v) DDM  
0.005% (w/v) CHS  
1  $\mu$ M DPCPX (Sigma-Aldrich, cat. no. C101)  
25 mM imidazole

**Buffer B1 (TRPV4)**

Prepare as for buffer A1 (see recipe), but increase imidazole to 500 mM.

**Buffer B2 (TREK1)**

Prepare as for buffer A2 (see recipe), but add 500 mM imidazole.

**Buffer B3 (lipase)**

Prepare as for buffer A3 (see recipe), but add 500 mM imidazole.

**Buffer B4 (AA2A)**

Prepare as for buffer A4 (see recipe), but add 500 mM imidazole.

**CG buffer**

20 mM trisodium citrate (Euromedex, cat. no. 1126), pH 5.8  
10% (v/v) glycerol  
Before use add 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, cat. no. P7626)

**Lipid resuspension buffer**

50 mM HEPES, pH 7.4  
150 mM NaCl  
48 mM sodium cholate (Sigma-Aldrich, cat. no. C6445)

**SEC running buffer GF1 (TRPV4)**

50 mM HEPES, pH 7.4  
150 mM NaCl  
0.05% (w/v) LMNG  
0.005% (w/v) CHS

**SEC running buffer GF2 (TREK1)**

50 mM Tris-Cl, pH 7.4  
150 mM KCl  
0.1% (w/v) DDM  
1 mM EDTA (Euromedex, cat. no. EU0007)

***SEC running buffer GF3 (lipase)***

50 mM Tris·Cl, pH 7.4  
300 mM NaCl  
0.1% (w/v) DDM

***SEC running buffer GF4 (AA2A)***

50 mM HEPES, pH 7.4  
150 mM NaCl  
0.02% (w/v) DDM  
0.002% (w/v) CHS  
1 µM DPCPX

***SED buffer***

1 M sorbitol (Sigma-Aldrich, cat. no. S6021)  
25 mM EDTA  
Before use, add 50 mM DTT (Euromedex, cat. no. EU00006-D)

***Solubilization buffer S0***

50 mM Tris·Cl, pH 7.4  
500 mM NaCl  
1 mM EDTA

***Solubilization buffer S1 (TRPV4)***

50 mM HEPES, pH 7.4  
500 mM NaCl  
0.5% (w/v) LMNG  
0.05% (w/v) CHS  
0.3 mM EDTA  
Protease inhibitor cocktail (Roche cOmplete Ultra Tablets, Sigma-Aldrich, cat. no. 6538282001; one tablet per 50 ml solubilization volume)

***Solubilization buffer S2 (TREK1)***

50 mM Tris·Cl, pH 7.4  
500 mM KCl  
10% (v/v) glycerol  
1% (w/v) DDM  
20 mM imidazole  
Protease inhibitor cocktail (one tablet per 50 ml solubilization volume)

***Solubilization buffer S3 (lipase)***

50 mM Tris·Cl, pH 7.4  
300 mM NaCl  
10% (v/v) glycerol  
1% (w/v) DDM  
2 mM EDTA

***Solubilization buffer S4 (AA2A)***

50 mM HEPES, pH 7.4  
500 mM NaCl  
0.5% (w/v) DDM  
0.05% (w/v) CHS  
0.3 mM EDTA  
1 µM DPCPX  
Protease inhibitor cocktail (one tablet per 50 ml solubilization volume)

### **TNG buffer**

50 mM Tris-Cl, pH 7.4  
0.5 M NaCl  
1 mM PMSF  
10% (v/v) glycerol  
Prepare fresh

### **TNGE buffer**

Prepare as for TNG buffer (see recipe), but add 1 mM EDTA.

### **YPD agar plates**

Dissolve 70 g YPD agar (e.g., Formedium, cat. no. CCM0110) in water to give a final volume of 1 L. Autoclave to sterilize. Allow solution to cool to  $\sim 50^{\circ}\text{C}$  and pour into Petri dishes using sterile technique. Store up to 1 month at  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **COMMENTARY**

### **Background Information**

IMPs comprise about one third of all proteomes, where they are in charge of vital functions for cell life, including fluxes of solutes and information, energy conversion, enzymatic activities, cell shape and integrity, and intra- and intercellular contacts and communication. As key players in these essential physiological processes, they are also involved in a large number of associated disorders, and they consistently represent the largest class of targets for the pharmaceutical industry, representing more than 60% of commercialized drugs (Santos et al., 2017). In this context, obtaining a detailed understanding of how IMPs function at the molecular level is crucial for both fundamental knowledge and biomedical applications. Such investigations are complicated, however, by the low abundance of IMPs in native membranes, necessitating effective recombinant expression systems to generate the amounts of biological material required for these studies. Over the years, *P. pastoris* has proven to be one of these best-performing systems, not only for the wide number of eukaryotic IMPs that have been successfully produced with this host, but also because these IMPs are representative of a large panel of membrane functions from different organisms, of various membrane-spanning topologies and protein sizes, and of diverse molecular assemblies, including heteromultimeric protein complexes (Alkhalfioui et al., 2011, and references therein).

Applying preparative procedures similar to those described in this article, a large number of IMPs can be extracted from *P. pastoris* membranes and isolated in quantity and quality levels compatible with thorough characterization at the molecular level. A rapid, far-

from-exhaustive survey of literature from the last decade retrieved an abundance of information on a variety of IMPs produced under these conditions, covering screening and functional characterization of compounds (Dekkik-Shalaly et al., 2015; Ignet et al., 2018; Logez et al., 2014; Scalise et al., 2014; Westh Hansen et al., 2016; Wöhri et al., 2013; Zehnpfenning, Wiriyasermkul, Carlson, & Quick, 2015; Zollmann et al., 2015); interactions with and regulation by proteins (Bornert et al., 2013; Damian et al., 2018; Doshi et al., 2017; Rosell et al., 2014) and lipids (Brohawn, Su, & MacKinnon, 2014; Schölz et al., 2011); functional impact of critical mutations (Ampah-Korsah et al., 2017; Christenson, Gallegos, & Banerjee, 2018; Kapri-Pardes et al., 2011; Yang et al., 2017); as well as structural insights and mechanistic details observed at the atomic level (Deng et al., 2018; Eddy et al., 2018; Fan, Shi, Ladizhansky, & Brown, 2011; Garaeva, Guskov, Slotboom, & Paulino, 2019; Hino et al., 2012; Kodan et al., 2014; Lolicato et al., 2017; Vinothkumar, Montgomery, Liu, & Walker, 2016; Wang, Schoebel, Schmitz, Dong, & Hedfalk, 2020; Wang, Touhara, Weir, Bean, & MacKinnon, 2016; Ye et al., 2018). The wealth of data described in these papers was obtained from investigations involving a wide array of biochemical and biophysical techniques and analyses. These include radiometric and fluorescent assays in various formats, thermal shift assays, circular dichroism spectroscopy, isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry, electrophysiology, surface plasmon resonance, frontal affinity chromatography, mass spectrometry in native and denaturing conditions, transmission electron microscopy, cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and

solid- and solution-state NMR with various probes and formats. Overall, this diversity of studies and their major achievements highlight the strong potential of IMP samples generated from *P. pastoris* membranes, as well as the flexibility of the preparative procedures to comply with various demanding applications and their specific technical requirements.

### Critical Parameters and Troubleshooting

A number of technical parameters and hints are specifically presented within each of the protocols, together with some anticipated results. Following are additional general guidelines and recommendations that may be helpful for readers.

As indicated in the protocols and their illustrative figure examples, each step from overexpression to extraction and purification is a protein-dependent exercise. In addition, the formulation and quality/grade requirements for each generated sample vary with the type of biochemical and/or biophysical analyses planned. Accordingly, the parameters that are critical for the preparation of one given IMP for a given study are rarely transposable to another IMP and must be determined on a case-by-case basis.

Whatever the IMP, the main issue is the ability to properly assess the quality of samples at every step of the production and preparation process: while yield is often a serious concern for a number of biochemical or biophysical investigations, proper folding of functional IMPs is obviously a requisite. Whenever possible, this characterization should be achieved with a specific activity assay that provides information on both the yield and functionality of the IMP. Such tests are highly beneficial, not only to monitor the production of functional IMPs (André et al., 2006; Singh et al., 2012a,b; Logez et al., 2014; Vasseur et al., 2019), but also to help optimize subsequent extraction and purification procedures. As mentioned and exemplified in Basic Protocol 3, this may be particularly valuable when screening for solubilizing detergents and conditions. In an illustrative study, a ligand-binding assay was notably key to the identification of a particular Fos14/CHAPS detergent mixture that allowed extraction and maintenance of the human melatonin MT1 receptor in an active form (Logez et al., 2014). Similarly, specific activity assays are a means of choice to evaluate the stability of IMP in solution. As an example, a time-resolved scintillation proximity assay was developed

in a comparative analysis of the human kappa opioid receptor solubilized in various environments, and showed that receptor stability was dramatically improved in nanodiscs compared to detergent (West Hansen et al., 2016).

For many IMPs, however, activity assays are not readily available, or at least not at every step of the process. This is typically the situation, for example, for transporters or ion channels, which require structured compartmentation to assess their functionality. In this case, activity is evaluated only after the reconstitution of IMPs in lipid vesicles or planar bilayers (Brohawn et al., 2014; Christensen et al., 2018; Wang et al., 2016; Zollmann et al., 2015), and other quality control criteria are performed during the preceding extraction and purification steps. These criteria, which should be investigated for any recombinant IMP, include evaluation of the purity, integrity, and homogeneity of the samples and are measured by a number of suitable techniques, such as denaturing and native electrophoresis, size-exclusion chromatography, UV-visible spectroscopy, mass spectrometry, dynamic light scattering, circular dichroism, transmission electron microscopy, and more.

### Time Considerations

The development of a complete procedure leading to the production and isolation of a functional membrane protein in solution is usually not a straightforward process. As already stated, it is always protein-dependent and may vary from few weeks to several months, with often no guarantee of success.

That said, once the parameters for production, solubilization, and purification are set and validated, obtaining pure protein in solution is not very time consuming. In a typical scheme, the whole procedure may be planned as follows:

#### **IMP production**

Starting from a freshly streaked colony, preculture is begun at the end of Day 1, methanol induction is carried out on Day 2, and yeast cells are collected on Day 3. Cell pellets can be processed directly or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for several months before the membrane preparation step.

#### **Membrane preparation**

The equivalent of 1 to 5 L of culture can be easily processed, including determination of protein concentration, in a single day (Day 4). Membrane preparations can be stored at

–80°C for several months and do not need to be prepared fresh prior to protein extraction and purification.

#### **IMP extraction and purification**

Once proteins are extracted from the membrane, all subsequent steps should be performed as quickly as possible and without interruption. Starting from membrane preparations (Basic Protocol 4) or yeast cells (Alternate Protocol 2 or 3), the extraction and purification of IMPs under the conditions described requires one day (Day 5). Analyses are performed on the following day (Day 6).

#### **IMP reconstitution in lipid nanodiscs**

Nanodisc self-assembly is usually performed overnight immediately following extraction and purification (end of Day 5). Nanodiscs are purified and analyzed the following after (Day 6).

Overall, the minimal amount of time required to produce, prepare, and isolate recombinant IMPs from a yeast clone is approximately 2 weeks.

#### **Acknowledgments**

The authors are supported by the CNRS and the University of Strasbourg, and by a grant to LG from the French Association Nationale Recherche Technologie (ANRT, CIFRE N°2018/1643).

#### **Literature Cited**

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Alkhalfioui, F., Logez, C., Bornert, O., & Wagner, R. (2011). Expression systems: *Pichia pastoris*. In A. S. Robinson (Ed.), *Production of membrane proteins—Strategies for expression and isolation* (pp. 75–108). Weinheim: Wiley-VCH.
- Ampah-Korsah, H., Sonntag, Y., Engfors, A., Kirscht, A., Kjellbom, P., & Johanson, U. (2017). Single amino acid substitutions in the selectivity filter render NbXIP1;1 $\alpha$ ; aquaporin water permeable. *BMC Plant Biology*, 17, 61. doi: 10.1186/s12870-017-1009-3.
- André, N., Cherouati, N., Prual, C., Steffan, T., Zeder-Lutz, G., Magnin, T., ... Reinhart, C. (2006). Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Science*, 15, 1115–1126. doi: 10.1110/ps.062098206.
- Bada Juarez, J. F., Harper, A. J., Judge, P. J., Tonge, S. R., & Watts, A. (2019). From polymer chemistry to structural biology: The development of SMA and related amphipathic polymers for membrane protein extraction and solubilisation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 221, 167–175. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.03.008.
- Bayburt, T. H., & Sligar, S. G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Letters*, 584, 1721–1727. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.024.
- Bornert, O., Alkhalfioui, F., Logez, C., & Wagner, R. (2012). Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris*. *Current Protocols in Protein Science*, 67, 29.2.1–29.2.24. doi: 10.1002/0471140864.ps2902s67.
- Bornert, O., Møller, T. C., Boeuf, J., Candusso, M. P., Wagner, R., Martinez, K. L., & Simonin, F. (2013). Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One*, 8, e56336. doi: 10.1371/journal.pone.0056336.
- Breyton, C., Javed, W., Vermot, A., Arnaud, C. A., Hajjar, C., Dupuy, J., ... Ebel, C. (2019). Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes*, 1861, 939–957. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.02.003.
- Brohawn, S. G., Su, Z., & MacKinnon, R. (2014). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K<sup>+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 3614–3619. doi: 10.1073/pnas.1320768111.
- Buck, T. M., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Adelman, J. L., Needham, P. G., Kleyman, T. R., & Brodsky, J. L. (2015). Expression of three topologically distinct membrane proteins elicits unique stress response pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiological Genomics*, 47, 198–214. doi: 10.1152/physiolgenomics.00101.2014.
- Cabib, E., & Arroyo, J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: Chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 648–655. doi: 10.1038/nrmicro3090.
- Champeil, P., Orlowski, S., Babin, S., Lund, S., le Maire, M., Møller, J., ... Montigny, C. (2016). A robust method to screen detergents for membrane protein stabilization, revisited. *Analytical Biochemistry*, 511, 31–35. doi: 10.1016/j.ab.2016.07.017.
- Chipot, C., Dehez, F., Schnell, J. R., Zitzmann, N., Pebay-Peyroula, E., Catoire, L. J., ... Schanda, P. (2018). Perturbations of native membrane protein structure in alkyl phosphocholine detergents: A critical assessment of NMR and biophysical studies. *Chemical Reviews*, 118, 3559–3607. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00570.
- Christenson, E. T., Gallegos, A. S., & Banerjee, A. (2018). *In vitro* reconstitution, functional dissection, and mutational analysis of metal ion transport by mitoferrin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 3819–3828. doi: 10.1074/jbc.M117.817478.

- Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W., Roth, C. B., Griffith, M. T., Katritch, V., ... Stevens, R. C. (2012). Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*, *20*, 967–976. doi: 10.1016/j.str.2012.04.010.
- Damian, M., Pons, V., Renault, P., M'Kadmi, C., Delort, B., Hartmann, L., ... Banères, J. L. (2018). GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*, 4501–4506. doi: 10.1073/pnas.1712725115.
- Dekki-Shalaly, N. D., Aneiros, E., Blank, M., Mueller, J., Nyman, E., Blind, M., ... Sandberg, K. (2015). Positive modulation of the glycine receptor by means of glycine receptor-binding aptamers. *Journal of Biomolecular Screening*, *20*, 1112–1123. doi: 10.1177/1087057115590575.
- Deng, Z., Paknejad, N., Maksaei, G., Sala-Rabanal, M., Nichols, C. G., Hite, R. K., & Yuan, P. (2018). Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, *25*, 252–260. doi: 10.1038/s41594-018-0037-5.
- Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A., & Sligar, S. G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *Journal of the American Chemical Society*, *126*, 3477–3348. doi: 10.1021/ja0393574.
- Doshi, R., McGrath, A. P., Piñeros, M., Szewczyk, P., Garza, D. M., Kochian, L. V., & Chang, G. (2017). Functional characterization and discovery of modulators of SbMATE, the agriculturally important aluminium tolerance transporter from Sorghum bicolor. *Scientific Reports*, *7*, 17996. doi: 10.1038/s41598-017-18146-8.
- Duquesne, K., Prima, V., & Sturgis, J. N. (2016). Membrane protein solubilization and composition of protein detergent complexes. *Methods in Molecular Biology*, *1432*, 243–260. doi: 10.1007/978-1-4939-3637-3\_15.
- Dürr, U. H. N., Gildenberg, M., & Ramamoorthy, A. (2012). The magic of bicelles lights up membrane protein structure. *Chemical Reviews*, *112*, 6054–6074. doi: 10.1021/cr300061w.
- Eddy, M. T., Gao, Z. G., Mannes, P., Patel, N., Jacobson, K. A., Katritch, V., ... Wüthrich, K. (2018). Extrinsic tryptophans as NMR probes of allosteric coupling in membrane proteins: Application to the A2A adenosine receptor. *Journal of the American Chemical Society*, *140*, 8228–8235. doi: 10.1021/jacs.8b03805.
- Fan, Y., Shi, L., Ladizhansky, V., & Brown, L. S. (2011). Uniform isotope labeling of a eukaryotic seven-transmembrane helical protein in yeast enables high-resolution solid-state NMR studies in the lipid environment. *Journal of Biomolecular NMR*, *49*, 151–161. doi: 10.1007/s10858-011-9473-9.
- Fischer, J. E., & Glieder, A. (2019). Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, *59*, 175–181. doi: 10.1016/j.copbio.2019.06.002.
- Frauenfeld, J., Löving, R., Armache, J.-P., Sonnen, A. F.-P., Guettou, F., Moberg, P., ... Nordlund, P. (2016). A saposin-lipoprotein nanoparticle system for membrane proteins. *Nature Methods*, *13*, 345–351. doi: 10.1038/nmeth.3801.
- Gallagher, S. R. (2012). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols in Protein Science*, *68*, 10.1.1–10.1.44. doi: 10.1002/0471140864.ps1001s68.
- Garaeva, A. A., Guskov, A., Slotboom, D. J., & Paulino, C. (2019). A one-gate elevator mechanism for the human neutral amino acid transporter ASCT2. *Nature Communications*, *10*, 3427. doi: 10.1038/s41467-019-11363-x.
- Gasser, B., & Mattanovich, D. (2018). A yeast for all seasons—Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? *FEMS Microbiology Letters*, *365*, fny181. doi: 10.1093/femsle/fny181.
- Goldman, A., Ursitti, J. A., Mozdzanowski, J., & Speicher, D. W. (2015). Electroblotting from polyacrylamide gels. *Current Protocols in Protein Science*, *82*, 10.7.1–10.7.16. doi: 10.1002/0471140864.ps1007s82.
- Hartmann, L., Kugler, V., & Wagner, R. (2016). Expression of eukaryotic membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology*, *1432*, 143–162. doi: 10.1007/978-1-4939-3637-3\_10.
- Hartmann, L., Metzger, E., Ottelard, N., & Wagner, R. (2017). Direct extraction and purification of recombinant membrane proteins from *Pichia pastoris* protoplasts. *Methods in Molecular Biology*, *1638*, 45–56. doi: 10.1007/978-1-4939-7151-0\_3.
- Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., ... Murata, T. (2012). G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature*, *482*, 237–240. doi: 10.1038/nature10750.
- Igonet, S., Raingeval, C., Cecon, E., Pučić-Baković, M., Lauc, G., Cala, O., ... Jawhari, A. (2018). Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR: A case study of adenosine receptor. *Scientific Reports*, *8*, 8142. doi: 10.1038/s41598-018-26113-0.
- Jørgensen, I. L., Kemmer, G. C., & Pomorski, T. G. (2017). Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: A review on current techniques. *European Biophysics Journal*, *46*, 103–119. doi: 10.1007/s00249-016-1155-9.
- Kapri-Pardes, E., Katz, A., Haviv, H., Mahmmoud, Y., Ilan, M., Khalfin-Penigel, I., ... Karlish, S. J. (2011). Stabilization of the  $\alpha 2$  isoform of Na,K-ATPase by mutations in a phospholipid binding pocket. *Journal of Biological Chemistry*, *286*, 42888–42899. doi: 10.1074/jbc.M111.293852.
- Kodan, A., Yamaguchi, T., Nakatsu, T., Sakiyama, K., Hipolito, C. J., Fujioka, A., ... Kato, H. (2014). Structural basis for gating mechanisms

- of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 4049–4054. doi: 10.1073/pnas.1321562111.
- Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subrahmanyam, U. K. T., Günther, C., ... Garcia-Alai, M. M. (2019). High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Scientific Reports*, 9, 10379. doi: 10.1038/s41598-019-46686-8.
- Liu, W. C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L. Y., & Zhu, P. (2019). Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39, 258–271. doi: 10.1080/07388551.2018.1554620.
- Logez, C., Alkhalioui, F., Byrne, B., & Wagner, R. (2012). Preparation of *Pichia pastoris* expression plasmids. *Methods in Molecular Biology*, 866, 25–40. doi: 10.1007/978-1-61779-770-5\_3.
- Logez, C., Berger, S., Legros, C., Banères, J.-L., Cohen, W., Delagrange, P., ... Wagner, R. (2014). Recombinant human melatonin receptor MT1 isolated in mixed detergents shows pharmacology similar to that in mammalian cell membranes. *PLoS One*, 9, e100616. doi: 10.1371/journal.pone.0100616.
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A., & Minor, D. L. Jr (2017). K<sub>2P</sub>2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature*, 547, 364–368. doi: 10.1038/nature22988.
- Lórenz-Fonfría, V., Perálvarez-Marín, A., Padrós, E., & Lazarova, T. (2011). Solubilization, purification, and characterization of integral membrane proteins. In A. S. Robinson (Ed.), *Production of membrane proteins—Strategies for expression and isolation* (pp. 317–360). Weinheim: Wiley-VCH.
- Love, K. R., Dalvie, N. C., & Love, J. C. (2018). The yeast stands alone: The future of protein biologic production. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 50–58. doi: 10.1016/j.copbio.2017.12.010.
- Macaulay-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, 249–270. doi: 10.1002/yea.1208.
- Mattanovich, D., Sauer, M., & Gasser, B. (2014). Yeast biotechnology: Teaching the old dog new tricks. *Microbial Cell Factories*, 13, 34. doi: 10.1186/1475-2859-13-34.
- Olson, B. J., & Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 48, 3.4.1–3.4.29. doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48.
- Overduin, M., & Klumperman, B. (2019). Advancing membrane biology with poly(styrene-co-maleic acid)-based native nanodiscs. *European Polymer Journal*, 110, 63–68. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.11.015.
- Pandey, A., Shin, K., Patterson, R. E., Liu, X. Q., & Rainey, J. K. (2016). Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology. *Biochemistry and Cell Biology*, 94, 507–527. doi: 10.1139/bcb-2015-0143.
- Rosell, A., Meury, M., Álvarez-Marimon, E., Costa, M., Pérez-Cano, L., Zorzano, A., ... Fotiadis, D. (2014). Structural bases for the interaction and stabilization of the human amino acid transporter LAT2 with its ancillary protein 4F2hc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 2966–2971. doi: 10.1073/pnas.1323779111.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., ... Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 19–34. doi: 10.1038/nrd.2016.230.
- Scalise, M., Pochini, L., Panni, S., Pingitore, P., Hedfalk, K., & Indiveri, C. (2014). Transport mechanism and regulatory properties of the human amino acid transporter ASCT2 (SLC1A5). *Amino Acids*, 46, 2463–2475. doi: 10.1007/s00726-014-1808-x.
- Schlebach, J. P., & Sanders, C. R. (2015). The safety dance: Biophysics of membrane protein folding and misfolding in a cellular context. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44, 1–34. doi: 10.1017/S0033583514000110.
- Schölz, C., Parcej, D., Ejsing, C. S., Robenek, H., Urbatsch, I. L., & Tampé, R. (2011). Specific lipids modulate the transporter associated with antigen processing (TAP). *Journal of Biological Chemistry*, 286, 13346–13356. doi: 10.1074/jbc.M110.216416.
- Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 105–117. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
- Singh, S., Gras, A., Fiez-Vandal, C., Martinez, M., Wagner, R., & Byrne, B. (2012a). Screening for high-yielding *Pichia pastoris* clones: The production of G protein-coupled receptors as a case study. *Methods in Molecular Biology*, 866, 65–73. doi: 10.1007/978-1-61779-770-5\_7.
- Singh, S., Gras, A., Fiez-Vandal, C., Martinez, M., Wagner, R., & Byrne, B. (2012b). Large-scale production of membrane proteins in *Pichia pastoris*: The production of G protein-coupled receptors as a case study. *Methods in Molecular Biology*, 866, 197–207. doi: 10.1007/978-1-61779-770-5\_17.
- Smith, S. M. (2017). Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1485, 389–400. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3\_21.
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, 118–134. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.027.

- Tate, C. G. (2010). Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation. *Methods in Molecular Biology*, 601, 187–203. doi: 10.1007/978-1-60761-344-2\_12.
- Vasseur, L., Cens, T., Wagner, R., Saint, N., Kugler, V., Chavanieu, A., ... Boutin, J. A. (2019). Importance of the choice of a recombinant system to produce large amounts of functional membrane protein hERG. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, E3181. doi: 10.3390/ijms20133181.
- Vinothkumar, K. R., Montgomery, M. G., Liu, S., & Walker, J. E. (2016). Structure of the mitochondrial ATP synthase from *Pichia angusta* determined by electron cryo-microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 12709–12714. doi: 10.1073/pnas.1615902113.
- Vogl, T., Thallinger, G. G., Zellnig, G., Drew, D., Cregg, J. M., Glieder, A., & Freigassner, M. (2014). Towards improved membrane protein production in *Pichia pastoris*: General and specific transcriptional response to membrane protein overexpression. *New Biotechnology*, 31, 538–552. doi: 10.1016/j.nbt.2014.02.009.
- von Hagen, J., & Michelsen, U. (2013). Cellular fractionation—Yeast cells. *Methods in Enzymology*, 533, 31–39. doi: 10.1016/B978-0-12-420067-8.00004-0.
- Wang, H., Schoebel, S., Schmitz, F., Dong, H., & Hedfalk, K. (2020). Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes*, 1862, 183065. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183065.
- Wang, W., Touhara, K. K., Weir, K., Bean, B. P., & MacKinnon, R. (2016). Cooperative regulation by G proteins and Na(+) of neuronal GIRK2 K(+) channels. *eLife*, 5, E15751. doi: 10.7554/eLife.15751.
- Westh Hansen, R., Wang, X., Golab, A., Bornert, O., Oswald, C., Wagner, R., & Martinez, K. L. (2016). Functional stability of the human kappa opioid receptor reconstituted in nanodiscs revealed by a time-resolved scintillation proximity assay. *PLoS One*, 11, e0150658. doi: 10.1371/journal.pone.0150658.
- Wöhri, A. B., Hillertz, P., Eriksson, P.-O., Meuller, J., Dekker, N., & Snijder, A. (2013). Thermodynamic studies of ligand binding to the human homopentameric glycine receptor using isothermal titration calorimetry. *Molecular Membrane Biology*, 30, 169–183. doi: 10.3109/09687688.2012.696733.
- Yang, Z., Zhou, Q., Mok, L., Singh, A., Swartz, D. J., Urbatsch, I. L., & Brouillette, C. G. (2017). Interactions and cooperativity between P-glycoprotein structural domains determined by thermal unfolding provides insights into its solution structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes*, 1859, 48–60. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.10.009.
- Ye, L., Neale, C., Sljoka, A., Lyda, B., Pichugin, D., Tsuchimura, N., ... Prosser, R. S. (2018). Mechanistic insights into allosteric regulation of the A<sub>2A</sub> adenosine G protein-coupled receptor by physiological cations. *Nature Communications*, 9(1), 1372. doi: 10.1038/s41467-018-03314-9.
- Zehnpenning, B., Wiriayasermkul, P., Carlson, D. A., & Quick, M. (2015). Interaction of α-lipoic acid with the human Na<sup>+</sup>/multivitamin transporter (hSMVT). *Journal of Biological Chemistry*, 290, 16372–16382. doi: 10.1074/jbc.M114.622555.
- Zhu, T., Sun, H., Wang, M., & Li, Y. (2019). *Pichia pastoris* as a versatile cell factory for the production of industrial enzymes and chemicals: Current status and future perspectives. *Biotechnology Journal*, 14, e1800694. doi: 10.1002/biot.201800694.
- Zollmann, T., Moiset, G., Tumulka, F., Tampé, R., Poolman, B., & Abele, R. (2015). Single liposome analysis of peptide translocation by the ABC transporter TAPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 2046–2051. doi: 10.1073/pnas.1418100112.





## Publication 2.

Production and preparation of isotopically labelled human membrane proteins in *Pichia pastoris* for Fast-MAS-NMR analyses

Barret L., Schubeis T., Kugler V., Guyot L., Pintacuda G., Wagner R.

*Methods in Molecular Biology*, sous presse

# Chapter 11

1

## Production and Preparation of Isotopically Labeled Human Membrane Proteins in *Pichia pastoris* for Fast-MAS-NMR Analyses

2

3

4

Lina Barret, Tobias Schubeis, Valérie Kugler, Lucile Guyot, Guido Pintacuda, and Renaud Wagner

5

AU1

6

### Abstract

7

Membrane proteins (MPs) comprise about one-third of the human proteome, playing critical roles in many physiological processes and associated disorders. Consistently, they represent one of the largest classes of targets for the pharmaceutical industry. Their study at the molecular level is however particularly challenging, resulting in a severe lack of structural and dynamic information that is hindering their detailed functional characterization and the identification of novel potent drug candidates.

8

9

10

11

12

Magic Angle Spinning (MAS) NMR is a reliable and efficient method for the determination of protein structures and dynamics and for the identification of ligand binding sites and equilibria. MAS-NMR is particularly well suited for MPs since they can be directly analysed in a native-like lipid bilayer environment but used to require aggravating large amounts of isotope enriched material. The frequent toxicity of human MP overexpression in bacterial cultures poses an additional hurdle, resulting in the need for alternative (and often more costly) expression systems. The recent development of very fast (up to 150 kHz) MAS probes has revolutionized the field of biomolecular solid-state NMR enabling higher spectral resolution with significant reduction of the required sample, rendering eukaryotic expression systems cost-effective.

13

14

15

16

17

18

19

Here is presented a set of accessible procedures validated for the production and preparation of eukaryotic MPs for Fast-MAS  $^1\text{H}$ -detected NMR analysis. The methodology is illustrated with the human copper uptake protein hCTR1 recombinantly produced and  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  uniformly labeled with the versatile and affordable *Pichia pastoris* system. Subsequent purification procedures allow the recovery of mg amounts that are then reconstituted into liposome formulations compatible with solid-state NMR handling and analysis.

20

21

22

23

24

25

26

**Keywords** *Pichia pastoris*, Yeast, Membrane protein, Isotopic labeling, Multilamellar vesicles, MAS-NMR

27

28

### 1 Introduction

29

In the last two decades, major progress in sample preparation and in biophysical methods specifically developed for membrane proteins

30

31

(MPs) has tremendously boosted the structural comprehension of vital functions at biological membranes [1–3]. While a large majority of structural data has been obtained through X-ray diffraction and cryo-EM observation of static objects, complementary information on dynamic has been gathered with dedicated analytical methods such as XFEL [4], EPR [5], HS-AFM [6], and NMR spectroscopy [7–9].

Among these techniques, solid-state NMR is gaining an increasing interest with the recent advent of fast Magic Angle Spinning (MAS) probes. This critical technical development has considerably broadened the scope of proton-detected NMR techniques with direct consequences on the structural and dynamic characterization of proteins [10–12], including MPs [13–16]. The increase in MAS speed (probes spinning to 60 kHz and above) correlates not only with a dramatic improvement of  $^1\text{H}$  spectral resolution but also with a significant reduction of sample amount required (0.5 mg or less), which is a major concern for MPs, for which expression yields are usually low. Most importantly, MAS-NMR interrogates conformations of MPs floating in native or native-like lipid bilayers. This technique is thus particularly well adapted to reveal molecular events occurring at the protein–lipid interface [16–18], but also to investigate the influence of lipids on MP structures and functions [19, 20], which is a key issue in molecular membrane biology [21, 22].

In such MAS-NMR studies of MPs, a variety of labeling schemes, experimental sequences and resonance assignment methods have been developed and are reported in very comprehensive reviews [9, 14, 23]. All of them rely on highly purified proteins selectively or uniformly labeled with  $^{13}\text{C}$  and/or  $^{15}\text{N}$  isotopes for investigating the structure and conformational dynamics of the whole protein or of particular domains or residues. As a requisite, these methods thus require robust recombinant expression systems compatible with labeling-associated issues and performant enough to produce mg amounts of labeled MPs in a functional form. With various degrees of operability, performance, specificities and limitations, several cellular and cell-free systems have been developed to this end in the very recent years (see refs. 23–26 and references therein).

One of these robust expression systems emerging for the production of MPs for MAS-NMR is the methylotrophic yeast *Komagataella phaffi*, best known under the name *Pichia pastoris* in applied sciences [27]. This eukaryotic microorganism already proved highly efficient in producing many eukaryotic MPs representative of various functions (receptors, channels, transporters, enzymes), topologies and assemblies [28, 29]. A large number of them could be further isolated for molecular investigations, in quantity and quality levels compatible with a wide panel of biochemical and biophysical techniques (see references in [30]).

The power of *P. pastoris* largely relies on its particular methanol utilization metabolism that endows it with promoters tightly regulated upon culturing conditions: fully repressed in presence of preferential carbohydrates (i.e., sugars, glycerol), they are strongly induced when methanol is the sole carbon source [31]. With regard to protein production for NMR studies, expression of recombinant genes placed under the control of such promoters is thus particularly well adapted to various labeling strategies, bringing chosen isotopically labeled substrates to the culture during the induction phase [32]. Accordingly, several studies have reported on the successful implementation of this system to deliver labeled MPs for a number of NMR analyses [33–35], including MAS-NMR approaches [24, 36, 37]. In these studies, uniform  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -labeling schemes mainly relied on  $^{15}\text{N}$ -ammonium salts and  $^{13}\text{C}$ -methanol supplementation during induction, combined to the fine tuning of a number of parameters before or during induction (addition of noninducing  $^{13}\text{C}$ -carbohydrates—glucose or sorbitol; cell density, temperature, and time scale settings; initial  $^{13}\text{C}$ -methanol and  $^{15}\text{N}$ -ammonium salt concentrations, supplementation during the process, etc.).

We here present a detailed procedure for the preparation of uniformly  $^{15}\text{N}$ - and  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -labeled recombinant MPs from *P. pastoris* for their subsequent Fast-MAS-NMR handling and analysis. It includes the description of culturing conditions in isotope-enriched minimal media designed to optimize MP production yields, labeling efficiency, and cost concerns. This is achieved by favoring short growth and induction times, thus limiting cell death and degradation events, and by reducing the  $^{13}\text{C}$ -methanol substrate to its lowest efficient concentration in order both to limit its toxicity effect and to maximize the cost issue. The procedure also describes each of the following steps leading from MP extraction and purification in detergents to their reconstitution in multilamellar vesicles (MLVs) and packing in Fast-MAS rotors for their NMR analysis. The whole process has been validated with two human MPs, a G protein-coupled receptor and the high-affinity copper transporter hCTR1. This homotrimeric MP is involved in the fine regulation of Cu homeostasis and in the uptake of platinum-based compounds employed in cancer chemotherapy [38–40], and is used throughout the chapter to illustrate the whole procedure.

---

## 2 Materials

### 2.1 MP Production in Labeling Conditions

1. A recombinant clone expressing the MP of interest freshly streaked on a YPD agar plate with antibiotic (typically 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  geneticin).

2. YPD agar: 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose, 2% (w/v) agar.	123 124
3. Sterile milli-Q water.	125
4. 1 M KPi phosphate sterile buffer, pH 6: 3.1% (w/v) dipotassium hydrogen phosphate trihydrate ( $K_2HPO_4$ , 3 $H_2O$ ), 11.81% (w/v) potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ). Filter-sterilize.	126 127 128 129
5. BMG liquid minimal medium: 700 ml sterile milli-Q water, 100 ml 1 M KPi phosphate buffer, pH 6 (10× solution, filter sterilized), 100 ml 13.4% (w/v) yeast nitrogen base (YNB) without amino acid (10× solution, filter sterilized), 100 ml 10% (v/v) glycerol (10× solution, filter sterilized) ( <i>see Note 1</i> ).	130 131 132 133 134
6. $^{15}N$ -labeled BMM liquid minimal medium: 800 ml sterile milli-Q water, 100 ml 1 M KPi phosphate buffer pH 6 (10× solution), 2 g YNB without amino acid and ammonium sulfate, 1 g $^{15}N$ -ammonium chloride, 100 ml 5% (v/v) methanol (10× solution). Homogenize and filter sterilize.	135 136 137 138 139
7. $^{15}N$ - $^{13}C$ -labeled BMM liquid minimal medium: 900 ml sterile mQ water, 100 ml 1 M KPi phosphate buffer pH 6 (10× solution), 2 g YNB without amino acid and ammonium sulfate, 1 g $^{15}N$ -ammonium chloride, 2 ml 100% $^{13}C$ -methanol ( <i>see Note 2</i> ). Homogenize and filter-sterilize.	140 141 142 143 144
8. Phosphate-buffered saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4$ , 1.76 mM $KH_2PO_4$ , pH 7 to 7.4.	145 146
9. 2.5 l baffled flasks (e.g., Ultra Yield <sup>TM</sup> flasks, Thomson).	147
10. AirOTop <sup>TM</sup> seals (Thomson) with 0.2 $\mu$ m resealable and sterile membrane barrier.	148 149
11. 1 l sterile centrifuge bottles.	150
12. 50 ml conical disposal tubes.	151
13. 30 °C and 22 °C shaking incubators.	152
14. Spectrophotometer (e.g., Biophotometer, Eppendorf).	153
15. Centrifuge equipped with a rotor suitable for 1 l bottles.	154
<b>2.2 Yeast Cell Lysis and Membrane Preparation</b>	
1. Yeast cell pellets from 4 l culture (four pellets, around 8 g each).	155
2. TNG buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1 mM PMSF (added extemporaneously).	156 157
3. TNGE buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (added extemporaneously).	158 159 160
4. Acid-washed glass beads (425–600 $\mu$ m diameter, Sigma-Aldrich).	161 162
5. High-speed benchtop homogenizer suitable for volumes up to 50 ml (e.g., FastPrep-24, MP biomedical).	163 164

6. Centrifuge equipped with a rotor suitable for 50 ml conical tubes.	165 166
7. Ultracentrifuge with an appropriate fixed-angle rotor and adapted polycarbonate bottles.	167 168
8. 50 ml Potter homogenizer.	169
9. 14 and 50 ml conical disposable tubes.	170
10. Protein assay kit for the determination of protein concentration (e.g., Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).	171 172
<b>2.3 Extraction of MPs from Membrane Preparation</b>	
1. Solubilization buffer: 50 mM Hepes pH 7.4, 300 mM NaCl, 1% n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranoside (DM), inhibitor protease cocktail (added extemporaneously, i.e., cOmplete <sup>TM</sup> EDTA-free, Roche).	173 174 175 176
2. Membrane preparation.	177
3. Ultracentrifuge with an appropriate fixed-angle rotor and adapted polycarbonate bottles.	178 179
<b>2.4 Purification of Solubilized MPs</b>	
<b>2.4.1 Immobilized Affinity Chromatography (IMAC)</b>	
1. Automated protein purification system (ÄKTA Pure or Purifier, Cytiva, or equivalent) equipped with a sample pump.	180 181
2. 1 ml prepacked cobalt affinity chromatography column (e.g., Talon Crude 1 ml Cytiva).	182 183
3. 0.22 $\mu$ m filter and filter holder (e.g., reusable bottle top filter from Nalgene).	184 185
4. Buffer A: 50 mM Hepes pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% DM.	186
5. Buffer B: 50 mM Hepes pH 7.4, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazole, 0.1% DM.	187 188 189
<b>2.4.2 Size Exclusion Chromatography (SEC)</b>	
1. Automated protein purification system (e.g., ÄKTA Pure or Purifier, Cytiva, or equivalent).	190 191
2. 0.22 $\mu$ m filter and filter holder (e.g., reusable bottle top filter from Nalgene).	192 193
3. SEC running buffer: 50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% DM.	194 195
4. SEC column (e.g., Superdex 200 Increase 10/300, Cytiva).	196 197
<b>2.5 SDS-PAGE and Western Blot Immunodetection</b>	
<b>2.5.1 SDS-PAGE</b>	
1. 40% acrylamide–bis-acrylamide 29:1 solution.	198
2. 3 M Tris–HCl pH 8.45, 0.3% (v/v) SDS.	199
3. 80% (v/v) glycerol.	200
4. 10% (w/v) ammonium persulfate (APS).	201
5. Tetramethylethylenediamine (TEMED).	202
6. Gel casting stand and electrophoresis chamber (e.g., SureCast system, Invitrogen).	203 204

7. MP samples.	205
8. Protein ladder (e.g., PageRuler prestained protein ladder, Thermo).	206 207
9. Tris-Tricine-SDS cathode running buffer: 1 M Tris-HCl pH 8.2, 1 M Tricine, 1% (v/v) SDS.	208 209
10. Tris anode running buffer: 1 M Tris-HCl pH 8.9.	210
11. 2× Tricine Sample Buffer (SB 2×): 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% (v/v) glycerol, 8% (v/v) SDS, 0.02% (w/v) Coomassie blue G250, 200 mM DTT.	211 212 213
12. Coomassie blue staining solution (e.g., Quick Coomassie Stain, Neo Biotech).	214 215 216
<b>2.5.2 Western Blotting and Immunodetection</b>	
1. Tris-Glycine transfer buffer: 25 mM Tris, 200 mM glycine, 0.02% (v/v) SDS, 20% (v/v) ethanol.	217 218
2. 0.45 µm nitrocellulose blotting membrane (e.g., Amersham Protran 0.45 nitrocellulose membrane, Cytiva).	219 220
3. Whatman paper.	221
4. Electroblotting system (e.g., Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad).	222
5. PBST: PBS, 0.02% (v/v) Tween 80.	223
6. Blocking buffer: PBST with 5% (w/v) nonfat dry milk.	224
7. Primary anti-protein or anti-tag antibody (here a monoclonal anti-HA antibody from mouse, Sigma).	225 226
8. Secondary anti-mouse IgG antibody linked to a reporter system (here an IRDye 800-coupled antibody, LiCor).	227 228
9. Reagent and detection device adapted to the reporter system selected (here an Odyssey® imaging system, LiCor).	229 230
10. Orbital shaker.	231 232
<b>2.6 Reconstitution in MLVs</b>	
1. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (POPC) (e.g., 16:0–18:1 PC in chloroform, Avanti).	233 234
2. Cholesterol (Avanti).	235
3. Rotary evaporator (e.g., Rotavapor R-100, Buchi) or Argon stream.	236 237
4. Vacuum chamber and pump.	238
5. Liposome buffer: 50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl.	239
6. Purified MPs in detergent micelles.	240
7. 10% (w/v) DM.	241
8. Dialysis cassettes with appropriate MWCO (e.g., Slide-A-Lyzer™, Thermo Scientific).	242 243
9. Ultracentrifuge with an appropriate fixed-angle rotor and adapted polycarbonate bottles.	244 245

<b>2.7 Sample Packing in Fast-MAS Rotors</b>	1. Filling tool for ultracentrifuge (e.g., spiNpack, Giotto Biotech).	246 247
	2. Ultracentrifuge with swing-out rotor (e.g., SW32, SW28 rotors for Beckman centrifuges).	248 249
	3. Fast MAS NMR rotor (e.g., Bruker 1.3 or 0.7 mm, JEOL 1 mm or 0.75 mm) with appropriate caps and inserts.	250 251

---

<b>3 Methods</b>	252
------------------	-----

### **3.1 Production of MPs in Isotope- Labeling Conditions with *Pichia pastoris***

The present procedure starts with an already existing yeast clone expressing the MP of interest. If such a clone is not available, the reader is referred to published extensive protocols [41, 42] detailing the preliminary work required to generate and isolate a *P. pastoris* recombinant clone.

The production of a recombinant MP is based on the over-expression of its corresponding gene placed under the control of the *P<sub>AOX1</sub>* promoter [41] which is strongly regulated upon a methanol-induced regimen. In a first step, MP expression is fully repressed as yeasts are cultured in a glycerol-containing medium. When an appropriate cell density in a chosen culturing volume is reached in the exponential growth phase, the medium is then replaced by a methanol-containing one that will progressively derepress and then strongly induce the MP gene overexpression. As no expression leakage is detected before the medium exchange, <sup>15</sup>N- and/or <sup>13</sup>C-labeled substrates are added only during the induction phase to ensure a uniform labeling and MP production at once, and at reduced cost.

Here we describe an optimized protocol for the production of hCTR1 either in <sup>15</sup>N-labeling alone or combined with <sup>13</sup>C-labeling conditions, using 2.5 l baffled shake-flasks (see Note 3).

1. Generously inoculate 500 ml of extemporaneously prepared BMG medium in a 2.5 l baffled flask (see Note 4) with a clone freshly streaked on an antibiotic supplemented YPD agar plate (e.g., 50 µg/ml geneticin). Incubate overnight on a shaker at 220 rpm, 30 °C.
2. On the next day, measure OD<sub>600</sub> of the culture. Dilute the cells in 2 l of fresh BMG to an OD<sub>600</sub> around 5 (about 2.5 × 10<sup>8</sup> cells/ml, see Note 5). Incubate on a shaker at 220 rpm, 30 °C.
3. When the culture reaches an OD<sub>600</sub> between 10 and 15 (generation time in BMG ≈ 3.5 h, see Note 1), pellet the cells by centrifugation in sterile 1 l bottles for 5 min at 5000 × g, 22 °C.
4. Discard the supernatant and resuspend the cell pellets with 4 l of freshly prepared BMM medium complemented with <sup>15</sup>N

ammonium chloride only or combined with $^{13}\text{C}$ methanol.	288
Split into eight baffled 2.5 l flasks and incubate for an optimal	289
period of time, here 22 h, in a shaker at 22 °C, 220 rpm.	290
5. After induction, harvest the cells by centrifugation in 1 l bottles	291
for 5 min at $5000 \times g$ , 4 °C.	292
6. Discard the supernatants and wash each cell pellet	293
(corresponding to 1 l of culture) with 200 ml PBS, pH 7.4.	294
Pool the equivalent of two pellets into one bottle and centri-	295
fuge the suspension for 5 min at $5000 \times g$ , 4 °C.	296
7. Discard the supernatant and wash each cell pellet	297
(corresponding to 2 l of culture) with 100 ml PBS, pH 7.4.	298
Split into $4 \times 50$ ml conical tubes and centrifuge the suspen-	299
sion for 5 min at $5000 \times g$ , 4 °C.	300
8. Discard the supernatants and weigh the cell pellets.	301
9. The yeast pellets can either be directly utilized kept on ice for	302
membrane preparation or snap-frozen in liquid nitrogen and	303
stored at -80 °C.	304

In this format, each of the four 50 ml conical tube contains  
about 8 g of wet cell pellets corresponding to 1 l of culture (i.e.,  
about 32 g of cells for 4 l of culture in labeling conditions).

### 3.2 Yeast Cell Lysis and Whole Membrane Preparation

Yeast cells are surrounded by a thick cell wall that protects them  
from most of the nonmechanical cell disrupting approaches such as  
enzyme-, heat-, or detergent-based techniques. Methods relying  
on mechanical shear forces (bead- or pressure-based) are thus  
required to efficiently achieve *P. pastoris* cell lysis. One of these  
robust and accessible procedures uses glass beads and vigorous  
mechanical shaking for an efficient lysis, ideally monitored with a  
programmable device (e.g., the FastPrep-24 homogenizer from  
MP Biomedicals used here) for a better reproducibility. To prevent  
degradation of recombinant proteins by protease during the cell  
lysis, addition of protease inhibitors is strongly recommended.  
After the cell lysis, unbroken cells and large debris are removed by  
centrifugation and the supernatant is further submitted to ultracentri-  
fugation. A final homogenization of the pellet with a Potter  
device allows the recovery of the whole membrane fraction. The  
resulting membrane preparation is further analyzed in order to  
evaluate its total protein concentration (typically with a BCA or a  
Bradford assay) and the expression level of the recombinant MP  
through a western blot immunodetection and via an appropriate  
activity assay when available.

The following protocol illustrates how we proceed for the  
whole membrane preparation of cells producing hCTR1 in  
isotope-labeling conditions (Subheading 3.1).

1. Thaw the four yeast pellets in conical tubes previously obtained (about 8 g each) and resuspend each of them in 25 ml ice-cold TNGE buffer. 331  
332  
333
2. Add 10 ml acid-washed glass beads. 334
3. Place the tubes in the cell breaker device (here the FastPrep-24) and proceed to cell lysis by alternating shaking and cooling steps (3 cycles of 40 s shaking at 6.5 m/s and 40 s on ice). 335  
336  
337
4. Centrifuge for 5 min at  $5000 \times g$ , 4 °C, collect the supernatant and store at 4 °C. 338  
339
5. Resuspend the pellet in up to 25 ml of ice-cold TNGE buffer. 340
6. Repeat steps 3–5 for two additional rounds (or until the supernatant is clear). 341  
342
7. Centrifuge all the collected supernatants for 5 min at  $5000 \times g$ , 4 °C. 343  
344
8. Proceed to ultracentrifugation of the supernatants for 30 min at  $100,000 \times g$ , 4 °C in appropriate tubes. 345  
346
9. Discard the supernatant and resuspend the membrane pellet with a Potter homogenizer in 70 ml of ice-cold TNG buffer until the suspension is homogenous. Split the membrane preparation in about 8 × 10 ml in 14 ml conical tubes. These membrane preparations can be used directly for further use and analyses, or can be stored for several weeks at –80 °C. 347  
348  
349  
350  
351  
352
10. Determine the protein concentration of membrane preparation using a BCA assay kit following the manufacturer's recommendations. 353  
354  
355

In the experimental conditions presented above, we usually recover about 100 mg of membrane proteins per 10 ml of suspension, that is, about 200 mg per initial cell pellet corresponding to 1 l of culture. 356  
357  
358  
359

### **3.3 Extraction of MPs from Membrane Preparation**

A first critical step toward the isolation of MPs in aqueous solutions is to identify the best adapted experimental condition driving their efficient extraction from the lipid bilayer while preserving their structural and functional integrity. This task is principally based on the careful selection of an appropriate amphiphilic molecule, mainly a detergent, used to destabilize the lipid–lipid interactions of biological membranes. It also relies on a number of other parameters, such as detergent and protein concentrations, ionic strength, addition of cofactors and stabilizing compounds and finally temperature and incubation time. The optimal condition is most generally protein-dependent and should ideally be screened and adjusted for each MP of interest [30, 43–45]. The extraction procedure presented here with DM as a detergent has been optimized for hCTR1. 360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373

1. Add 10 ml of membrane preparation (about 100 mg of total membrane proteins) in the solubilization buffer in order to reach a final protein concentration of 2 mg/ml. 374  
375  
376
2. Incubate for 30 min at RT under gentle agitation. 377
3. Proceed to ultracentrifugation for 30 min at 100,000  $\times g$  at 4 °C in appropriate tubes to separate the nonsolubilized (pellet) from the solubilized fractions (supernatant). 378  
379  
380
4. Filter the solubilized MPs using a 0.22  $\mu$ m membrane filter. 381  
Imidazole can be added at this stage if needed. Keep on ice. 382
5. The MP solubilization efficiency can be evaluated by immuno-detection and activity assay if available. 383  
384

### 3.4 Purification of Solubilized MPs

Once MPs are solubilized, a panel of strategies and techniques may be considered to purify them to homogeneity, mainly depending on the biochemical properties of the protein itself, on the affinity tags it may present, and on the composition of the buffer it has been solubilized in [30, 46]. Here we describe a two-step purification protocol specifically designed for hCTR1. 385  
386  
387  
388  
389  
390

A first immobilized metal affinity chromatography (IMAC) exploits the natural ability of hCTR1 to bind divalent ions, here cobalt grafted on the resin. Besides the invaluable advantage of immobilizing the correctly folded,  $\text{Co}^{2+}$ -binding, homotrimer populations of hCTR1 [47, 48], the strategy presents the additional benefit of working with a wild-type protein with no artificial fused tag and with no need to eventually cleave this tag afterward. It is however very specific to hCTR1 and for other MPs, the IMAC step should rely on tag-based techniques by exploiting a N- or C-terminally fused 10His tag and using nickel or cobalt resins. The IMAC protocol described here is designed for an automated purification on an FPLC instrument (e.g., Äkta protein purification systems) using a prepacked column, and with a specific flow rate, sequential washing and elution strategy optimized for hCTR1. In this format, the use of a sample pump is warmly recommended as the volume of the solubilized sample loaded on the column may be significant (one or several hundred milliliters). Alternative immobilization (such as batch incubation), washing and elution (linear gradient or other fixed concentrations of imidazole) strategies may be applied and optimized depending on the MP of interest. 391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410

The second purification step of the procedure consists in a classical Size Exclusion Chromatography (SEC) using a Superdex 200 Increase column (Cytiva). This step is also designed for an automated purification using a FPLC instrument, which is a crucial point as the flow rate and pressure need to be tightly controlled. 411  
412  
413  
414  
415

#### 3.4.1 IMAC

1. Equilibrate a 1 ml prepacked cobalt column with at least 10 column volumes (CVs) buffer A at 1 ml/min. 416  
417  
418

2. Inject the solubilized MPs onto the column with a sample 419  
pump at 0.5 ml/min. 420

3. Proceed to a washing step with 10 CVs of buffer A at 1 ml/min 421  
(same flow rate in the following steps). 422

4. Proceed to a second washing step with 5 CVs of 1.6% of buffer 423  
B (5 mM imidazole) and collect 500  $\mu$ l fractions. 424

5. Proceed to the elution step with 10 CVs of 100% buffer B 425  
(300 mM imidazole) and collect 500  $\mu$ l fractions. 426

6. Spare 20  $\mu$ l of every fractions of interest and proceed to SDS- 427  
PAGE analysis with Coomassie blue staining and 428  
immunoblotting. 429

430

#### 3.4.2 SEC

1. Equilibrate the SEC column (e.g., Superdex 200 Increase 431  
10/300, Cytiva) with 2 CVs of SEC running buffer at 432  
0.5 ml/min. 433

2. Depending on the results of the SDS-PAGE analysis from the 434  
IMAC purification, inject the appropriate fraction onto the 435  
SEC column at 0.3 ml/min and collect 500  $\mu$ l fractions (*see* 436  
**Note 6**). 437

3. Store 20  $\mu$ l of each fractions of interest for SDS-PAGE analysis. 438

4. The purified MPs obtained can be used directly for reconstitu- 439  
tion in MLVs or can be snap frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . 440

In the format presented here, 100 mg of initial membrane 441  
preparation yields about 0.4 mg of DM-purified hCTR1 on aver- 442  
age, that is, about 0.8 mg/liter of culture. Figure 1 illustrates a 443  
typical SEC chromatography and the corresponding SDS-PAGE 444  
(*see* Subheading 3.5) profiles obtained in these conditions. 445

446

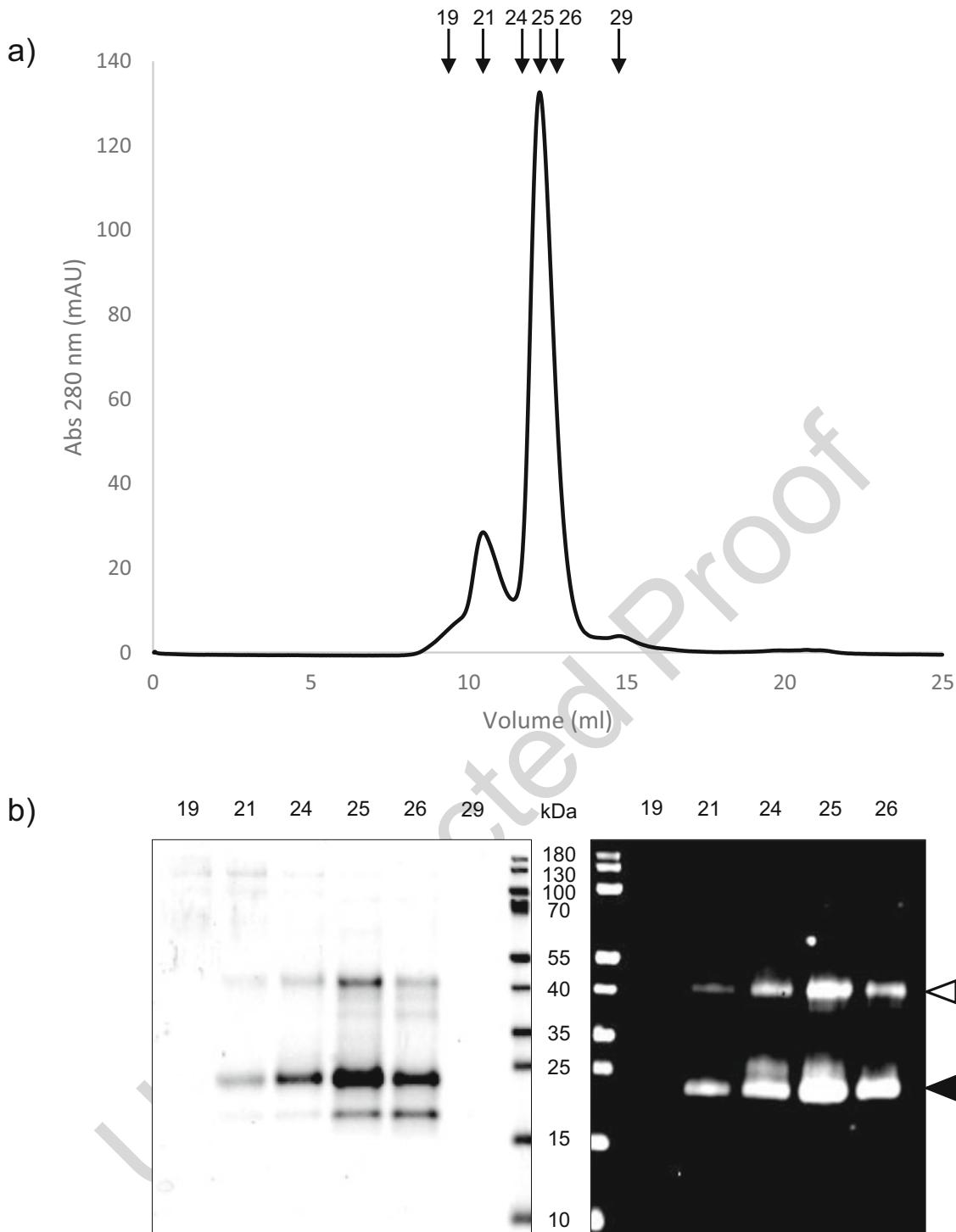
### 3.5 SDS-PAGE and Western Blot Immunodetection

The following protocol has been originally published in [49] for 447  
the immunodetection of tagged MPs in membrane preparation 448  
samples. It is here updated with minor adjustments and focused 449  
on the analysis of purified MPs samples, either in detergent micelles 450  
or in proteoliposomes. The proportions are given for casting two 451  
gels of 1 mm thickness in a SureCast gel system from Invitrogen. 452

453

#### 3.5.1 10% SDS Tricine Polyacrylamide Gel Preparation

1. Prepare the separating gel by mixing 3.75 ml of acrylamide 454  
solution (40% 29:1), 3.95 ml of Tris-HCl SDS buffer, 1.9 ml 455  
of 80% (v/v) glycerol, 4.35 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 135  $\mu$ l of APS and 9  $\mu$ l of 456  
TEMED. Mix and immediately cast the gel, allowing space for 457  
the stacking gel. 458



**Fig. 1** Purification profile of hCTR1 obtained with the presented procedure

**(a)** SEC elution profile obtained on a Superdex 200 10–300 column (Cytiva). Representative fractions are indicated with black arrows. **(b)** SDS-PAGE (10% (w/v) polyacrylamide Tris–Tricine gels) of the SEC representative fractions analyzed by Coomassie Blue staining (left panel) and Western Blot (right panel). Purified hCTR1 appears in fractions 24–26 as a major band corresponding to its monomeric form (22 kDa, black triangle) and as an SDS-resistant dimer (44 kDa, white triangle). An additional band of lower molecular weight is also detected on the Coomassie blue stained gel. Immunoblotting with a monoclonal anti-HA antibody from mouse (Sigma, 0.4 µg/ml). Molecular weight markers are PageRuler from Thermo, with masses (kDa) indicated in between

2. Prepare the stacking gel by mixing 0.6 ml of acrylamide solution (40% 29:1), 1.6 ml of Tris-HCl SDS buffer, 4.1 ml H<sub>2</sub>O, 90 µl of APS and 6 µl of TEMED. Mix and cast carefully with a pipet over the separating gel (no need to wait for the polymerization of the separating gel which density is increased by the presence of glycerol, thereby permitting the stacking gel to layer on top of it without mixing). Insert a gel comb immediately without introducing air bubbles. 459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466
  3. Let the gel polymerize for about 30 min. 467  
468
- 3.5.2 Gel Electrophoresis and Coomassie Staining**
1. Preincubate 20 µl of the fractions of interest with 20 µl of SB 2× for about 10 min at room temperature (see Note 7). 469  
470
  2. Load in parallel two 10% SDS-polyacrylamide gels respectively with 20 µl and 5 µl of each sample. Add also one well with 4 µl of protein ladder in each gel. The first gel will be used for total protein staining with Coomassie blue, the second one will be transferred onto a nitrocellulose membrane for the immuno-detection of the MP of interest. 471  
472  
473  
474  
475  
476
  3. Proceed to electrophoresis using Tris-Tricine-SDS cathode running buffer and Tris-anode running buffer in a tank unit. 477  
478  
Run for about 1 h 30 at 100 V. 479 **AU2**
  4. Stain the first gel with Coomassie blue following manufacturer's instructions. 480  
481  
482
- 3.5.3 Protein Transfer and Western Blot Immunodetection**
1. Transfer the proteins from the second gel onto a nitrocellulose membrane by electroblotting in Tris-glycine transfer buffer for about 1 h 30 at 100 V. An ice pack can be added into the electroblotting device to mitigate the heat produced. 483  
484  
485  
486
  2. Incubate the membrane in 30 ml blocking buffer for 1 h at room temperature on an orbital shaker. Alternatively, incubate the membrane overnight at 4 °C. 487  
488  
489
  3. Remove the blocking solution and incubate the membrane with the selected antibody diluted in blocking buffer (for hCTR1 we use a monoclonal anti-HA antibody at 0.4 µg/ml final concentration) for 1 h at room temperature on an orbital shaker, or alternatively overnight at 4 °C. 490  
491  
492  
493  
494
  4. Wash the membrane three times with 50 ml of PBST on an orbital shaker for 5 min at room temperature. 495  
496
  5. Remove the PBST and incubate the membrane with the adapted anti-IgG antibody diluted in blocking buffer (here an IRDye 800-coupled anti-mouse antibody at 0.4 µg/ml final concentration) for 1 h at room temperature on an orbital shaker, or alternatively overnight at 4 °C. 497  
498  
499  
500  
501
  6. Wash the membrane three times 50 ml of PBST on an orbital shaker for 5 min at room temperature. 502  
503

7. Remove the PBST and wash the membrane with 50 ml of PBS on an orbital shaker for 5 min at room temperature. 504
8. Store the membrane in PBS until revelation. 505
9. Proceed to the membrane revelation according to the reporter system selected and following the manufacturer's recommendations (here the membrane is scanned and analyzed with an Odyssey Infrared Imager from LiCor). 507

508  
509  
510  
511

### 3.6 Reconstitution in MLVs

As underlined in the introduction section, one of the major advantages of the MAS-NMR approach resides in its invaluable capacity to study MPs within a lipid bilayer and to evaluate how this membrane environment may influence its structure, conformation and function. Although detergent micelles are essential to solubilize MPs, their biochemical and structural properties are very far from those of biological membranes, and their liquid-phase state is obviously not compatible with solid-state NMR. Necessarily, detergent-purified MPs have thus to be reconstituted in membrane mimicking systems for MAS-NMR studies, among which liposomes are the primary model of choice [9, 50].

512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522

Liposomes or lipid vesicles are spherical lipid bilayer structures. They form spontaneously upon lipids hydration, constituting large multilamellar vesicles (MLVs) of up to 1  $\mu$ m of diameter and a dozen of stacked bilayers [50, 51]. Thanks to their low curvature close to local constraints of the cell, their size and bilayer organization, they are considered as good membrane mimics. They also offer the great advantage to be easily tunable in term of lipid composition, and they can also be supplemented with other components such as MP cofactors or protein interactants. Depending on well-defined preparation protocols [52], MLVs can further be processed into unilamellar vesicles of different sizes, ranging from giant (GUVs) to large (LUVs) and small unilamellar vesicles (SUVs), sizing respectively around 10  $\mu$ m, 100 nm, and 20 nm.

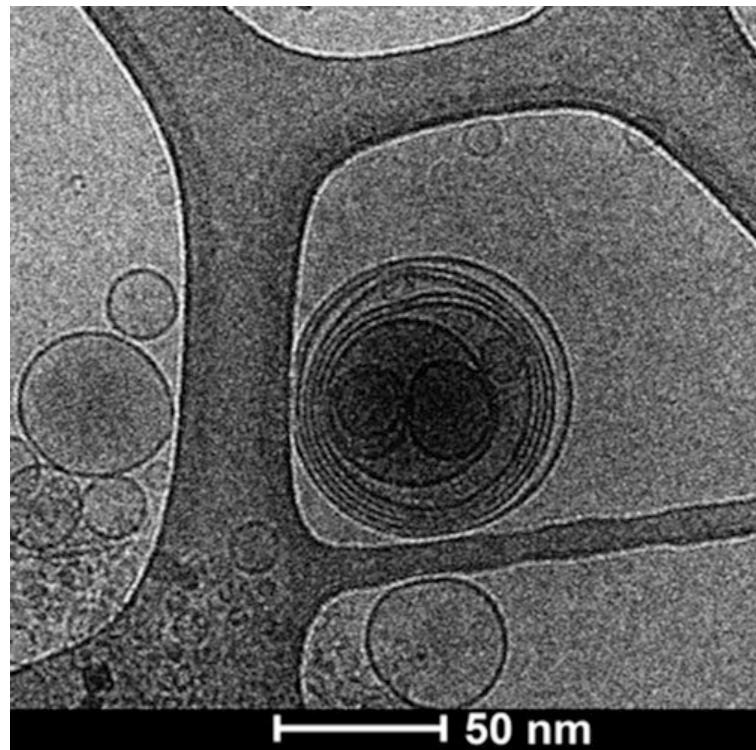
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535

This section presents a protocol optimized for the reconstitution of hCTR1 in MLVs, with a formulation adapted to sample filling into fast-MAS rotors (*see* Subheading 3.6) and compatible with solid-state NMR analyses.

536  
537  
538AU3  
539

The procedure basically consists in mixing hCTR1 in DM micelles with preformed liposomes saturated in detergent beforehand. The detergent is subsequently removed by a dialysis step (*see* Note 8), upon which the MPs progressively and spontaneously integrate into the lipid vesicles. Here again, the experimental conditions are protein-dependent with a number of parameters to be adjusted, including the choice of lipid(s) and the lipid-to-protein ratio, as well as the dialysis format, device, and duration.

540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547



**Fig. 2** Visualization of hCTR1 reconstituted in MLVs by cryo-TEM. MLV sample was blotted on a Lacey carbon filmed grid with a Vitrobot MARK IV instrument (FEI). Image (28,000 $\times$  magnification) was acquired at 200 kV on a Glacios microscope (ThermoFisher)

1. Using glass pipettes and vessels, mix lipids from stock solutions 548 in chloroform, here POPC and cholesterol with a 10:1 (mol: 549 mol) ratio. 550
2. Remove the chloroform by processing the solution in a rotary 551 evaporator. Alternatively, chloroform may also be vaporized by 552 blowing a gentle stream of nitrogen or argon over the solution. 553 A visible dry lipid film is formed on the wall of the glass vessel. 554
3. Traces of chloroform are further removed by placing the con- 555 tainer on a vacuum system overnight, especially if chloroform 556 has been evaporated under a gas stream. 557
4. Hydrate the lipid mixture in the liposome buffer to get a 558 concentration of 10 mg/ml by pipetting up and down, and at 559 a temperature above the phase transition of the lipids (here 560 4 °C or higher). Multilamellar vesicles form spontaneously. 561
5. Add the detergent to saturate the MLVs, here 1% DM. Mix 562 gently by pipetting up and down. Incubate for 1 h at RT. 563
6. Add the purified MPs (here hCTR1 in DM) to the detergent 564 saturated MLVs at the desired lipid-to-protein ratio (LPR). 565 Here a LPR of 2:1 (w/w) is used. Mix gently by pipetting up 566 and down. Incubate for 1 h at RT. 567

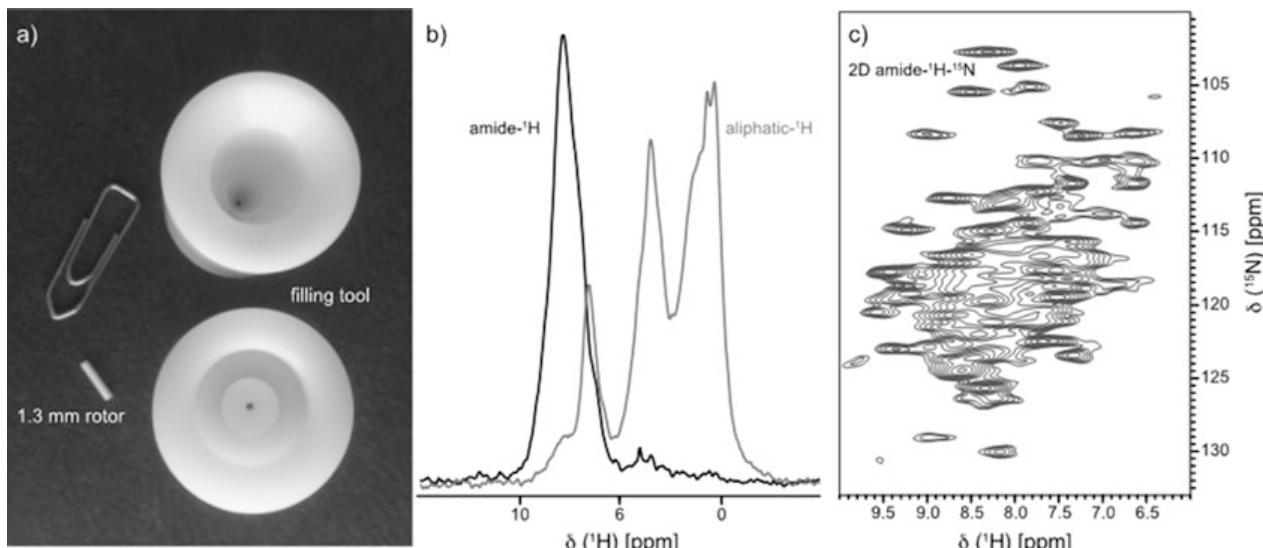
7. Start dialysis by transferring the sample in a dialysis system (cassette or bag) with the appropriate molecular weight cutoff (10 kDa MWCO for hCTR1). Plunge the dialysis tool in an adapted volume of the liposome buffer, here a ratio of 1 ml of sample for 250 ml of liposome buffer for hCTR1. 568
8. Run dialysis at 10 °C with a gentle agitation (beware to keep the mixture above the transition phase temperature of the lipids) and change the dialysis buffer every 24 h. 569
9. When the solution become milky (after about 24 h for hCTR1), transfer the mixture in appropriate tubes for ultracentrifugation. 570
10. Ultracentrifuge at 100,000  $\times \mathcal{g}$ , 4 °C for 30 min and remove the supernatant. 571
11. Resuspend the pellet in 1 ml of liposome buffer by gently pipetting up and down. Spare 20  $\mu$ l of this resuspended pellet and 20  $\mu$ l of the supernatant for further analyses (see Note 9). 572
12. The proteoliposome mixture obtained (Fig. 2) can be directly used for Fast-MAS-NMR analysis. 573

### 3.7 Sample Packing in Fast-MAS NMR Rotors

Since NMR spectroscopy is generally a rather insensitive method, efficient sample packing is crucial to maximize the detectable signal. MLV preparations are viscous and cannot be handled and packed like a dry powder. Traditional protocols involve ultracentrifugation in a tube and subsequent transfer of the compressed sample into 4 or 3.2 mm NMR rotors using a spatula or a tabletop microcentrifuge. Rotors of smaller size (e.g., 1.3 mm) for Fast-MAS render this methodology impractical and we highly recommend using a designated filling tool for direct ultracentrifugation of the MLV sample into the rotor [53, 54] (see Fig. 3a). As the time and force required vary slightly between samples, we generally start with 1 h at 100,000  $\times \mathcal{g}$  and only increase the centrifugal force and time if found necessary. 586

1. Assemble the filling tool according to the user instructions and load it with an appropriate amount of sample to achieve complete filling. 587
2. Fill a regular ultracentrifuge tube with water and balance out the filling tool. 588
3. Centrifuge for 1 h at 100,000  $\times \mathcal{g}$  and 10 °C. 589
4. Remove the supernatant and access sample, use inserts if desired, close rotor with the appropriate caps. 590

Figure 3b exemplifies 1D NMR spectra obtained in few minutes at 60 kHz MAS on an 800 MHz spectrometer. Spectra filtered through  $^{13}\text{C}$  (grey line) or  $^{15}\text{N}$  (black line) report respectively on 591



**Fig. 3** Fast-MAS-NMR analysis of hCTR1 in MLVs. **(a)** 1.3 mm solid-state NMR rotor and filling tool. **(b)** One-dimensional amide-<sup>1</sup>H (1D 1H-<sup>15</sup>N CP-HSQC) and aliphatic-<sup>1</sup>H (1D 1H-<sup>13</sup>C CP-HSQC) spectra. **(c)** Two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N CP-HSQC spectrum of <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N labeled hCTR1 in POPC-Cholesterol MLVs recorded on an 800 MHz spectrometer with 60 kHz MAS

aliphatic and amide 1Hs, demonstrating efficient isotope incorporation. By sampling of the heteronuclear chemical shift evolution, 2D fingerprints are acquired in ~0.5–1 h (Fig. 3c) and can be used to evaluate the impact of different reconstitution conditions and the overall homogeneity of the preparation.

#### 4 Notes

1. In nonlabeling conditions, *Pichia pastoris* is classically cultured in rich media supplemented with yeast extract and meat peptone, that is, BMGY for the growth phase and BMMY for the induction phase. In the corresponding defined BMG and BMM media described here, the generation time is significantly increased, from about 2 h to 3.5 h in the case of BMGY vs BMG.
2. 0.5% (v/v) methanol is usually added during the induction phase. Following an optimization study, we found that a concentration reduced to 0.2% methanol was yielding similar amounts of purified MPs, thereby substantially diminishing the cost issue for labeling with <sup>13</sup>C-methanol.
3. The culturing conditions presented here were specifically adjusted for an optimal production of hCTR1. A number of parameters may indeed influence the production yields of functional MPs in a protein-dependent manner and their optimization is often beneficial. Those notably include the adjustment of the induction temperature and time, the addition of

- stabilizing compounds or the modulation of cell density and pH among others [55, 56]. 635  
636
4. It is recommended to maintain a 1 to 5 ratio between the 637  
volume of the yeast culture and the total volume of the baffled 638  
flask for an optimal aeration of the culture. 639
  5. It is important to recall that the linear correlation between 640  
OD<sub>600</sub> measurement and cell density is limited and instrument 641  
dependent. After a standard calibration of the Eppendorf Bio- 642  
photometer we use, we determined that one OD<sub>600</sub> unit cor- 643  
responds to approximately  $5 \times 10^7$  *P. pastoris* cells/ml with this 644  
instrument. We also identified 0.3 OD<sub>600</sub> as the linearity limit 645  
and we dilute our samples accordingly. 646
  6. A maximum of 500  $\mu$ l can be injected onto a Superdex 647  
200 10/300 column. If the fractions of interest for the 648  
IMAC have a greater volume, they can be injected successively. 649  
Alternatively, they may be concentrated to the final desired 650  
injection volume, but we do not recommend this option with 651  
hCTR1 as this leads to oligomerization/aggregation events. 652
  7. We do not recommend boiling MP-containing samples prior to 653  
electrophoresis. Boiling often leads to the aggregation of MPs 654  
that eventually get stuck in the concentrating gel. 655
  8. The dialysis efficacy is strongly depending on the properties of 656  
the detergent to be removed, and on its critical micelle concen- 657  
tration (CMC) in particular: the higher the CMC, the easier 658  
the detergent is removed during the reconstitution step. When 659  
working with detergent with low CMC, they may require a 660  
longer time for dialysis, which may be detrimental to the MP 661  
structure and activity. To overcome this issue, the use or addi- 662  
tion of polystyrene beads adsorbing the detergent may be a 663  
helpful option [57, 58]. 664
  9. A rough estimate of the reconstitution efficiency can be 665  
achieved with an SDS-PAGE analysis of the supernatant and 666  
the pellet after ultracentrifugation. If the detergent removal is 667  
not complete and proteins are still in detergent micelles, they 668  
are detected in the supernatant. Ideally, an activity evaluation 669  
may be performed if an adapted assay is available. 670

---

## Acknowledgments

671

The authors warmly thank Dr. Heddy Soufari (NovAliX, Illkirch, 672  
France) for the cryo-TEM analysis of the MLV material. This work 673  
was supported by the CNRS, by the University of Strasbourg, by 674  
the European Research Council (ERC-2015-CoG GA 648974 to 675  
G.P.), and by the EC (project iNext Discovery GA 871037). Access 676  
to high-field NMR was cofunded by the CNRS (IR-RMN 677

FR3050). L.G. is supported by a PhD fellowship from ANRT 678  
(CIFRE N°2018/1643). 679

681 **References**

- Cheng Y (2018) Membrane protein structural biology in the era of single particle cryo-EM. *Curr Opin Struct Biol* 52:58–63
- Reis R, Moraes I (2019) Structural biology and structure-function relationships of membrane proteins. *Biochem Soc Trans* 47:47–61
- Li F, Egea PF, Vecchio AJ, Asial I, Gupta M, Paulino J, Bajaj R, Dickinson MS, Ferguson-Miller S, Monk BC, Stroud RM (2021) Highlighting membrane protein structure and function: a celebration of the Protein Data Bank. *J Biol Chem* 17:100557
- Standfuss J (2019) Membrane protein dynamics studied by X-ray lasers—or why only time will tell. *Curr Opin Struct Biol* 57:63–71
- Sahu ID, Lorigan GA (2020) Electron paramagnetic resonance as a tool for studying membrane proteins. *Biomol Ther* 10(5):763
- Heath GR, Scheuring S (2019) Advances in high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) reveal dynamics of transmembrane channels and transporters. *Curr Opin Struct Biol* 57:93–102
- Mandala VS, Williams JK, Hong M (2018) Structure and dynamics of membrane proteins from solid-state NMR. *Annu Rev Biophys* 47: 201–222
- Bostock MJ, Solt AS, Nietlispach D (2019) The role of NMR spectroscopy in mapping the conformational landscape of GPCRs. *Curr Opin Struct Biol* 57:145–156
- Yeh V, Goode A, Bonev BB (2020) Membrane protein structure determination and characterisation by solution and solid-state NMR. *Biology* 9(11):396
- Andreas LB, Le Marchand T, Jaudzems K, Pintacuda G (2015) High-resolution proton-detected NMR of proteins at very fast MAS. *J Magn Reson* 253:36–49
- Struppe J, Quinn CM, Lu M, Wang M, Hou G, Lu X, Kraus J, Andreas LB, Stanek J, Lalli D, Lesage A, Pintacuda G, Maas W, Gronenborn AM, Polenova T (2017) Expanding the horizons for structural analysis of fully protonated protein assemblies by NMR spectroscopy at MAS frequencies above 100 kHz. *Solid State Nucl Magn Reson* 87:117–125
- Daskalov A, Martinez D, Coustou V, El Mammeri N, Berbon M, Andreas LB, Bardiaux B, Stanek J, Noubhani A, Kauffmann B, Wall JS, Pintacuda G, Saupe SJ, Habenstein B, Loquet A (2021) Structural and molecular basis of cross-seeding barriers in amyloids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2014085118
- Lalli D, Idso MN, Andreas LB, Hussain S, Baxter N, Han S, Chmelka BF, Pintacuda G (2017) Proton-based structural analysis of a heptahelical transmembrane protein in lipid bilayers. *J Am Chem Soc* 139:13006–13012
- Schubeis T, Le Marchand T, Andreas LB, Pintacuda G (2018) <sup>1</sup>H magic-angle spinning NMR evolves as a powerful new tool for membrane proteins. *J Magn Reson* 287:140–152
- Shi C, Öster C, Bohg C, Li L, Lange S, Chevelkov V, Lange A (2019) Structure and dynamics of the rhomboid protease GlpG in liposomes studied by solid-state NMR. *J Am Chem Soc* 141:17314–17321
- Schubeis T, Le Marchand T, Daday C, Kopec W, Tekwani Movellan K, Stanek J, Schwarzer TS, Castiglione K, de Groot BL, Pintacuda G, Andreas LB (2020) A β-barrel for oil transport through lipid membranes: dynamic NMR structures of AlkL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(35):21014–21021
- Pinto C, Mance D, Sinnige T, Daniëls M, Weingarth M, Baldus M (2018) Formation of the β-barrel assembly machinery complex in lipid bilayers as seen by solid-state NMR. *Nat Commun* 9:4135
- Najbauer EE, Movellan KT, Schubeis T, Schwarzer T, Castiglione K, Giller K, Pintacuda G, Becker S, Andreas LB (2019) Probing membrane protein insertion into lipid bilayers by solid-state NMR. *Chem-PhysChem* 20(2):302–310
- van der Cruijzen EA, Prokofyev AV, Pongs O, Baldus M (2017) Probing conformational changes during the gating cycle of a potassium channel in lipid bilayers. *Biophys J* 112(1): 99–108
- Huster D (2014) Solid-state NMR spectroscopy to study protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1841:1146–1160
- Duncan AL, Song W, Sansom MSP (2020) Lipid-dependent regulation of ion channels and g protein-coupled receptors: insights from structures and simulations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60:31–50
- Jones AJY, Gabriel F, Tandale A, Nietlispach D (2020) Structure and dynamics of GPCRs in

- 785 lipid membranes: physical principles and exper- 842  
786 imental approaches. *Molecules* 25(20):4729
- 787 23. Lacabanne D, Fogeron ML, Wiegand T, 843  
788 Cadalbert R, Meier BH, Böckmann A (2019) 844  
789 Protein sample preparation for solid-state 845  
790 NMR investigations. *Prog Nucl Magn Reson 846*  
791 Spectrosc 110:20–33
- 792 24. Munro R, de Vlugt J, Ladizhansky V, Brown 847  
793 LS (2020) Improved protocol for the produc- 848  
794 tion of the low-expression eukaryotic mem- 849  
795 brane protein human aquaporin 2 in *Pichia 850*  
796 *pastoris* for solid-state NMR. *Biomol Ther 851*  
797 10(3):434
- 798 25. Pacull EM, Sendker F, Bernhard F, Scheidt 852  
799 HA, Schmidt P, Huster D, Krug U (2020) 853  
800 Integration of cell-free expression and solid- 854  
801 state NMR to investigate the dynamic proper- 855  
802 ties of different sites of the growth hormone 856  
803 secretagogue receptor. *Front Pharmacol 857*  
804 11:562113
- 805 26. Jirasko V, Lakomek NA, Penzel S, Fogeron 858  
806 ML, Bartenschlager R, Meier BH, Böckmann 859  
807 A (2020) Proton-detected solid-state NMR of 860  
808 the cell-free synthesized  $\alpha$ -helical transmem- 861  
809 brane protein NS4B from hepatitis C virus. 862  
810 *Chembiochem* 21(10):1453–1460
- 811 27. Bernauer L, Radkohl A, Lehmayer LGK, 863  
812 Emmerstorfer-Augustin A (2021) *Komagata- 864  
813 taela phaffii* as emerging model organism in 865  
814 fundamental research. *Front Microbiol 866*  
815 11:607028
- 816 28. Alkhalfioui F, Logez C, Bornert O, Wagner R 867  
817 (2011) Expression systems: *Pichia pastoris*. In: 868  
818 Robinson AS (ed) *Production of membrane 869  
819 proteins—strategies for expression and isolat- 870  
820 ion*. Wiley-VCH, pp 75–108
- 821 29. Byrne B (2015) *Pichia pastoris* as an expres- 871  
822 sion host for membrane protein structural biology. 872  
823 *Curr Opin Struct Biol* 32:9–17
- 824 30. Guyot L, Hartmann L, Mohammed- 873  
825 Bouteben S, Caro L, Wagner R (2020) Prepara- 874  
826 tion of recombinant membrane proteins 875  
827 from *Pichia pastoris* for molecular investiga- 876  
828 tions. *Curr Protoc Protein Sci* 100:e104
- 829 31. Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous 877  
830 protein expression in the methylotrophic yeast 878  
831 *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45–66
- 832 32. Zhang M (2020) Recent developments of 879  
833 methyl-labeling strategies in *Pichia pastoris* for 880  
834 NMR spectroscopy. *Protein Expr Purif* 166: 881  
835 105521
- 836 33. Clark L, Dikiy I, Rosenbaum DM, Gardner KH 882  
837 (2018) On the use of *Pichia pastoris* for isoto- 883  
838 pic labeling of human GPCRs for NMR stud- 884  
839 ies. *J Biomol NMR* 71:203–211
- 840 34. Eddy MT, Lee MY, Gao ZG, White KL, 885  
841 Didenko T, Horst R, Audet M, Stanczak P, 886  
842 McClary KM, Han GW, Jacobson KA, Stevens 887  
843 RC, Wüthrich K (2018) Allosteric coupling of 888  
844 drug binding and intracellular signaling in the 889  
845 A2A adenosine receptor. *Cell* 172:68–80.e12
- 846 35. Ye L, Neale C, Sljoka A, Lyda B, Pichugin D, 847  
847 Tsuchimura N, Larda ST, Pomès R, García AE, 848  
848 Ernst OP, Sunahara RK, Prosser RS (2018) 849  
849 Mechanistic insights into allosteric regulation 850  
850 of the A2A adenosine G protein-coupled 851  
851 receptor by physiological cations. *Nat Com- 852  
852 mun* 9(1):1372
- 853 36. Fan Y, Shi L, Ladizhansky V, Brown LS (2011) 853  
854 Uniform isotope labeling of a eukaryotic seven- 855  
855 transmembrane helical protein in yeast enables 856  
856 high-resolution solid-state NMR studies in the 857  
857 lipid environment. *J Biomol NMR* 49: 858  
858 151–161
- 859 37. Emami S, Fan Y, Munro R, Ladizhansky V, 859  
860 Brown LS (2013) Yeast-expressed human 860  
861 membrane protein aquaporin-1 yields excellent 861  
862 resolution of solid-state MAS NMR spectra. *J 862  
862 Biomol NMR* 55:147–155
- 863 38. Kuo MT, Fu S, Savaraj N, Chen HH (2012) 863  
864 Role of the human high-affinity copper trans- 865  
865 porter in copper homeostasis regulation and 866  
866 cisplatin sensitivity in cancer chemotherapy. 867  
867 *Cancer Res* 72:4616–4621
- 868 39. Ren F, Logeman BL, Zhang X, Liu Y, Thiele 868  
869 DJ, Yuan P (2019) X-ray structures of the 869  
870 high-affinity copper transporter Ctrl. *Nat 870*  
871 *Commun* 10:1386
- 872 40. Mandal T, Kar S, Maji S, Sen S, Gupta A 872  
873 (2020) Structural and functional diversity 874  
874 among the members of CTR, the membrane 875  
875 copper transporter family. *J Membr Biol* 253: 876  
876 459–468
- 877 41. Logez C, Alkhalfioui F, Byrne B, Wagner R 877  
878 (2012) Preparation of expression plasmids for 878  
879 *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* 866:25–40
- 880 42. Hartmann L, Kugler V, Wagner R (2016) 881  
881 Expression of eukaryotic membrane proteins 882  
882 in *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* 1432: 883  
883 143–162
- 884 43. Duquesne K, Prima V, Sturgis JN (2016) 884  
885 Membrane protein solubilization and compo- 886  
886 sition of protein detergent complexes. *Meth- 887  
887 od Mol Biol* 1432:243–260
- 888 44. Champeil P, Orlowski S, Babin S, Lund S, le 888  
889 Maire M, Møller J, Lenoir G, Montigny C 889  
890 (2016) A robust method to screen detergents 891  
891 for membrane protein stabilization, revisited. 892  
892 *Anal Biochem* 511:31–35
- 893 45. Kotov V, Bartels K, Veith K, Josts I, Subhrama- 893  
894 nyam UKT, Günther C, Labahn J, Marlovits 895  
895 TC, Moraes I, Tidow H, Löw C, Garcia-Alai 896  
896 MM (2019) High-throughput stability 897

- 898 screening for detergent-solubilized membrane 930  
 899 proteins. *Sci Rep* 9:10379 931
- 900 46. Pandey A, Shin K, Patterson RE, Liu XQ, 932  
 901 Rainey JK (2016) Current strategies for 933  
 902 protein production and purification enabling 934  
 903 membrane protein structural biology. *Biochem 935  
 904 Cell Biol* 94:507–527 936  
 905 47. Aller SG, Unger VM (2006) Projection 937  
 906 structure of the human copper transporter CTR1 at 938  
 907 6-A resolution reveals a compact trimer with a 939  
 908 novel channel-like architecture. *Proc Natl Acad 940  
 909 Sci U S A* 103:3627–3632 941
- 910 48. De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, 942  
 911 Unger VM (2009) Three-dimensional 943  
 912 structure of the human copper transporter hCTR1. 944  
 913 *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4237–4242 945  
 914 49. Hartmann L, Metzger E, Ottelard N, Wagner 946  
 915 R (2017) Direct extraction and purification of 947  
 916 recombinant membrane proteins from *Pichia* 948  
 917 *pastoris* protoplasts. *Methods Mol Biol* 1635: 949  
 918 45–56 950
- 919 50. Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, 951  
 920 Gravel A, Chartrand É, Marcotte I (2011) 952  
 921 Choosing membrane mimetics for NMR 953  
 922 structural studies of transmembrane proteins. *Bio- 954  
 923 chim Biophys Acta* 1808:1957–1974 955
- 924 51. Perkins WR, Minchey SR, Ahl PL, Janoff AS 956  
 925 (1993) The determination of liposome 957  
 926 captured volume. *Chem Phys Lipids* 64:197–217 958  
 927 52. Puvanendran D, Souabni H, Salvador D, 959  
 928 Lambert O, Cece Q, Picard M (2020) Ratio- 960  
 929 nale for the quantitative reconstitution of 960  
 membrane proteins into proteoliposomes. *Methods Mol Biol* 2168:63–72
53. Böckmann A, Gardiennet C, Verel R, 932  
 Hunkeler A, Loquet A, Pintacuda G, 933  
 Emsley L, Meier BH, Lesage A (2009) Charac- 934  
 terization of different water pools in solid-state 935  
 NMR protein samples. *J Biomol NMR* 45: 936  
 319–327 937
54. Bertini I, Engelke F, Gonnelli L, Knott B, 938  
 Luchinat C, Osen D, Ravera E (2012) On the 939  
 use of ultracentrifugal devices for sedimented 940  
 solute NMR. *J Biomol NMR* 54:123–127 941
55. Sarramegna V, Demange P, Milon A, Talmont 942  
 F (2002) Optimizing functional versus total 943  
 expression of the human mu-opioid receptor 944  
 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 24: 945  
 212–220 946
56. André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, 947  
 Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H, 948  
 Wagner R, Reinhart C (2006) Enhancing func- 949  
 tional production of G protein-coupled recep- 950  
 tors in *Pichia pastoris* to levels required for 951  
 structural studies via a single expression screen. 952  
*Protein Sci* 15:1115–1126 953
57. Rigaud JL, Lévy D (2003) Reconstitution of 954  
 membrane proteins into liposomes. *Methods 955  
 Enzymol* 372:65–86 956
58. Goddard AD, Dijkman PM, Adamson RJ, dos 957  
 Reis RI, Watts A (2015) Reconstitution of 958  
 membrane proteins: a GPCR as an example. 959  
*Methods Enzymol* 556:405–424 960





## Publication 3.

### Modular conjugation of a potent Anti-HER2 immunotoxin using co-associating peptides

Strossel A., Groysbeck N., Guyot L., Barret L., Nominé Y., Nguekeu-Zebaze L., Bender A., Voilquin L., Lutz T., Pallaoro N., Blocat M., Deville C., Masson M., Zuber G., Chatton B., Donzeau M.

*Bioconjugate Chemistry*, **31**, 10, 2421-2430 (2020)

# Modular Conjugation of a Potent Anti-HER2 Immunotoxin Using Coassociating Peptides

Audrey Stoessel, Nadja Groysbeck, Lucile Guyot, Lina Barret, Yves Nominé, Leonel Nguekeu-Zebaze, Ambre Bender, Laetitia Voilquin, Thomas Lutz, Nikita Pallaoro, Marie Blocat, Celia Deville, Murielle Masson, Guy Zuber, Bruno Chatton, and Mariel Donzeau\*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00482>



Read Online

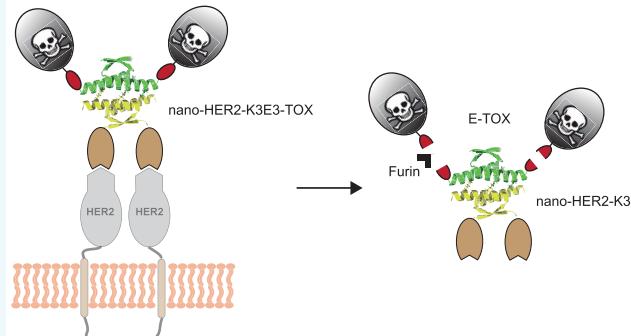
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Immunotoxins are emerging candidates for cancer therapeutics. These biomolecules consist of a cell-targeting protein combined to a polypeptide toxin. Associations of both entities can be achieved either chemically by covalent bonds or genetically creating fusion proteins. However, chemical agents can affect the activity and/or stability of the conjugate proteins, and additional purification steps are often required to isolate the final conjugate from unwanted byproducts. As for fusion proteins, they often suffer from low solubility and yield. In this report, we describe a straightforward conjugation process to generate an immunotoxin using coassociating peptides (named K3 and E3), originating from the tetramerization domain of p53. To that end, a nanobody targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (nano-HER2) and a protein toxin fragment from *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (TOX) were genetically fused to the E3 and K3 peptides. Entities were produced separately in *Escherichia coli* in soluble forms and at high yields. The nano-HER2 fused to the E3 or K3 helices (nano-HER2-E3 and nano-HER2-K3) and the coassembled immunotoxins (nano-HER2-K3E3-TOX and nano-HER2-E3K3-TOX) presented binding specificity on HER2-overexpressing cells with relative binding constants in the low nanomolar to picomolar range. Both toxin modules (E3-TOX and K3-TOX) and the combined immunotoxins exhibited similar cytotoxicity levels compared to the toxin alone (TOX). Finally, nano-HER2-K3E3-TOX and nano-HER2-E3K3-TOX evaluated on various breast cancer cells were highly potent and specific to killing HER2-overexpressing breast cancer cells with  $IC_{50}$  values in the picomolar range. Altogether, we demonstrate that this noncovalent conjugation method using two coassembling peptides can be easily implemented for the modular engineering of immunotoxins targeting different types of cancers.



## INTRODUCTION

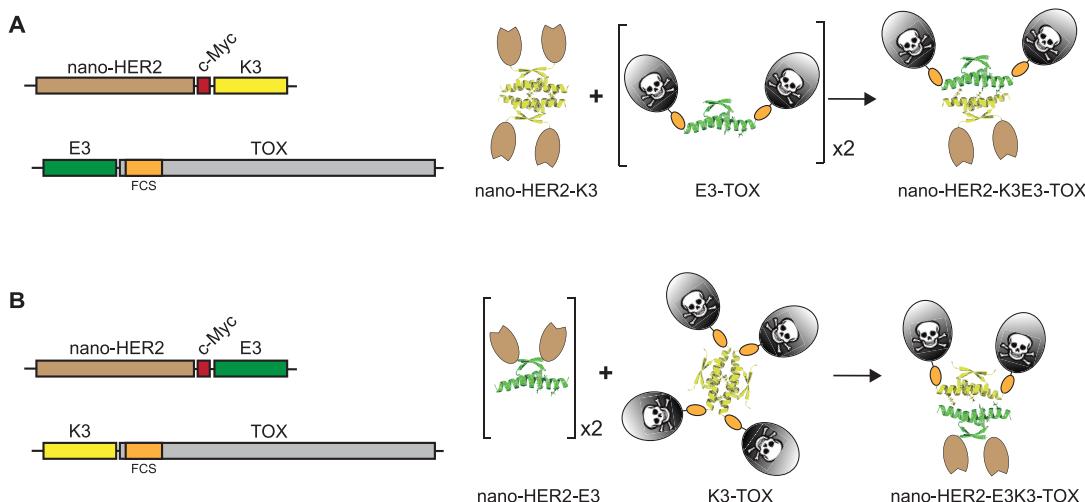
The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is a cell surface receptor overexpressed in about 15–20% of breast cancers. The amplification of HER2 is associated with tumor invasion and metastasis. The introduction of an anti-HER2 therapy using the humanized monoclonal antibody trastuzumab targeting specifically the extracellular domain of HER2 has largely improved patient care.<sup>1</sup> However, intrinsically or acquired resistance has restricted the success of the trastuzumab.<sup>2,3</sup> For two decades, new anti-HER2 therapies have been under investigation. One emerging therapeutic is immunotoxins, which combine the specific targeting of antibodies with the high cytotoxic properties of bacterial or plant protein toxins.<sup>4–6</sup> Upon specific binding to extracellular receptors and receptor-mediated endocytosis, immunotoxins get internalized into target cells, where the toxin domain unfolds its effect. These therapeutic biomolecules have demonstrated excellent anticancer properties at very low concentrations due to the enzymatic activity of the toxin

fragment, which lowers the amount of molecules needed to kill the cancer cells.<sup>7,8</sup> One of the most widely used toxin fragments originates from *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. It contains separate activities: a domain II for intracellular trafficking and a catalytic domain (domain III) inactivating the eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF-2) by ADP-ribosylation.<sup>9</sup>

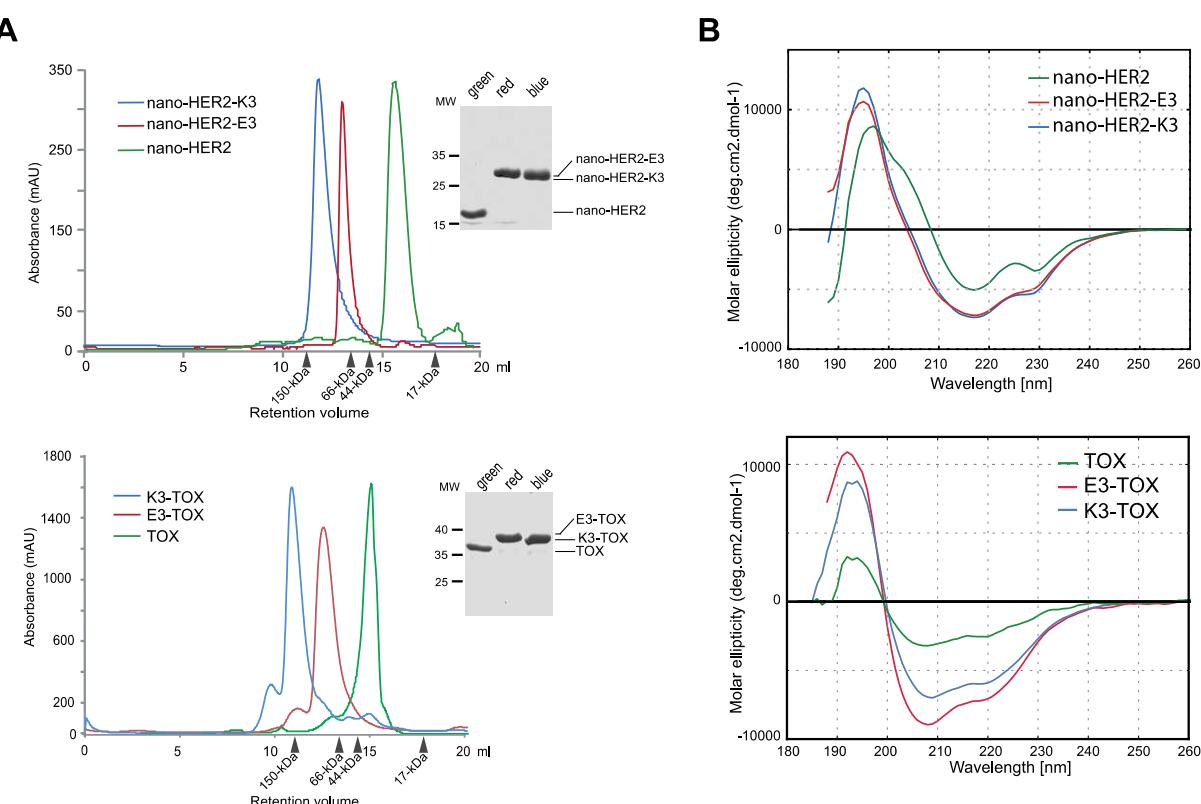
Immunotoxins can be produced as chimeric proteins. For instance, an affibody, an antibody mimetic molecule, directed against HER2 genetically fused to a modified exotoxin A fragment PE38 showed elevated cytotoxicity toward HER2-overexpressing cells.<sup>10,11</sup> However, the weaknesses of such an

Received: August 27, 2020

Revised: September 16, 2020



**Figure 1.** Representations of heterotetrameric immunotoxins. Schematic representation of either nano-HER2-K3E3-TOX (A) or nano-HER2-E3K3-TOX (B) coassembled immunotoxins with coding sequences of each module, as indicated. Theoretical oligomerization states of the corresponding proteins and the resulting coassembled immunotoxins are depicted.



**Figure 2.** Physicochemical analysis of the K3 and E3 constructs. (A) Preparative gel filtration of purified nano-HER2 derivatives (above) and TOX constructs (below). The column was precalibrated with standard proteins as indicated (IgG, BSA, ovalbumin, and cytochrome C). A sample of each peak was analyzed by SDS-PAGE and by Coomassie blue staining. (B) Far-UV circular dichroism spectra of the indicated assemblies were recorded for samples at a monomeric concentration of  $69 \mu\text{M}$  in phosphate saline buffer and are presented as an average of 10 successive scans. The CD signal is expressed in mean residue ellipticity ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ). Data were collected in the 185–270 nm range at  $20^\circ\text{C}$ .

approach are the expression level and the solubility issue of the recombinant immunotoxins. To overcome these problems, both the targeting and toxin moieties can be produced separately and are then chemically conjugated.<sup>12,13</sup> For example, the scFv (single chain variable fragment) of trastuzumab and a minimal exotoxin A fragment (PE24) that were expressed independently and conjugated via a disulfide bond-containing linker had strong cytotoxic effects on HER2

breast cancer cells.<sup>13</sup> However, the drawback of such an approach is the use of reducing agents, leading to improper protein folding and therefore lowering solubility and/or activities of the conjugate proteins. Moreover, additional purification steps are required to isolate the desired conjugate from the byproducts present in the conjugation mixture. These additional purification steps often result in low yields and make

the chemical conjugation a time-consuming and cost-ineffective process.

In this study, we report a novel straightforward conjugation procedure based on the coassembly of a single chain antibody (nanobody or VHH) targeting HER2 receptor and a truncated variant of the exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa* via two peptides (named E3 and K3), originating from the tetramerization domain of p53 (residues 325–355).<sup>14</sup> These peptidic domains consist of a  $\beta$ -strand followed by an  $\alpha$ -helix. The  $\alpha$ -helical charged interface involving lysine and acid glutamic residues (E343, E346, and K351) modulates tetramer stability through salt bridges. Thus, charge-reversal mutations at positions 343, 346, and 351 were previously shown to favor heterotetramerization.<sup>15</sup> While E3 (variants E343, E346, and E351) associates solely into dimers through  $\beta$ -strand interactions, K3 (variants K343, K346, and K351) forms tetramers with low stability. However, when mixed together in equimolar amounts, these peptides associate exclusively into the dimer of primary dimers. This noncovalent interaction between E3 and K3 peptides was demonstrated to be strong and specific enough to allow the heterotetramerization of macromolecules inside living cells for the engineering of bifunctional biomolecules.<sup>16</sup> Using this technology to coassemble a nanobody anti-HER2 with a truncated optimized fragment of the exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*, we generate extremely stable heterotetrameric immunotoxins having a specific cytotoxic activity on HER2 positive breast cancer cells.

## RESULTS

**Design of the Immunotoxin.** We designed novel immunotoxins able to coassemble via E3 and K3 peptides (Figure 1A and B).<sup>16</sup> We choose a nanobody targeting the extracellular domain of HER2 (henceforth referred to as nano-HER2).<sup>17,18</sup> The nano-HER2 sequence was genetically fused to the N-terminal part of the K3 sequence (Figure 1A).<sup>16</sup> The selected toxin module derives the *Pseudomonas* exotoxin A variant PE24,<sup>19,20</sup> where the intracellular trafficking domain has been replaced by a furin cleavage site (FCS) described elsewhere,<sup>21</sup> and the B-cell epitopes and the protease-sensitive regions have been removed.<sup>20</sup> This toxin part (hereinafter referred to as TOX) was then genetically fused to the C-terminal part of the E3 peptide (Figure 1A). The design of the immunotoxin was also carried out to obtain the opposite configuration, namely nano-HER2-E3 combined with K3-TOX, giving rise to nano-HER2-E3K3-TOX (Figure 1B).

**Production, Yield, and Oligomeric States of the Recombinant Proteins.** Recombinant VHH and TOX moieties were produced at high levels in *Escherichia coli* (Figures S1A and S2A) and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) followed by preparative size exclusion chromatography (SEC) (Figure S1B and C and Figure S2B and C). Typical elution profiles revealed that the unfused nano-HER2 displayed a single peak with an apparent molecular weight of 21 kDa corresponding to a theoretical molecular weight of a monomer, while nano-HER2-E3 and nano-HER2-K3 behaved like a 63 kDa dimer and a 105 kDa tetramer, respectively (Figure 2A and Table S1). TOX constructs gave the same results in terms of oligomeric states, namely a homodimer of 68 kDa for E3-TOX and a homotetramer of 152 kDa for K3-TOX, respectively (Figure 2A). In all cases, single peaks were observed indicating an oligomerization state of nearly 100%. The final yields of the

recombinant proteins after the two purification steps (Figures S1C and S2C) were around 100 mg/L for the nano-HER2-E3 and nano-HER2-K3 and in the range of 7–10 mg/L for the E3-TOX and K3-TOX (Table S2).

The secondary structure content of the recombinant proteins was next explored using far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy, and the content of the secondary structure elements was estimated using CDPro suite software.<sup>22</sup> The far-UV CD spectra of the tagged E3 and K3 constructs are highly similar (Figure 2B). The nano-HER2-E3 and the nano-HER2-K3 folded in  $18\% \pm 1$  and  $16\% \pm 1$  of the  $\alpha$ -helix, compared to  $5\% \pm 2$  for the parental nano-HER2, indicating a rough increase of 27–32 amino acids in an  $\alpha$ -helix conformation per monomer (Figure 2B and Table 1). These predictions are in

**Table 1. Secondary Structure Contents of the Constructs<sup>a</sup>**

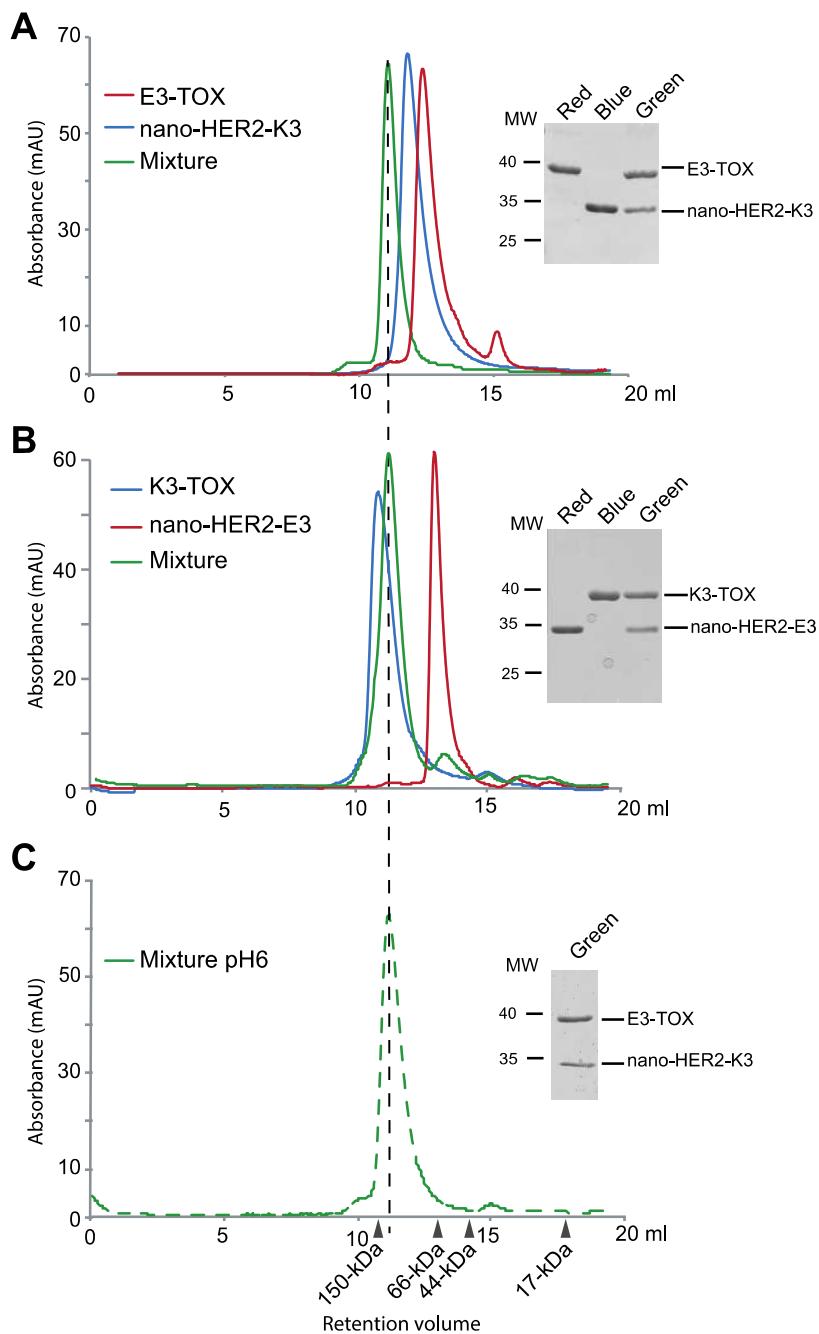
	alpha		beta		others	
	%	aa	%	aa	%	aa
nano-HER2	5 $\pm$ 2	7	41 $\pm$ 8	61	54 $\pm$ 9	79
nano-HER2-E3	19 $\pm$ 1	39	30 $\pm$ 3	64	52 $\pm$ 2	110
nano-HER2-K3	16 $\pm$ 1	34	33 $\pm$ 3	70	51 $\pm$ 3	109
TOX	7 $\pm$ 2	20	39 $\pm$ 3	114	54 $\pm$ 4	156
E3-TOX	20 $\pm$ 2	61	28 $\pm$ 2	88	53 $\pm$ 3	166
K3-TOX	17 $\pm$ 1	53	31 $\pm$ 2	98	52 $\pm$ 2	164

<sup>a</sup>aa refers to the numbers of amino acids determined considering the percentage of each secondary structure content and assuming a single element.

agreement with previous results where adding E3 or K3 peptide to a con1 construct leads to an increase of almost 30 amino acid residues in the  $\alpha$ -helix.<sup>16</sup> Regarding the TOX proteins, the  $\alpha$ -helix portions increased in a similar way as for the nanobody constructs when compared to the parental TOX (Figure 2B and Table 1). Thus, secondary structures following the addition of the E3 or K3 peptides stayed almost constant regardless of the constructs.

Finally, the thermal stability evaluation of the nano-HER2 recombinant proteins was performed using a fluorescence-based thermal shift assay (Figure S3). The melting profiles of the recombinant proteins were highly similar, indicating that the fusion of the tagged constructs did not compromise the intrinsic stability of the VHH domain.

**In Vitro Formation of the Heterotetramer Complexes.** Following the two purification steps, we studied the efficiencies of coassociation between the nanobody and toxin modules in various conditions. The evaluation of the modularity and efficiency of heteromerization was first analyzed in phosphate saline buffer at pH 7.4 using size exclusion chromatography (SEC). When equimolar amounts of either nano-HER2-E3 and K3-TOX or nano-HER2-K3 and E3-TOX proteins were mixed together and analyzed by SEC, an apparent 125 kDa complex was produced, which was compatible with the theoretical molecular weight of the heterotetramer (Figure 3A and B and Table S1). Thus, both elution profiles confirmed that the homotetramer dissociates to the benefit of a more stable heterotetrameric complex. As the extracellular micro-environment of a solid tumor is acidic,<sup>23</sup> the stability of the coassembled immunotoxin nano-HER2-K3E3-TOX was assessed at low pH. Equimolar amounts of nano-HER2-K3 and E3-TOX were mixed together and run on the size exclusion chromatography in PBS pH 6. As shown in Figure 3C, the nano-HER2-K3E3-TOX complex runs exactly at the same



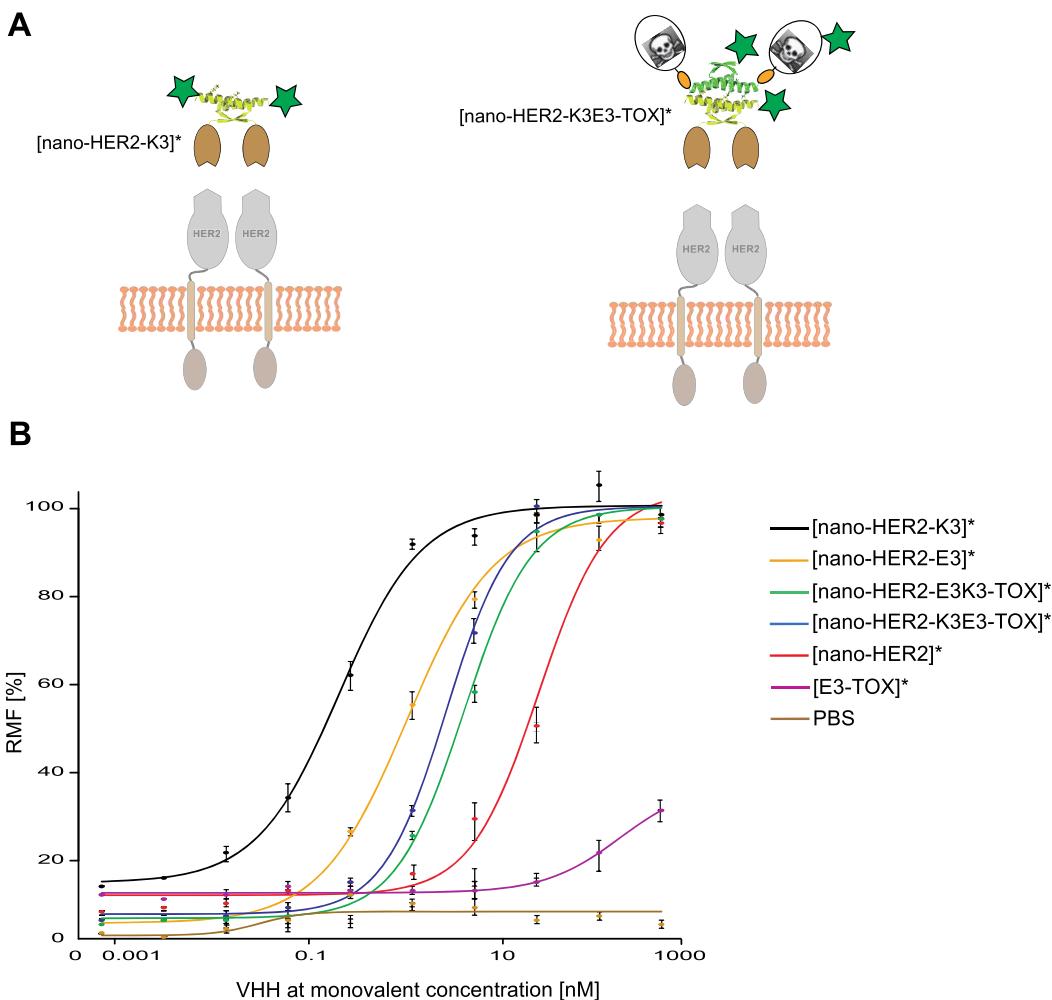
**Figure 3.** Coassociation of the immunotoxins. Gel filtration of (A) purified nano-HER2-K3 (blue), E3-TOX (red), and a mixture of equimolar amounts of nano-HER2-K3 and E3-TOX (green), (B) purified nano-HER2-E3 (red), K3-TOX (blue), and a mixture of equimolar amounts of nano-HER2-E3 and K3-TOX (green), and analysis by SDS-PAGE and Coomassie blue staining of the peak fractions. (C) Gel filtration of coassembled nano-HER2-K3/E3-TOX immunotoxin run at pH 6 (dotted green line) and SDS-PAGE and Coomassie staining analysis of the peak fraction.

apparent molecular weight as the complex formed at pH 7.4. Thus, the nano-HER2-K3E3-TOX is stable at pH 6.

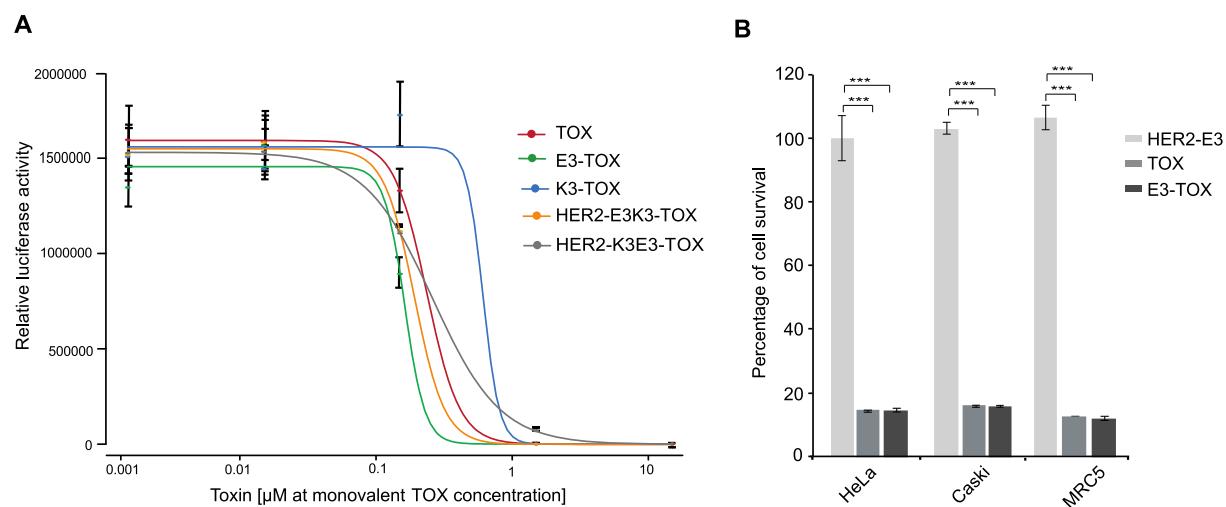
The quality of the protein assemblies with regard to the colloidal stability was monitored by dynamic light scattering analysis (DLS) (Figure S4). All complexes, including the heterotetramers, display apparent hydrodynamic diameters of size below 14 nm with a low polydispersity index (PDI) in the range of 0.20, with the complete absence of unwanted protein aggregates.

**The Nanobodies and the Coassociated Immunotoxins Retain Cell-Binding Properties.** To assess whether the

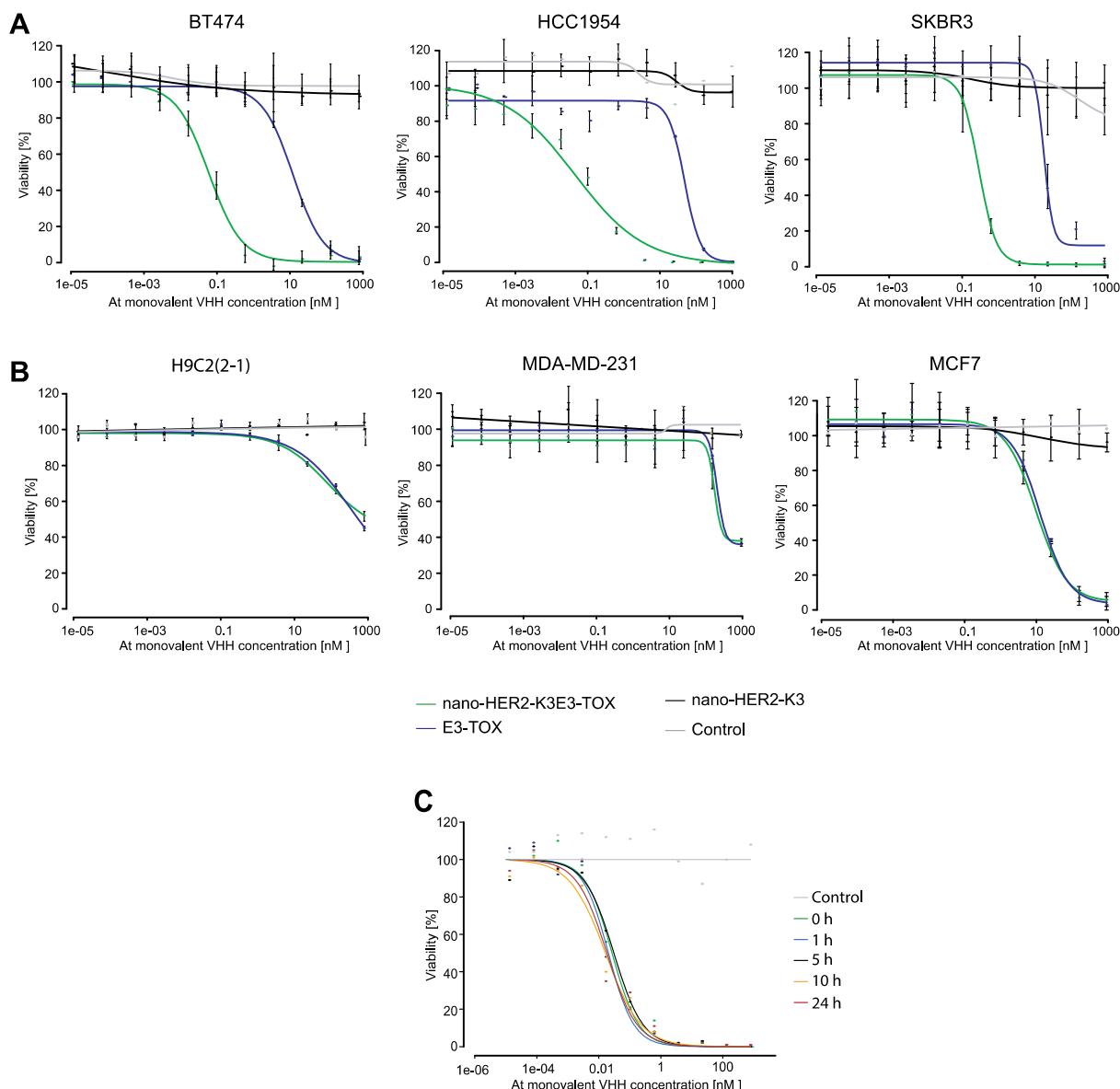
formation of heterodimers via E3 and K3 helices does not affect the binding of the nano-HER2, the binding efficiencies of the nanobodies and coassembled immunotoxins were then measured on HER2-positive HCC1954 cells to determine relative binding constants. Thus, the recombinant proteins were randomly conjugated to NHS-Alexa488 dye via lysine residues and compared to the labeled parental nano-HER2 (Figure 4A and Figure S5A). Following incubation with HCC1954 cells, fluorescence signals were measured using fluorescence-activated cell sorting (FACS). As shown in Figure 4B, monovalent nano-HER2 displayed an apparent binding



**Figure 4.** Apparent binding constants of the constructs on antigen-overexpressing cells. (A) Cartoon representing the binding of the labeled constructs [\*] on the HER2 cell surface receptor. (B) HCC1954 cells were titrated by increasing amounts of Alexa488-labeled recombinant proteins, as indicated [\*]. Following incubation, the fluorescence was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The relative mean of fluorescence (RMF) was plotted against the nanobody concentration (at monovalent concentration), and  $K_d$  values were determined using sigmoidal fitting with R software ( $n \geq 6$ ) and SD.



**Figure 5.** Cytotoxicity of the TOX modules. (A) Toxins and immunotoxins inhibit protein translation. Recombinant proteins were tested in an *in vitro* transcription/translation assay using rabbit reticulocyte lysate and the luciferase activity. This assay was performed in triplicate. Sigmoidal curve fitting was performed using R software. (B) TOX and E3-TOX-purified proteins were electrotransferred into various cell lines. After 72 h, the cell viability was estimated as a percentage relative to cells transduced with PBS buffer. Analysis corresponds to at least an average of three independent experiments. Error bars represent standard deviations. The student's *t* test was performed: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 6.** Immunotoxin nano-HER2-K3E3-TOX shows high cytotoxicity and specificity for HER2-overexpressing cells. (A) HER2-positive and (B) HER2-negative cells were treated for 72 h with the nano-HER2-K3E3-TOX, nano-HER2-K3, and E3-TOX alone ( $n \geq 10$ ). (C) HER2-positive HCC1954 cells were treated for 72 h with the nano-HER2-K3E3-TOX previously incubated in 80% serum at 37 °C for various times, as indicated. The relative cell viability to untreated cells was plotted against antibody concentrations, and  $IC_{50}$  values were determined using sigmoidal fitting with R software.

constant ( $EC_{50}$ ) of 21.8 ( $\pm 4.8$ ) nM, somewhat lower than the value previously described elsewhere on HER2-positive SKBR3 cells.<sup>15</sup> The same experiment performed with the homodimer nano-HER2-E3 and the homotetramer nano-HER2-K3 exhibited relative binding efficiency values 1.0 ( $\pm 0.1$ ) and 0.2 ( $\pm 0.1$ ) nM, indicating an increased binding efficiency of around 20- and 100-fold, respectively. These results pointed to an avidity effect of the dimer and tetramer nanobodies for improved binding to the HER2 receptor. However, labeling either the E3- or K3-TOX module prior to assembly with the respective nanobody counterpart resulted in a significant drop in the binding constants (Figure S5B). This result was likely due to a steric hindrance of the fluorophore preventing association between the toxin and the VHH modules as shown by analytical gel filtration (Figure S5C). Thus, labeling purified immunotoxin complexes resolved this issue (Figure S5).

Indeed, Alexa488-labeled immunotoxin complexes displayed only a slightly lower binding efficiency than their respective nanobody counterparts (Figure 4A and 4B). Nano-HER2-K3E3-TOX immunotoxin exhibited an  $EC_{50}$  of  $2.5 \pm 0.3$  nM and the nano-HER2-E3K3-TOX immunotoxin an  $EC_{50}$  of  $3.7 \pm 0.4$  nM. No detectable binding was observed on HER2 low-expressing cells MDA-DB-231 or on HER2-silenced HCC1954 cells using small-interfering oligonucleotides (Figure S6A and S6B).

Overall, these results demonstrate the binding efficiency and specificity of the coassociated immunotoxins on the HER2 cell surface receptor.

**Coassembly of the Toxin with the Nanobody via E3 or K3 Peptides Does Not Impair Its Cytotoxicity.** Because oligomerization may harm the structural and functional integrity of the toxin, we evaluated the enzymatic activities

Table 2. Cytotoxicity of the Immunotoxin on Target and Control Cells

biomolecule	BT474 IC <sub>50</sub> (pM)	HCC1954 IC <sub>50</sub> (pM)	SKBR3 IC <sub>50</sub> (pM)	MDA-MB-231 IC <sub>50</sub> (pM)	MCF7 IC <sub>50</sub> (pM)
nano-HER2-K3E3-TOX	30.0 ± 4.0	39.0 ± 15	160 ± 25	>300000	6250 ± 150
E3-TOX	5550 ± 80	16710 ± 150	10380 ± 230	>300000	8020 ± 150
nano-HER2-K3	NA	NA	NA	NA	NA
ratio ER	185	595	65	n.d.	n.d.

of the toxins and the immunotoxins using an *in vitro* coupled transcription/translation assay using rabbit reticulocyte lysate and a luciferase reporter gene (Figure 5A). Increasing concentrations of either TOX, E3-TOX, K3-TOX, or the coassembled immunotoxins were added to the lysate in the presence of NAD<sup>+</sup>, the essential cofactor for the ADP-ribosylation of the eEF-2 elongation factor.<sup>24</sup> Translation efficiencies were monitored by measuring luciferase activities (Figure 5A). Determination of the inhibition dose-response curve yielded a half-inhibition (IC<sub>50</sub>) at 235 (±45) pM for the TOX comparable to the E3-TOX at 164 (±30) pM and both coassembled immunotoxins, HER2-E3K3-TOX and HER2-K3E3-TOX, with IC<sub>50</sub> of 160 (±15) and 260 (±20) pM, respectively. The homotetramer K3-TOX showed a slightly reduced inhibition activity with an IC<sub>50</sub> of 610 (±50) pM. Thus, the addition of the helix and the coassembly of the nanobody with the toxin via E3 or K3 peptides did not compromise the enzymatic activity of the toxin.

The cytotoxic activities of all constructs were then also assessed by electrotransferring the recombinant proteins and complexes into various cell lines.<sup>25</sup> Both TOX and E3-TOX moieties yielded more than 90% of cell death after 72 h (Figure 5B). As a control, the transduced nano-HER2-E3 did not have any cytotoxic effects.

**Specific Cytotoxicity of the Immunotoxins on HER2-Positive Breast Cancer Cells.** Given the high binding affinity of the nano-HER2 for HER2 positive cancer cells and the high cytotoxicity of the TOX modules, we sought to determine the cytotoxicity of the coassembled immunotoxins.

Thus, the cytotoxic effect and the specificity of the coassembled immunotoxin, nano-HER2-K3E3-TOX, were evaluated on different breast cancer cell lines being either HER2-positive or HER2-negative. Three HER2-positive (HCC1954, BT474, and SKBR3), two HER2-negative (MCF7 and MDA-MB-231), and a nonhuman myoblastic cell line (H9C2(2–1) rat) were tested.<sup>26</sup> The cells were incubated for 72 h with increasing concentrations of either the immunotoxin nano-HER2-K3E3-TOX or the nano-HER2-K3 or the E3-TOX complexes (Figure 6A and 6B). The nano-HER2-K3E3-TOX revealed high cytotoxicity at picomolar levels on the HER2-overexpressing cell lines, compared to the toxin and to the VHH alone. The IC<sub>50</sub> values for BT474, HCC1954, and SKBR3 cells were 30 (±4), 39 (±15), and 160 (±25) pM, respectively (*n* ≥ 10) (Figure 6A and Table 2). The toxin alone, E3-TOX, had lower cytotoxic effects, in the range of 5–10 nM for HER2-positive cells and for MCF7 cells (Table 2). Thus, the nano-HER2-K3E3-TOX immunotoxin was 185-, 595-, and 65-fold more potent on HCC1954, BT474, and SKBR3 cells, respectively, compared to the free toxin (E3-TOX) (Figure 6A and Table 2). No significant differences between the free toxin and the immunotoxin were noted in HER2-negative cells, supporting the notion that HER2 overexpression increases the uptake of the immunotoxin (Figure 6B and Table 2). In fact, MCF7, HER2-negative cell line, was affected to the same extent by the free toxin and by

the immunotoxin with an IC<sub>50</sub> from 8.02 to 6.20 nM (±0.15). Of note, the viability of MDA-MB-231, as well as H9C2(2–1) cell lines, was not affected by the immunotoxin (IC<sub>50</sub> ≥ 300 nM) (Figure 6B and Table 2). Similarly, the opposite configuration, namely the nano-HER2-E3K3-TOX, displayed the same cytotoxicity as the nano-HER2-K3E3-TOX on HER2-positive cell lines and no effects on MDA-MB-231 (Figure S7 and data not shown).

The proteolytic stability of the constructs was also assessed by incubating both immunotoxins in 80% of serum (FBS) at 37 °C for 1, 5, 12, and 24 h. Immunotoxin cytotoxicity was then tested on HER2-positive HCC1954 cells. Nano-HER2-K3E3-TOX retained its full cytotoxic activity even after a 24 h incubation in serum at 37 °C with an IC<sub>50</sub> of 27.0 (±6.3) pM (Figure 6C).

Altogether, these results indicate that the cytotoxicity of both immunotoxins is dependent on the specific association between the nano-HER2 and the toxin via the E3 and K3 helices and correlates with the presence of the HER2 receptor on the cell's surface. In addition, they show that the immunotoxin complexes are very stable at pH 6.00 as well as in serum.

## DISCUSSION

In this study, we developed a straightforward coassembly technique to produce an immunotoxin combining a nanobody directed against HER2 and a toxin via two peptides E3 and K3.<sup>16</sup> The noncovalent and highly specific pairing of the E3 and K3 peptides yielded the generation of heterotetrameric immunotoxins, composed of two VHH and two toxin molecules. We clearly demonstrate that the engineered immunotoxins retain their specific binding and toxic properties, hence being specifically toxic for HER2-overexpressing breast cancer cells.

Because the production of immunotoxins is impeded in eukaryotic cells due to their high toxicity, most engineering applications for their production rely on the design of chimeras produced in *E. coli*.<sup>10,11,20</sup> However, fusion proteins often suffer from low solubility and low yield.<sup>10,27</sup> For example, an affibody anti-HER2 fused to a PE38 fragment from the exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* was not soluble and was purified from the inclusion bodies<sup>10</sup> while a chimeric recombinant immunotoxin composed of a VHH directed against the vascular endothelial growth factor receptor 2 and the PE38 fragment was produced at a final yield of 9.2 mg/L.<sup>27</sup> Another strategy is to generate both moieties independently, which in addition to improved yield and solubility makes it possible to produce the antibody domain in eukaryotic cells. Different protein conjugation strategies have been explored. For instance, a HER2-scFv fragment has been chemically conjugated to PE24 via *N*-succinimidyl-3-(2-pyridylidithio)-propionate (SPDP).<sup>13</sup> The HER2-(scFv)-PE24 end product was then purified by size exclusion chromatography. However, the highest yield of the obtained conjugation was only 58% and required additional purification steps. An elegant protein trans-

splicing (TPS) technology was also reported for the conjugation of either the trastuzumab-targeted HER2 or two VHJs targeting different epitopes of HER1 (EGFR) to the PE24 fragment of the exotoxin A from *Pseudomonas*.<sup>12</sup> Coupling efficiencies in the range of 50–70% were achieved, and it was not possible to distinguish molecules with a toxin/antibody ratio of 2 from those with partial coupling. Finally, an additional step was also required to remove the unconjugated mAb.

The use of coassembling peptides offers several significant advantages. Both moieties can be produced separately, overcoming solubility and yield issues reported for the chimeric immunotoxins. Indeed, the VHH was produced at a yield of 100 mg/L, and the toxin module showed a high solubility yield. In addition, neither reduction nor chemical conjugation is required, thereby avoiding subsequent purification steps, making it a very simple and convenient technology. Following the assembly of the nano-HER2 and the toxin via E3 and K3, the heterotetramer immunotoxin complexes were able to efficiently and specifically kill HER2-expressing breast cancer cells. In addition, the bivalence format of the nanobody can probably trigger an efficient cellular uptake through receptor clustering.<sup>28,29</sup> Upon endocytosis, the toxin part can be cleaved from the immunotoxin by the furin protease at the FCS in the early endosome, and the enzymatic domain can reach the cytosol, where it finally inhibits translation.<sup>8</sup> The cytotoxicity of the immunotoxins was highly specific to HER2-overexpressing cells with an efficacy of more than 65-fold compared to the toxin alone or to HER2 low-expressing or HER2 negative cells.

The present study describes a very straightforward process for generating an immunotoxin without chemical conjugation and additional purification steps to remove unreacted compounds and side products from the desired conjugation product. The association between E3 and K3 helices ensures a highly homogeneous end product. In addition, this fully modular technology enables the replacement of the nano-HER2 moiety with any other target-specific binding domain to target other types of cancer cells. Finally, the possibility to produce both entities separately overcomes the solubility and yield issues of a full recombinant immunotoxin and offers the possibility to express the target moiety in an eukaryotic organism, to achieve post-translational modifications if needed, for proper folding or activity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Lines.** HCC1954, MDA-MB-231, BT474, and H9C2 (2–1) cell lines were maintained as monolayers in RPMI without Hepes, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and gentamycin. MCF7, Caski, HeLa, MRC5, and SBKR cell lines were maintained as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (1 g/L glucose) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and gentamycin. For BT474 and MCF7, the medium was supplemented with 10 µg/mL insulin.

**Recombinant Plasmid Constructions.** Nano-HER2 DNA sequences described elsewhere<sup>18</sup> were amplified by PCR using HER2-For GATATACCATGGAAGTT-CAACTGG and HER2 -Rev ATGTTGCACT-TAGTTGCAGGCCAGAGCTAACCGTCACTTGGG-TACC primers. The HER2 PCR fragment was digested with NcoI-SpeI and ligated into the pETOM-P40M1-E3 or -K3 digested with NcoI-SpeI to replace the P40M1 sequences.<sup>16</sup> An optimized sequence encoding for the TOX used in this

study was synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT) and amplified by PCR using specific primers: for-TOX TCTACTAGTGCATGGGTCTGGTGGCTGT and Rev-TOX: GAGCTTAAGAATAATGTTAAGTAGAAAG. The resulting PCR fragment digested with SpeI-EcoRI with has been then cloned into SpeI-EcoRI of the pETOM-E3 and pETOM-K3.<sup>16</sup> The E3 and K3 sequences were amplified by PCR using NheI-K3-For GCTCGCTAGCGGTAACACAC-CAGCTCCTCTC and HindIII-K3-Rev GCTCAAGCTTT-TAACCCCCCTGGCTCCTCCCAGCC oligonucleotides and cloned into a pET6His-eGFP vector.

**Expression and Purification of the Recombinant Fusion Proteins.** Briefly, E3 and K3 fusion proteins were overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS with 0.5 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG). After 24 h at 20 °C, the cells were harvested and resuspended in 20 mM phosphate buffer pH 8, 250 mM NaCl, and 10 mM imidazole. Following lysis in a cell disruptor (Constant Systems Ltd.), cell debris was removed by ultracentrifugation, and the supernatant was applied to IMAC chromatography charged with cobalt (GE Healthcare Saclay, France). IMAC-purified proteins were subsequently loaded on a HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade column or on Superdex 200 Increased 10/300 (GE Healthcare, Biosciences AB, Sweden) operating at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions were separated on SDS-PAGE gels and analyzed by Coomassie blue. The heterotetramers were prepared by incubating together E3 and K3 targeted recombinant proteins at a 1:1 molar ratio for 5 min at RT followed in some experiments by a second purification on a Superdex 200 Increased 10/300 GL size exclusion chromatography. Complex formation between labeled recombinant proteins was control by analytical chromatography on a Superdex 200 Increased 5/150 GL.

**Protein Labeling.** Recombinant proteins were labeled with NHS-Ester Alexa488 dye using a DyLight TM Microscale Antibody Labeling Kit following the protocol as described by the manufacturer (Thermo-Scientific, USA). Labeled proteins are indicated as [\*] in text and figures.

**In Vitro Protein Transcription/Translation Inhibition Assay.** The inhibition of protein translation was performed using rabbit reticulocyte lysate (RRL) (Promega) and by measurement of luciferase activity. The assay was performed as suggested by the manufacturer (Promega) in a total volume of 15 µL. Briefly, RRL was mixed with T7 expression plasmid encoding for the firefly luciferase and incubated for 90 min at 30 °C with or without increasing the concentration of recombinant TOX. Then 5 µL of each reaction was transferred to a black 96-well plate and assayed for luciferase activity, as previously described.<sup>30</sup> A control without any protein added served as a positive control and was set as the relative protein translation of 100%. At least three independent experiments were carried out.

**Circular Dichroism.** CD experiments were performed at 20.0 ± 0.1 °C on a Jasco J-815 spectropolarimeter with 0.1 mm path-length quartz-Suprasil cells (JASCO Inc., Easton, MD). Acquisition parameters as continuous scan rate, response time, and bandwidth were 50 nm/min, 1.0 s, and 1 nm, respectively. The absorbance of the buffer and the sample was kept as low as possible to ensure good signal-to-noise ratio. All spectra are systematically corrected by subtracting the solvent spectrum obtained under identical conditions.

**Thermal Shift Assay.** TSA experiments were carried out on real-time PCR systems (StepOnePlus; Applied Biosystems,

Darmstadt, Germany). Purified nano-HER2, nano-HER2-E3, and nano-HER2-K3 were mixed with diluted Sypro Orange dye (final 2500-fold dilution from stock solution; Invitrogen, Carlsbad, CA) in phosphate-buffered saline, pH 7.4 to a final volume of 20  $\mu$ L and a final protein concentration of 5  $\mu$ M. The samples were submitted to a denaturation kinetic from 25 to 95 °C at a rate of 1 °C/min. The fluorescence of Sypro Orange dye was recorded in real time (excitation with a blue LED source and emission filtered through a ROX emission filter). The fluorescence profiles were fitted to a Boltzmann sigmoid equation to determine the melting temperature. Each experiment was repeated four times.

**Dynamic Light Scattering Analysis (DLS).** DLS was performed at 25 °C using different protein concentrations on a Malvern Zetasizer device (Malvernpanalytical). Results analysis was performed using Zetasizer software.

**Transient siRNA transfections.** Transient siRNA transfections were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, P/N 56532) according to the manufacturer's instructions. STARD3-targeting siRNAs and HER2-targeting siRNAs were SMARTpool ON-TARGETplus obtained from Dharmacon. For controls, siRNAs ON-TARGETplus non-targeting pool from Dharmacon were used. siRNAs were used at 10 nM final concentration, and cells were transfected 24–72 h prior to experiments.

**Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS).** Trypsinized cells were incubated with a mixture of equimolar ratios of recombinant proteins as indicated, for 30 min at 4 °C in PBS, 0.5% BSA, and 2 mM EDTA. Cells were washed twice in PBS, 0.5% BSA, and 2 mM EDTA and analyzed with BD Accuri C6 Plus flow cytometer (BD Bioscience). The relative mean fluorescence intensities were normalized and plotted against the concentration of the nano-HER2 at monomer concentration. The data shown here are single point measurements.

**Cytotoxicity Assay.** Five thousand cells were seeded per well in a 96-well plate and incubated for 24 h. Cells were then treated with increased concentrations of toxin, VHH, or immunotoxins. After 72 h, a crystal violet assay was conducted.<sup>31</sup> The absorbance was measured in a Tecan reader (595 nm). IC<sub>50</sub> values were calculated by fitting a sigmoidal model with R software. Wells with cells treated with PBS were set at 100% of cell viability.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.0c00482>.

DNA and proteins sequences, figures showing additional representations of the immunotoxin, purification steps, and SEC analysis of recombinants proteins, thermal stability profiles, and cell viability assays with recombinant immunotoxin (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

**Mariel Donzeau** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France;  
ORCID.org/0000-0002-1145-9218;  
Email: [mariel.donzeau@unistra.fr](mailto:mariel.donzeau@unistra.fr)

## Authors

- Audrey Stoessel** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Nadja Groysbeck** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Lucile Guyot** — IMPReS Facility, Biotechnology and Cell Signaling, CNRS—University of Strasbourg, Illkirch, F-67412 Illkirch, France; NovAliX, F-67405 Illkirch, France
- Lina Barret** — IMPReS Facility, Biotechnology and Cell Signaling, CNRS—University of Strasbourg, Illkirch, F-67412 Illkirch, France
- Yves Nominé** — Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, F-67400 Illkirch, France
- Leonel Nguekeu-Zebaze** — Université de Strasbourg, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Ambre Bender** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Laetitia Voilquin** — Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, F-67400 Illkirch, France
- Thomas Lutz** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Nikita Pallaoro** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Marie Blocat** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Celia Deville** — Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, F-67400 Illkirch, France
- Murielle Masson** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France
- Guy Zuber** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France;  
ORCID.org/0000-0001-8032-2410
- Bruno Chatton** — Université de Strasbourg, UMR7242  
Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France

Complete contact information is available at:  
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00482>

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds and/or fellowships from the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Strasbourg, the French Ministry of Research, and the Ligue Régionale contre le Cancer (CCIR-GE). The CD device was funded with the help of the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC n.8008). L.G. is supported by a grant from the French ANRT agency (CIFRE No. 2018/1643). We thank C. L. Tomasetto and J. C. Amé for very helpful advice and R. Wagner for the anti-HER2 nanobody clone.

## ■ REFERENCES

- (1) Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer, C. E., Davidson, N. E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P. A., Swain, S. M., Pisansky, T. M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L. A., Vogel, V. G., Visscher, D. W., Yothers, G., Jenkins, R. B., Brown, A. M., Dakhlil, S. R., Mamounas, E. P., Lingle, W. L., Klein, P. M., Ingle, J. N., and Wolmark, N. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1673–1684.
- (2) von der Heyde, S., Wagner, S., Czerny, A., Nietert, M., Ludewig, F., Salinas-Riester, G., Arlt, D., and Beissbarth, T. (2015) mRNA Profiling Reveals Determinants of Trastuzumab Efficiency in HER2-Positive Breast Cancer. *PLoS One* 10, e0117818.
- (3) Chakrabarty, A., Bhola, N. E., Sutton, C., Ghosh, R., Kuba, M. G., Dave, B., Chang, J. C., and Arteaga, C. L. (2013) Trastuzumab-Resistant Cells Rely on a HER2-PI3K-FoxO-Survivin Axis and Are Sensitive to PI3K Inhibitors. *Cancer Res.* 73, 1190–1200.
- (4) Simon, N., and Fitzgerald, D. (2016) Immunotoxin Therapies for the Treatment of Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Cancers. *Toxins* 8, 137.
- (5) Kreitman, R. J. (2006) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J.* 8, E532–51.
- (6) Wayne, A. S., Fitzgerald, D. J., Kreitman, R. J., and Pastan, I. (2014) Immunotoxins for leukemia. *Blood* 123, 2470–2477.
- (7) Tsuchikama, K., and An, Z. (2018) Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell* 9, 33–46.
- (8) Wolf, P., and Elsässer-Beile, U. (2009) Pseudomonas exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 161–176.
- (9) Michalska, M., and Wolf, P. (2015) Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front. Microbiol.* 6, 958.
- (10) Amiri Tehranizadeh, Z., Sankian, M., Fazly Bazzaz, B. S., Chamani, J., Mehri, S., Baratian, A., and Saberi, M. R. (2019) The immunotoxin activity of exotoxin A is sensitive to domain modifications. *Int. J. Biol. Macromol.* 134, 1120–1131.
- (11) Guo, R., Cao, L., Guo, W., Liu, H., Xu, H., Fang, Q., and Hong, Z. (2016) HER2-targeted immunotoxins with low nonspecific toxicity and immunogenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 475, 93–99.
- (12) Pirzer, T., Becher, K.-S., Rieker, M., Meckel, T., Mootz, H. D., and Kolmar, H. (2018) Generation of Potent Anti-HER1/2 Immunotoxins by Protein Ligation Using Split Inteins. *ACS Chem. Biol.* 13, 2058–2066.
- (13) Lee, S., Park, S., Nguyen, M. T., Lee, E., Kim, J., Baek, S., Kim, C. J., Jang, Y. J., and Choe, H. (2019) A chemical conjugate between HER2-targeting antibody fragment and Pseudomonas exotoxin A fragment demonstrates cytotoxic effects on HER2-expressing breast cancer cells. *BMB Rep.* 52, 496–501.
- (14) Brokx, R. D., Bolewska-Pedyczak, E., and Gariépy, J. (2003) A stable human p53 heterotetramer based on constructive charge interactions within the tetramerization domain. *J. Biol. Chem.* 278, 2327–2332.
- (15) Brokx, R. D., Bolewska-Pedyczak, E., and Gariépy, J. (2003) A Stable Human p53 Heterotetramer Based on Constructive Charge Interactions within the Tetramerization Domain. *J. Biol. Chem.* 278, 2327–2332.
- (16) Vigneron, M., Dietsch, F., Bianchetti, L., Dejaegere, A., Nominé, Y., Cordonnier, A., Zuber, G., Chatton, B., and Donzeau, M. (2019) Self-Associating Peptides for Modular Bifunctional Conjugation of Tetramer Macromolecules in Living Cells. *Bioconjugate Chem.* 30, 1734–1744.
- (17) Kijanka, M., Warnders, F.-J., El Khattabi, M., Lub-De Hooge, M., van Dam, G. M., Ntziachristos, V., de Vries, L., Oliveira, S., and van Bergen en Henegouwen, P. M. P. (2013) Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40, 1718–1729.
- (18) Hartmann, L., Botzanowski, T., Galibert, M., Jullian, M., Chabrol, E., Zeder Lutz, G., Kugler, V., Stojko, J., Strub, J.-M., Ferry, G., Frankiewicz, L., Puget, K., Wagner, R., Cianferani, S., and Boutin, J. A. (2019) VHH characterization. Comparison of recombinant with chemically synthesized anti-HER2 VHH. *Protein Sci.* 28, 1865–1879.
- (19) Hollevoet, K., Mason-Osann, E., Liu, X. F., Imhof-Jung, S., Niederfellner, G., and Pastan, I. (2014) In Vitro and In Vivo Activity of the Low-Immunogenic Antimesothelin Immunotoxin RG7787 in Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 13, 2040–2049.
- (20) Bauss, F., Lechmann, M., Krippendorff, B.-F., Staack, R., Herting, F., Festag, M., Imhof-Jung, S., Hesse, F., Pompiati, M., Kollmorgen, G., da Silva Mateus Seidl, R., Bossenmaier, B., Lau, W., Schantz, C., Stracke, J. O., Brinkmann, U., Onda, M., Pastan, I., Bosslet, K., and Niederfellner, G. (2016) Characterization of a re-engineered, mesothelin-targeted Pseudomonas exotoxin fusion protein for lung cancer therapy. *Mol. Oncol.* 10, 1317–1329.
- (21) Kaplan, G., Lee, F., Onda, M., Kolyvas, E., Bhardwaj, G., Baker, D., and Pastan, I. (2016) Protection of the Furin Cleavage Site in Low-Toxicity Immunotoxins Based on Pseudomonas Exotoxin A. *Toxins* 8, 217.
- (22) Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal. Biochem.* 287, 252–260.
- (23) Wike-Hooley, J. L., Haveman, J., and Reinhold, H. S. (1984) The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother. Oncol.* 2, 343–366.
- (24) Pastrana, D. V., and Fitzgerald, D. J. (2006) A nonradioactive, cell-free method for measuring protein synthesis inhibition by Pseudomonas exotoxin. *Anal. Biochem.* 353, 266–271.
- (25) Freund, G., Sibler, A.-P., Desplancq, D., Oulad-Abdelghani, M., Vigneron, M., Gannon, J., Van Regenmortel, M. H., and Weiss, E. (2013) Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *mabs* 5, 518–522.
- (26) Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., and Li, J. (2017) Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* 8, 3131–3141.
- (27) Behdani, M., Zeinali, S., Karimipour, M., Khanahmad, H., Schoonooghe, S., Aslemarz, A., Seyed, N., Moazami-Godarzi, R., Banahmad, F., Habibi-Anbouhi, M., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., and Muyldermans, S. (2013) Development of VEGFR2-specific Nano-body Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *New Biotechnol.* 30, 205–209.
- (28) Moody, P. R., Sayers, E. J., Magnusson, J. P., Alexander, C., Borri, P., Watson, P., and Jones, A. T. (2015) Trigger Internalization and Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes. *Mol. Ther.* 23, 1888–1898.
- (29) Wang, Q., Villeneuve, G., and Wang, Z. (2005) Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep.* 6, 942–948.
- (30) Diring, J., Camuzeaux, B., Donzeau, M., Vigneron, M., Rosa-Calatrava, M., Kedinger, C., and Chatton, B. (2011) A cytoplasmic negative regulator isoform of ATF7 impairs ATF7 and ATF2 phosphorylation and transcriptional activity. *PLoS One* 6, No. e23351.
- (31) Feoktistova, M., Geserick, P., and Leverkus, M. (2016) Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protoc.* 2016, 087379.

## Supporting Information

# Modular conjugation of a potent Anti-HER2 immunotoxin using co-associating peptides

Audrey Stoessel<sup>1</sup>, Nadja Groysbeck<sup>1</sup>, Lucile Guyot<sup>2,3</sup>, Lina Barret<sup>2</sup>, Yves Nominé<sup>4</sup>, Leonel Nguekeu-Zebaze<sup>1</sup>, Ambre Bender<sup>1</sup>, Laetitia Voilquin<sup>4</sup>, Thomas Lutz<sup>1</sup>, Nikita Pallaoro<sup>1</sup>, Marie Blocat<sup>1</sup>, Celia Deville<sup>4</sup>, Murielle Masson<sup>1</sup>, Guy Zuber<sup>1</sup>, Bruno Chatton<sup>1</sup>, and Mariel Donzeau<sup>1\*</sup>.

1 Université de Strasbourg, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, F-67412 Illkirch, France.

2 IMPReSS Facility, Biotechnology and Cell Signaling, CNRS – University of Strasbourg, Illkirch, F-67412 Illkirch, France.

3 NovAliX, Bioparc, F-67405 Illkirch, France

4 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, F-6700 Illkirch, France.

[\\*mariel.donzeau@unistra.fr](mailto:mariel.donzeau@unistra.fr)

## Protein sequences of nanobody and toxin fragments

### nano-HER2 DNA sequences

```
ATGGAAGTTCAACTGGTGGATCGGGCGGTGGTCTGGTTCAAGCAGGGCGGCTCACTGC  
GTCTGTCTGTGCTACCTCGGGCATCACGTTATGCGTTATGCACTGGGTTGGTACCGT  
CAGAGCCCGGGTAAACAAACGTGAAATGGTGCAAGTATTAACCTCCGGCGGTACACGA  
ATTATGCTGATTCACTGAAAGGCCGTTTACCATCTCGCGCGACAACGCAAAAAATACG  
GTGTACCTGCAGATGAACAGTCTGAAACCGGAAGATAACCGCGGTCTATTACTGCAATGC  
CCGCTGGGTGAAACCGCAATTGACAACAATTATTGGGGCCAGGGTACCCAAGTG  
ACGGTTAGCTCTCGGGCCGCAACTAGTGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGGATCTGAA  
TGCTAGCACGCCACTGGGTGACACGACTCATACCAGCGGTAAACAACACCAGCTCCTCT  
CCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATTTCACCCCTCAGATCCGTGGC  
GTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCGAGGGATGCCA  
GGCTGGGAAGGAGCCAGGGGTTCAAGCGGAGCTCCACATACCATCATCACCATTAA  
TAA
```

### nano-HER2

```
MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGWYRQSPGKQREMVASINSGGTTNY  
ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDNNYWGQGTQVTVS  
S
```

### Nano-HER2-E3 DNA sequences

```
ATGGAAGTTCAACTGGTGGATCGGGCGGTGGTCTGGTTCAAGCAGGGCGGCTCACTGC  
GTCTGTCTGTGCTACCTCGGGCATCACGTTATGCGTTATGCACTGGGTTGGTACCGT  
CAGAGCCCGGGTAAACAAACGTGAAATGGTGCAAGTATTAACCTCCGGCGGTACACGA  
ATTATGCTGATTCACTGAAAGGCCGTTTACCATCTCGCGCGACAACGCAAAAAATACG  
GTGTACCTGCAGATGAACAGTCTGAAACCGGAAGATAACCGCGGTCTATTACTGCAATGC  
CCGCTGGGTGAAACCGCAATTGACAACAATTATTGGGGCCAGGGTACCCAAGTG  
ACGGTTAGCTCTCGGGCCGCAACTAGTGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGGATCTGAA  
TGCTAGCACGCCACTGGGTGACACGACTCATACCAGCGGTAAACAACACCAGCTCCTCT  
CCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATTTCACCCCTCAGATCCGTGGC  
GTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCGAGGGATGCCA  
GGCTGGGAAGGAGCCAGGGGTTCAAGCGGAGCTCCACATACCATCATCACCATTAA  
TAA
```

### Nano-HER2-E3 protein

```
MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGWYRQSPGKQREMVASINSGGTTNY  
ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDNNYWGQGTQVTVS  
SAAATSEQKLISEEDLNASTPLGDTHTSGNNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMF  
RELNEALELEDAQAGKEPGGSGGAPHHHHHH
```

### Nano-HER2-K3 DNA sequences

```
ATGGAAGTTCAACTGGTGGATCGGGCGGTGGTCTGGTTCAAGCAGGGCGGCTCACTGC  
GTCTGTCTGTGCTACCTCGGGCATCACGTTATGCGTTATGCACTGGGTTGGTACCGT  
CAGAGCCCGGGTAAACAAACGTGAAATGGTGCAAGTATTAACCTCCGGCGGTACACGA  
ATTATGCTGATTCACTGAAAGGCCGTTTACCATCTCGCGCGACAACGCAAAAAATACG  
GTGTACCTGCAGATGAACAGTCTGAAACCGGAAGATAACCGCGGTCTATTACTGCAATGC  
CCGCTGGGTGAAACCGCAATTGACAACAATTATTGGGGCCAGGGTACCCAAGTG  
ACGGTTAGCTCTCGGGCCGCAACTAGTGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGGATCTGAA  
TGCTAGCACGCCACTGGGTGACACGACTCATACCAGCGGTAAACAACACCAGCTCCTCT  
CCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATTTCACCCCTCAGATCCGTGGC  
GTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAAAAGCTGAATAAGGCCTTGGAACTCAAGGGATGCCA
```

GGCTGGGAAGGAGCCAGGGGTTCAGGCAGCTCCACATCACCATCATCACCATTAA  
TAAG

#### **Nano-HER2-K3 protein**

MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGWYRQSPGKQREMVASINSGGTTNY  
ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDNNYWGQGTQVTVS  
SAAATSEQKLISEEDLNASTPLGDTTHTSGNNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMF  
RKLNKALELKDAQAGKEPGSGGAPHHHHH

#### **TOX DNA sequences**

AACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTCTGGTGGCTGTGGTGGCGGTGGTCTCGT  
CATCGTCAGCCCGTGGTGGAAACAACACTGGTGGCTCGGGTGGTCTGGTGGCGGT  
GGCTCTACCCGACAGGCGCGAGTTTGGGTGATGGCGGTGACGTGTCTTCTCCA  
CGCGTGGTACTCAAATTGGACAGTCGAACGTCTGTCAGGCCACGCGCAACTGGA  
GGAACGTGGTACGTATTCTAGGCTATCACGGTACCTTCTGGAGGCCGCGCAATCC  
ATTGTTTGGTGGCGTTGCAGCGCTCAAGATCTGGGGCAATCTGGGAGGTT  
CTATATCGCTGGCGACCCCGCTCGGCTTACGGCTATGCCCAAGATCAAGAACCGAT  
GCAGCCGGTCGTATTGCAACGGTCTTGCTGCGTGTACGTTCCGGCATCTTCT  
GCCGGGTTCTATCGTACCGGTTGACGCTGGCGCACCGGAAGCGGCCGACGAGGT  
TGAGCGTTGATCGGTACCCGTTGCCGCTGGCACTGGACGCAATTACAGGCCGAA  
GAGGAAGGCGGCCGGCTGGAAACGATCTGGGTTGCCATTGGCGGAGCGGACAGTC  
GTAATCCCTCTGCCATTCCGACTGATCCGCTAATGTGGGTGGTACTTGGACCCCTC  
TTCCATTCTGATCAGGAGCAAGCTATCTGCTCTGCCGATTACGCCTCTAGCCTG  
GCAAACCGCCGAAAGATGAATTGACTAGT

#### **Protein TOX (FCS)**

MGSGCGGGGSRHRQPRGWEQLGGCGGSGGGSYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQN  
WTVERLLQAHQALEERGYVFVGYHGTFLLEAQSVFGVAARSQDLAAIWAGFYIAGDPAL  
AYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPASSLPGFYRTGLTAAPEAADEVERLIGHPLPLAL  
DAITGPEEEGGRLETI LGWPLAERTV VIPS APTDPRNVGGLDPSSIPDQEQAISALPDYAS  
QPGKPPKDEL

#### **E3-TOX DNA sequences**

ATGGCCCATCACCATCACCATACACAAACACCAAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAA  
ACCACTGGATGGAGAATATTCACCCCTCAGATCCGTGGCGTGAGCGCTTCGAGATGT  
TCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCGAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAG  
GGTCTACTAGTGAATGGGGTCTGGTGGCTGTGGTGGCGGTGGTCTCGTCATCGTCA  
GCCCGTGGTGGAAACAACACTGGTGGCTGCCGGTGGTCTGGTGGCGGTGGCTCTTA  
CCCGACAGGCGCGGAGTTTGGGTGATGGCGGTGACGTGTCTTCTCACCGCGTGGT  
ACTCAAATTGGACAGTCGAACGTCTGTTGCAGGCCACGCGCAACTGGAGGAACGTG  
GTTACGTATTGTAAGGCTATCACGGTACCTTCTGGAGGCCGCAATCCATTGTTTT  
GGTGGCGTTGCAGCGCTTCAGATCTGGCGCAATCTGGCAGGTTCTATATCG  
CTGGCGACCCCGCTCTGGCTTACGGCTATGCCCAAGATCAAGAACCGATGCAGCCGG  
TCGTATTGCAACGGTGTCTTGCTGCGTGTACGTTCCGGCATCTCTGCCGGTT  
TCTATCGTACCGGTTGACGCTGGCGCACCGGAAGCGGCCACGAGGTTGAGCGTT  
GATCGGTACCCGTTGCCGCTGGCACTGGACGCAATTACAGGCCGGAAGAGGAAGG  
CGGCCGGCTGGAAACGATCTGGGTTGCCATTGGCGGAGCGGACAGTCGTAATCCCT  
TCTGCCATTCCGACTGATCCGCTAATGTGGGTGGTACTTGGACCCCTCTCCATTCC  
TGATCAGGAGCAAGCTATCTGCTCTGCCGATTACGCCTCTCAGCCTGGCAAACCG  
CCGAAAGATGAATTGTAAG

### **E3-TOX protein**

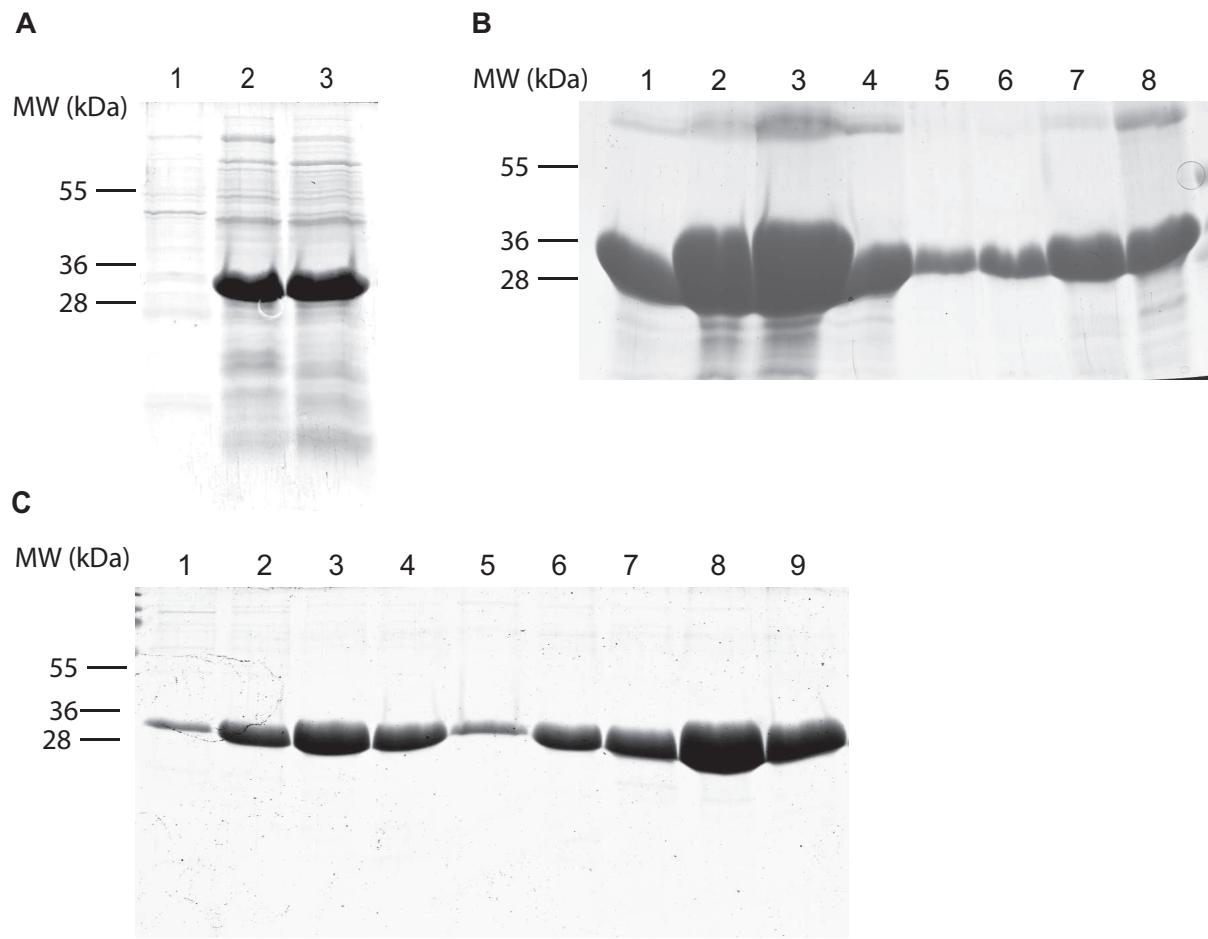
MAHHHHHHNNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELEDAQAGKEPGS  
TSAMGSGCGGGGSRHRQPRGWEQLGGCGGSGGGSYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGT  
QNWTVERLLQAHQAQLEERGYVFVGYHGTLEAAQSIVFGGVAARSQDLAAIWAGFYIAGDP  
ALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPASSLPGFYRTGLTAAPEAADEVERLIGHPLPL  
ALDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGLDPPSSIPDQEQAISALPDYA  
SQPGKPPKDEL

### **K3-TOX DNA sequences**

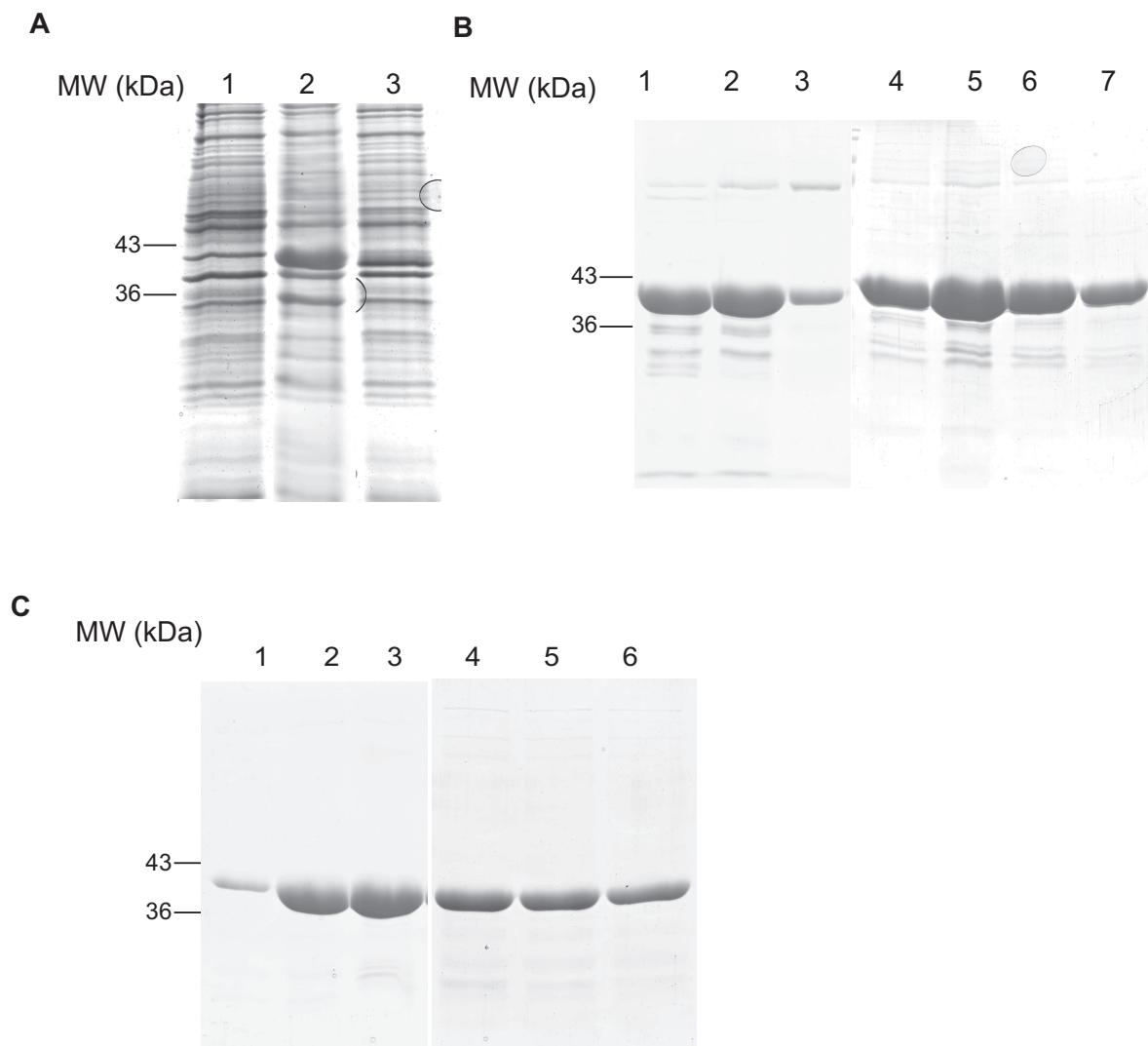
ATGGCCCACCATCACCATCATCACCATACAAACACCAAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAA  
ACCACTGGATGGAGAATATTCACCCCTCAGATCCGTGGCGTGAGCGCTTCGAGATGT  
TCCGAAAACGTAAATAAGGCCTGGAACTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGGCCAGG  
GTCTACTAGTCAATGGGCTGGCTGGCTGTGGTGGCGGTGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCTTAC  
CCGCGTGGTGGGAACAACACTGGGTGGCTGCGGTGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCTTAC  
CCGACAGGCGCGGAGTTTTGGGTGATGGCGGTGACGTGTCTTCTCCACCGCGTGGTA  
CTCAAAATTGGACAGTCGAACGTCTGTTGCAGGCCACCGCGCAACTGGAGGAACGTGG  
TTACGTATTCTGTTAGGCTATCACGGTACCTTCTGGAGGCCGCAATCCATTGTTTG  
GTGGCGTTGCAGCGCGTCTCAAGATCTGGCGGAATCTGGCAGGTTCTATATCGC  
TGGCGACCCCGCTCTGGCTTACGGCTATGCCAAGATCAAGAACCCGATGCAGCCGGT  
CGTATTCTGCAACGGTGCTTGCTCGTGTACGGTCCGGCATCTTCTGCGGGTT  
CTATCGTACCGGTTGACGCTGGCGCACCGGAAGCGGGCGACGAGGTTGAGCGTT  
GATCGGTACCCGTTGCCGCTGGCACTGGACGCAATTACAGGCCCGGAAGAGGAAGG  
CGGCCGGCTGGAAACGATCTGGGTTGGCCATTGGCGGAGCGGACAGTCGTAATCCCT  
TCTGCCATTCCGACTGATCCCGTAATGTGGGTGGTACTGGACCCCTTCCATTCC  
TGATCAGGAGCAAGCTATCTCTGCTCTGCCGGATTACGCCTCTCAGCCTGGCAAACCG  
CCGAAAGATGAATTGTAA

### **K3-TOX protein**

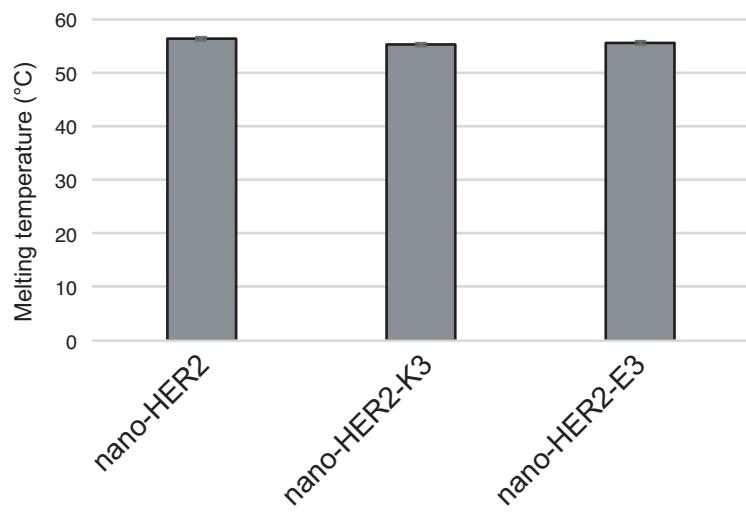
MAHHHHHHNNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELEDAQAGKEPGS  
TSAMGSGCGGGGSRHRQPRGWEQLGGCGGSGGGSYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGT  
QNWTVERLLQAHQAQLEERGYVFVGYHGTLEAAQSIVFGGVAARSQDLAAIWAGFYIAGDP  
ALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPASSLPGFYRTGLTAAPEAADEVERLIGHPLPL  
ALDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGLDPPSSIPDQEQAISALPDYA  
SQPGKPPKDEL



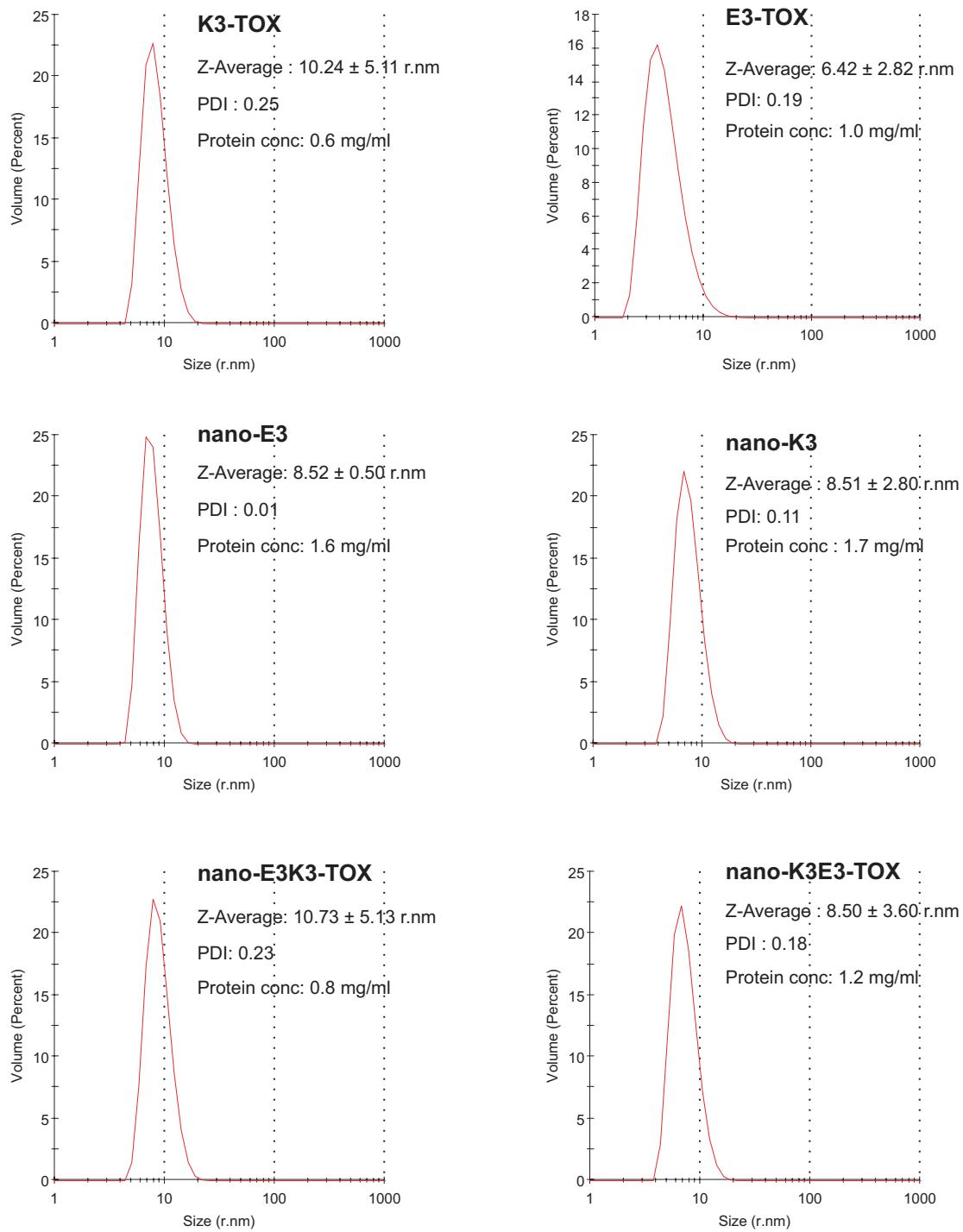
**Figure S1:** Expression and purification of nano-HER2-E3 and nano-HER2-K3 using IMAC followed by size exclusion chromatography. (A) Expression levels of the nanobodies after IPTG induction ON at 20°C. SDS-PAGE and by Coomassie blue staining analysis of total extracts of control (lane 1), nano-HER2-E3 (lane 2) and nano-HER2-K3 (lane3). (B) IMAC fractions of nano-HER2-E3 (lane 1 to 5) and nano-HER2-K3 (lanes 6 to 8) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. (C) SDS-PAGE and Coomassie blue staining analysis of the gel filtration fractions of nano-HER2-E3 (lanes 1 to 5) and nano-HER2-K3 (lanes 6 to 9).



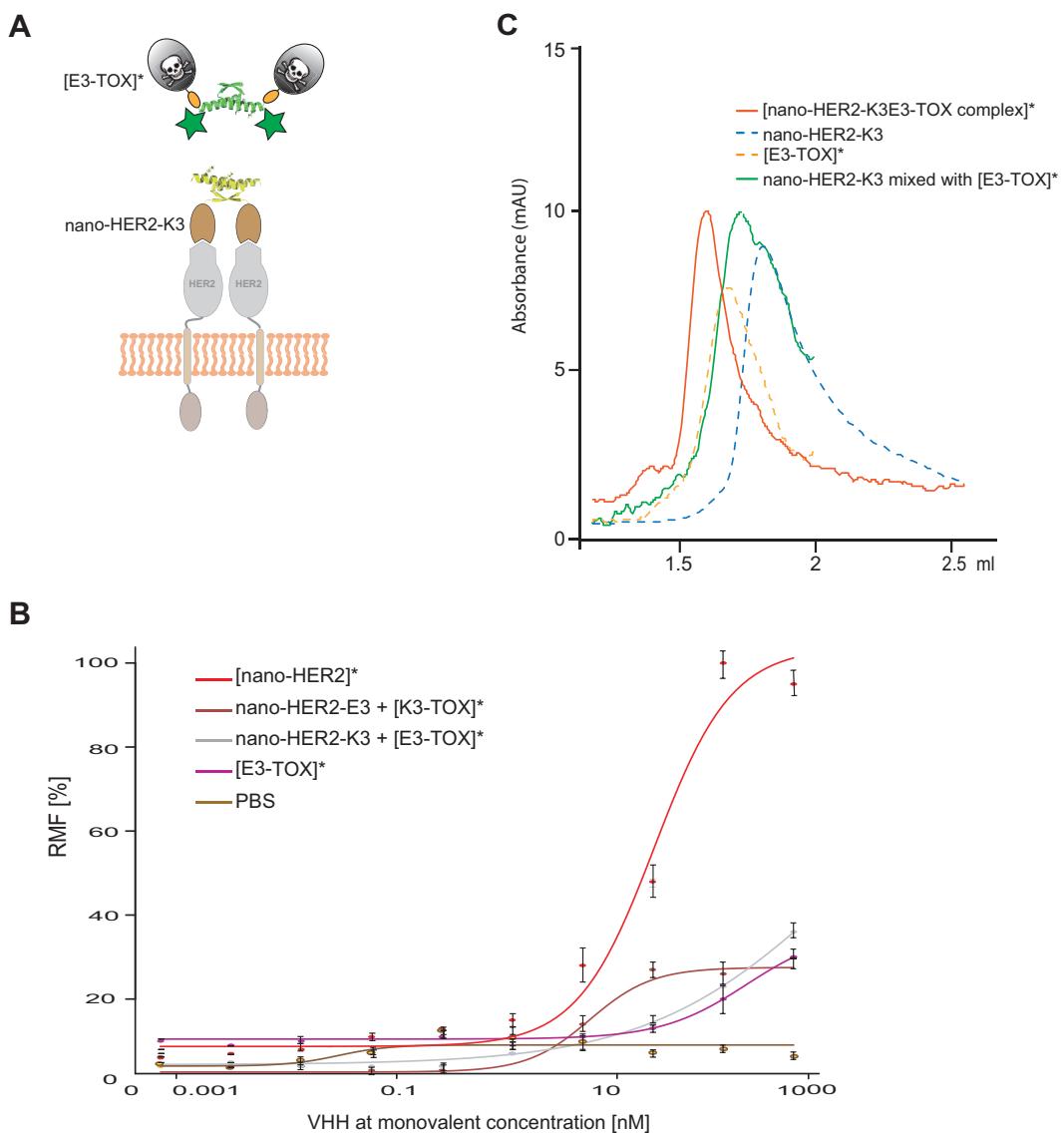
**Figure S2:** Expression and purification of TOX constructs. (A) Total extracts from IPTG induction of control (lane 1) and E3-TOX (lane 2) transformed BL21-LyS and, (B) IMAC fractions of E3-TOX (1 to 3) and K3-TOX (4 to 7) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. (C) SDS-PAGE and Coomassie staining analysis of the SEC fractions of E3-TOX (fractions 1 to 3) and K3-TOX (4 and 6).



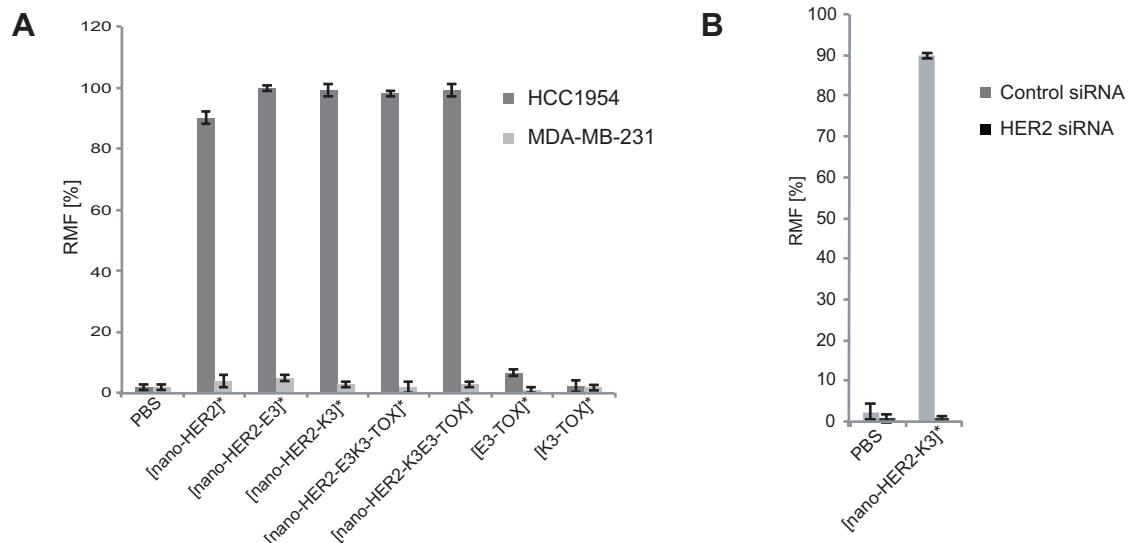
**Figure S3.** Melting temperatures of the nano-HER2, nano-HER2-K3 and nano-HER2-E3 purified proteins were determined using a fluorescence-based thermal shift assay.



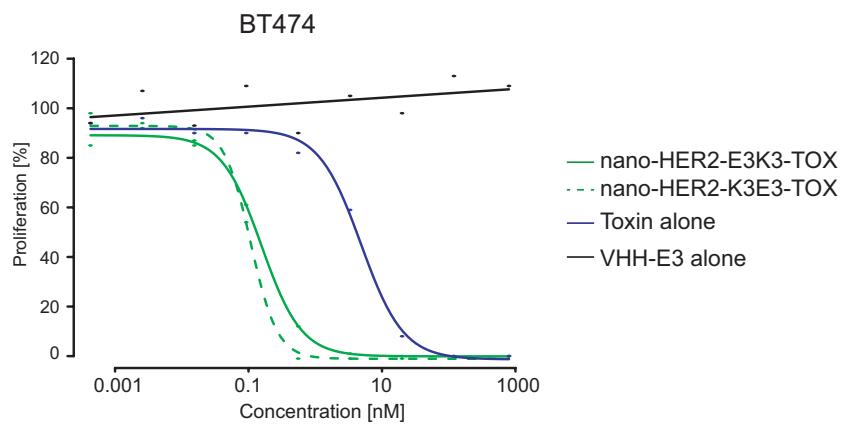
**Figure S4.** The apparent hydrodynamic diameters of the protein-assemblies were evaluated by Dynamic Light Scattering analysis (DLS). DLS measurements were performed using a Malvern NanoZS instrument and the data were treated with the Malvern software using the automatic settings. All reported data compiled with the quality test standard of the software. Measurements were performed three times for each sample at 25°C. Representative graphs are shown. Z-Average is expressed in r.nm. Protein concentration in mg/ml is indicated as well as polydispersity index (PDI).



**Figure S5.** Binding of equimolar mixture of [E3-TOX]\* and nano-HER2-K3 or of [K3-TOX]\* and nano-HER2-E3 on antigen-overexpressing cells. (A) Cartoon representing the steric hindrance of the fluorophore on the co-association of nano-HER2 and TOX module. Labeled proteins are indicated by [\*]. (B) HCC1954 cells were incubated with varying concentrations of an equimolar mixture of labeled [E3-TOX]\* with unlabeled nano-HER2-K3 or labeled [K3-TOX]\* with unlabeled nano-HER2-K3 and analyzed by flow cytometry. The relative number of fluorescence cells expressed in percentage was plotted against nanobody concentration. ( $n \geq 3$ ) and SD. (C) Alexa-labeled purified immunotoxin complex and the mixture of labelled [E3-TOX]\* with unlabeled nano-HER2-K3 were run on an analytical size exclusion chromatography Superdex 200 Increased 5/150 GL. Mixture of [E3-TOX]\* (yellow dotted line) with nano-HER2-K3 (blue dotted line) led to two overlapping peaks (green line), while the purified co-assembled labeled immunotoxin complex gave only one peak.



**Figure S6.** (A) HCC1954 and MDA-MB-231 cell lines were incubated with Alexa488-labeled recombinant proteins, as indicated with [ ]\*. Following incubation, the fluorescence was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS). (B) HCC1954 cells were treated with either a HER2 siRNA or with a control siRNA for 42h, and then incubated with [nano-HER2-K3]\*. Fluorescence was measured by FACS.



**Figure S7.** Comparison between nano-HER2-E3K3-TOX and nano-HER2-K3E3-TOX immunotoxins. Both show similar  $IC_{50}$  cytotoxicity over HER2-expressing cells, BT474. These assays were performed in triplicates.

**Table S1 :**

	Number of aa	Theoretical monomer MW (kDa)	pI	Oligomerization state	MW of the complex (kDa)
<b>Nano-HER2</b>	146	16.20	8.48	Mono	16.20
<b>Nano-HER2-E3</b>	213	23.50	6.88	Homodimer	47
<b>Nano-HER2-K3</b>	213	23.50	9.29	Homotetramer	94
<b>TOX</b>	290	30.20	4.63	Mono	30.2
<b>E3-TOX</b>	315	33.50	4.78	Homodimer	67
<b>K3-TOX</b>	315	33.50	5.57	Homotetramer	134
<b>Nano-HER2-E3/K3-TOX</b>	n.a	n.a	n.d	Heterotetramer	114
<b>Nano-HER2-K3/E3-TOX</b>				Heterotetramer	114

**Table S2** : Final yields of recombinant protein preparations after the two purification steps

mg/L	
<b>Nano-HER2</b>	114
<b>Nano-HER2-E3</b>	98
<b>Nano-HER2-K3</b>	103
<b>TOX</b>	6.9
<b>E3-TOX</b>	7.2
<b>K3-TOX</b>	9.1

# BIBLIOGRAPHIE

1. Landry, Y., Gies, J.-P., Sick, E. & Niederhoffer, N. *Pharmacologie Des cibles à la thérapeutique*. (2019).
2. Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I. & Overington, J. P. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 19–34 (2017).
3. Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 829–842 (2017).
4. Sriram, K. & Insel, P. A. G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: How many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.* **93**, 251–258 (2018).
5. Bockaert, J. & Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: An evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723–1729 (1999).
6. Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 639–650 (2002).
7. Huynh, J., Thomas, W. G., Aguilar, M. I. & Pattenden, L. K. Role of helix 8 in G protein-coupled receptors based on structure-function studies on the type 1 angiotensin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **302**, 118–127 (2009).
8. Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A. & Filipek, S. Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Curr. Med. Chem.* **19**, 1090–1109 (2012).
9. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
10. Kolakowski, L. F. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**, 1–7 (1994).
11. Zhou, Q., Yang, D., Wu, M., Guo, Y., Guo, W., Zhong, L., Cai, X., Dai, A., Jang, W., Shakhnovich, E., Liu, Z. J., Stevens, R. C., Lambert, N. A., Babu, M. M., Wang, M. W. & Zhao, S. Common activation mechanism of class a GPCRs. *Elife* **8**, 1–31 (2019).
12. Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y. & Wang, M. W. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, (2021).
13. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 339–357 (2008).
14. Ping, Y. Q. et al. *Structures of the glucocorticoid-bound adhesion receptor GPR97–Go complex*. *Nature* vol. 589 (Springer US, 2021).
15. Brown, N. A., Schrevens, S., Van Dijck, P. & Goldman, G. H. Fungal G-protein-coupled receptors: Mediators of pathogenesis and targets for disease control. *Nat. Microbiol.* **3**, 402–414 (2018).
16. Klein, P. S., Sun, T. J., Saxe, C. L., Kimmel, A. R., Johnson, R. L. & Devreotes, P. N. A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science* (80-). **241**, 1467–1472 (1988).
17. Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X.-P., Liu, W., Siu, F. Y., Roth, B. L., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structure of the human smoothened receptor 7TM bound to an antitumor agent. *Nature* **497**, 338–343 (2013).
18. Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 4–12 (2018).
19. Hilger, D. The role of structural dynamics in GPCR-mediated signaling. *FEBS J.* **288**, 2461–2489

- (2021).
- 20. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. GPCR signaling regulation: The role of GRKs and arrestins. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–11 (2019).
  - 21. Milligan, G. Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: A Current Perspective. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1271–1276 (2003).
  - 22. Gavriilidou, A. F. M., Hunziker, H., Mayer, D., Vuckovic, Z., Veprinsev, D. B. & Zenobi, R. Insights into the Basal Activity and Activation Mechanism of the  $\beta 1$  Adrenergic Receptor Using Native Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30**, 529–537 (2019).
  - 23. Rankovic, Z., Brust, T. F. & Bohn, L. M. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 241–250 (2016).
  - 24. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M. & Sexton, P. M. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 638–653 (2018).
  - 25. Insel, P. A., Tang, C. M., Hahntow, I. & Michel, M. C. Impact of GPCRs in clinical medicine: Monogenic diseases, genetic variants and drug targets. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 994–1005 (2007).
  - 26. Hutchings, C. J. A review of antibody-based therapeutics targeting G protein-coupled receptors: an update. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2020).
  - 27. Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. & Catterall, W. A. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* **57**, 387–395 (2005).
  - 28. Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., Sidders, B., Skerratt, S. E., Stevens, E. B., Storer, R. I. & Swain, N. A. Ion channels as therapeutic targets: A drug discovery perspective. *J. Med. Chem.* **56**, 593–624 (2013).
  - 29. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
  - 30. Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C. & Noda, M. Na(v)2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *J. Neurosci.* **20**, 7743–7751 (2000).
  - 31. Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science (80-. ).* **237**, 749–753 (1987).
  - 32. Briggs, C. A. & Gopalakrishnan, M. Ion Channels – Ligand Gated. in *Comprehensive Medicinal Chemistry II* 877–918 (Elsevier Ltd, 2007).
  - 33. De Lera Ruiz, M. & Kraus, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* **58**, 7093–7118 (2015).
  - 34. Catterall, W. A. Ion Channel Protein Superfamily. in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* 648–652 (Elsevier Inc., 2013).
  - 35. Schulz, D. J., Temporal, S., Barry, D. M. & Garcia, M. L. Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: From gene expression to localization. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2215–2231 (2008).
  - 36. Herrington, J. & Arey, B. J. Conformational Mechanisms of Signaling Bias of Ion Channels. in *Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics* 173–207 (Elsevier Inc., 2014).
  - 37. Tovar, K. R. & Westbrook, G. L. Ligand-gated ion channels. in *Cell Physiology Source Book* 549–562 (Elsevier Inc., 2012).
  - 38. Jacob, N. T. Drug targets: ligand and voltage gated ion channels. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* **6**, 235–245 (2017).
  - 39. Briggs, C. & Gopalakrishnan, M. Ion Channels – Ligand Gated. in *Comprehensive Medicinal Chemistry II* 877–918 (2007).
  - 40. Luo, J. & Lindstrom, J. M. Acetylcholine Receptor Structure. in *Myasthenia Gravis and Related Disorders* 13–45 (2018).
  - 41. Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen,

- K. B., Yuan, H., Myers, S. J. & Dingledine, R. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62**, 405–496 (2010).
42. Habermacher, C., Dunning, K., Chataigneau, T. & Grutter, T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* **104**, 18–30 (2016).
43. Karakas, E. & Furukawa, H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science (80- ).* **344**, 992–997 (2014).
44. Wang, J. & Yu, Y. Insights into the channel gating of P2X receptors from structures, dynamics and small molecules. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 44–55 (2016).
45. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. S., Alon, N. O. A., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S. I., Plavsic, N., Chou, J. L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S. & Tsui, L. C. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science (80- ).* **245**, 1066–1073 (1989).
46. Bennett, D. L., Clark, X. A. J., Huang, J., Waxman, S. G. & Dib-Hajj, S. D. The role of voltage-gated sodium channels in pain signaling. *Physiol. Rev.* **99**, 1079–1151 (2019).
47. Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R. & Schacht, A. L. How to improve RD productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 203–214 (2010).
48. Scatton, B. Le processus de découverte du médicament dans l'industrie pharmaceutique. *J. Soc. Biol.* **203**, 249–269 (2009).
49. Wildey, M. J., Haunso, A., Tudor, M., Webb, M. & Connick, J. H. High-Throughput Screening. in *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 149–196 (2017).
50. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **3**, 3–25 (1997).
51. Yasi, E. A., Kruyer, N. S. & Peralta-Yahya, P. Advances in G protein-coupled receptor high-throughput screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **64**, 210–217 (2020).
52. Stein, R. M., Kang, H. J., McCorry, J. D., Glatfelter, G. C., Jones, A. J., Che, T., Slocum, S., Huang, X. P., Savych, O., Moroz, Y. S., Stauch, B., Johansson, L. C., Cherezov, V., Kenakin, T., Irwin, J. J., Shoichet, B. K., Roth, B. L. & Dubocovich, M. L. Virtual discovery of melatonin receptor ligands to modulate circadian rhythms. *Nature* **579**, 609–614 (2020).
53. Terstappen, G. C., Roncarati, R., Dunlop, J. & Peri, R. Screening technologies for ion channel drug discovery. *Future Med. Chem.* **2**, 715–730 (2010).
54. Liu, C., Li, T. & Chen, J. Role of High-Throughput Electrophysiology in Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **87**, (2019).
55. Neher, E. & Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799–802 (1976).
56. Picones, A., Loza-Huerta, A., Segura-Chama, P. & Lara-Figueroa, C. O. *Contribution of Automated Technologies to Ion Channel Drug Discovery. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 104 (Elsevier Inc., 2016).
57. Herrington, J., Solly, K., Ratliff, K. S., Li, N., Zhou, Y. P., Howard, A., Kiss, L., Garcia, M. L., McManus, O. B., Deng, Q., Desai, R., Xiong, Y. & Kaczorowski, G. J. Identification of novel and selective Kv2 channel inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **80**, 958–964 (2011).
58. Roberts, N. A. et al. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science (80- ).* **248**, 358–361 (1990).
59. Doyle, D. A., Cabral, M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & Mackinnon, R. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science (80- ).* **280**, 69–77 (1998).
60. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (80- ).* **289**, 739–745 (2000).
61. Rasmussen, S. G. F., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C.,

- Burghammer, M., Ratnala, V. R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F. X., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. Crystal structure of the human  $\beta$ 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
62. De Groot, M. J. Understanding ion channels using computational approaches. *Future Med. Chem.* **2**, 697–701 (2010).
63. Fernández-Ballester, G. & Ferrer-Montiel, A. Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states. *J. Membr. Biol.* **223**, 161–172 (2008).
64. Pedretti, A., Marconi, C., Bettinelli, I. & Vistoli, G. Comparative modeling of the quaternary structure for the human TRPM8 channel and analysis of its binding features. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 973–982 (2009).
65. Yang, Q., Du, L., Wang, X., Li, M. & You, Q. Modeling the binding modes of Kv1.5 potassium channel and blockers. *J. Mol. Graph. Model.* **27**, 178–187 (2008).
66. Lee, Y., Basith, S. & Choi, S. Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors Utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *J. Med. Chem.* **61**, 1–46 (2018).
67. Jaiteh, M., Rodríguez-Espigares, I., Selent, J. & Carlsson, J. Performance of virtual screening against GPCR homology models: Impact of template selection and treatment of binding site plasticity. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1007680 (2020).
68. Payghan, P. V., Bera, I., Bhattacharyya, D. & Ghoshal, N. Computational studies for structure-based drug designing against transmembrane receptors: PLGICs and class a GPCRs. *Front. Phys.* **6**, (2018).
69. Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., Boutigny, S., Rioux, J. B., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Richaud, P., Joyard, J., Pignol, D., Sabaty, M., Desnos, T., Pebay-Peyroula, E., Darrouzet, E., Vernet, T. & Rolland, N. Heterologous expression of membrane proteins: Choosing the appropriate host. *PLoS One* **6**, (2011).
70. Li, Q. Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. *Front. Mol. Biosci.* **7**, (2020).
71. Mason, L. E. Advances in Fragment-Based Drug Discovery. *Technology Networks* (2020).
72. Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K. & Hirth, P. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 873–886 (2012).
73. Andrews, S. P., Brown, G. A. & Christopher, J. A. Structure-based and fragment-based GPCR drug discovery. *ChemMedChem* **9**, 256–275 (2014).
74. Lecas, L., Hartmann, L., Caro, L., Mohamed-Bouteben, S., Raingeval, C., Krimm, I., Wagner, R., Dugas, V. & Demesmay, C. Miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-embedded G-protein coupled receptors. *Anal. Chim. Acta* **1113**, 26–35 (2020).
75. Renaud, J. P., Chung, C. W., Danielson, U. H., Egner, U., Hennig, M., Hubbard, R. E. & Nar, H. Biophysics in drug discovery: Impact, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 679–698 (2016).
76. Kwan, T. O. C., Reis, R., Siligardi, G., Hussain, R., Cheruvara, H. & Moraes, I. Selection of Biophysical Methods for Characterisation of Membrane Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
77. Reis, R. I. & Moraes, I. Probing membrane protein assembly into nanodiscs by in situ dynamic light scattering: A2a receptor as a case study. *Biology (Basel)* **9**, (2020).
78. Powl, A. M., O'Reilly, A. O., Miles, A. J. & Wallace, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy-defined structure of the C-terminal domain of NaChBac and its role in channel assembly. *PNAS* **107**, 14064–14069 (2010).
79. Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y. T., Hanson, M. A. & Stevens, R. C. Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins. *Structure* **16**, 351–359 (2008).
80. Lebon, G., Bennett, K., Jazayeri, A. & Tate, C. G. Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A2A receptor. *J. Mol. Biol.* **409**, 298–310 (2011).
81. Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M. J. & Tate, C. G. Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**,

- 10744–10749 (2008).
82. Miller, J. L. & Tate, C. G. Engineering an ultra-thermostable  $\beta$  1 -adrenoceptor. *J. Mol. Biol.* **413**, (2011).
83. Shibata, Y., White, J. F., Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Aloia, A. L., Grisshammer, R. & Tate, C. G. Thermostabilisation of the neurotensin receptor NTS1. *J. Mol. Biol.* **390**, 262–277 (2009).
84. Luan, C., Light, S. H., Dunne, S. F. & Anderson, W. F. Ligand Screening Using Fluorescence Thermal Shift Analysis (FTS). *Methods Mol. Biol.* **1140**, 263–2889 (2014).
85. Schonenbach, N. S., Rieth, M. D., Han, S. & O’Malley, M. A. Adenosine A2a receptors form distinct oligomers in protein detergent complexes. *FEBS Lett.* **590**, 3295–3306 (2016).
86. Gimpl, K., Klement, J. & Keller, S. Characterising protein/detergent complexes by triple-detection size-exclusion chromatography. *Biol. Proced. Online* **18**, (2016).
87. Slotboom, D. J., Duurkens, R. H., Olieman, K. & Erkens, G. B. Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods* **46**, 73–82 (2008).
88. Stock, D., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Molecular architecture of the rotary motor in ATPsynthase. *Science* (80- ). **286**, 1700–1705 (1999).
89. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. Structure determination of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**, 647–55 (2001).
90. Gulezian, E., Crivello, C., Bedmenko, J., Zafra, C., Zhang, Y., Collusi, P. & Hussain, S. Membrane protein production and formulation for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **42**, 657–674 (2021).
91. Wiseman, D. N., Otchere, A., Patel, J. H., Uddin, R., Naomi, L., Routledge, S. J., Rothnie, A. J., Slack, C., Poyner, D. R., Bill, M. & Goddard, A. D. Expression and purification of recombinant G protein-coupled receptors: A review. *Protein Expr. Purif.* **167**, (2020).
92. Landau, E. M. & Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins. *PNAS* **93**, 14532–14535 (1996).
93. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M., Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W., Kobilka, B. K. & Stevens, R. C. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human  $\beta$ 2-Adrenergic G protein-Coupled Receptor. *Science* (80- ). **318**, 1258–1265 (2007).
94. Jaakola, V., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y. T., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. & Stevens, R. C. The 2,6A Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* (80- ). **322**, 1211–1217 (2008).
95. Wu, B., Chien, E. Y. T., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, C. F., Hamel, D. J., Kuhn, P., Handel, T. M., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structures of the CXCR4 chemokine receptor in complex with small molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* (80- ). **330**, 1066–1071 (2010).
96. Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C. & Iwata, S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**, 65–70 (2012).
97. Tsai, C.-J. & Schertler, G. F. X. Membrane protein crystallization. in *Structural Biology in Drug Discovery : Methods, Techniques and Practices* 187–210 (2020).
98. Vuckovic, Z., Gentry, P. R., Berizzi, A. E., Hirata, K., Varghese, S., Thompson, G., van der Westhuizen, E. T., Burger, W. A. C., Rahmani, R., Valant, C., Langmead, C. J., Lindsley, C. W., Baell, J. B., Tobin, A. B., Sexton, P. M., Christopoulos, A. & Thal, D. M. Crystal structure of the M5 muscarinic acetylcholine receptor. *PNAS* **116**, 26001–26007 (2019).
99. Jaeger, K. et al. Structural Basis for Allosteric Ligand Recognition in the Human CC Chemokine Receptor 7. *Cell* **178**, 1222–1230 (2019).
100. Hua, T. et al. Crystal structure of the human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell* **167**, 750–762 (2016).
101. Mukherjee, S., Erramilli, S. K., Ammirati, M., Alvarez, F. J. D., Fennell, K. F., Purdy, M. D., Skrobek, B. M., Radziwon, K., Coukos, J., Kang, Y., Dutka, P., Gao, X., Qiu, X., Yeager, M., Eric Xu, H., Han, S. & Kossiakoff, A. A. Synthetic antibodies against BRIL as universal fiducial marks

- for single-particle cryoEM structure determination of membrane proteins. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
- 102. Deng, Z., Zhao, Y., Feng, J., Zhang, J., Zhao, H., Rau, M. J., Fitzpatrick, J. A. J., Hu, H. & Yuan, P. Cryo-EM structure of a proton-activated chloride channel TMEM206. *Sci. Adv.* **7**, (2021).
  - 103. Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Shibata, Y. & Tate, C. G. Conformational thermostabilization of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 877–882 (2008).
  - 104. Errey, J. C. & Fiez-Vandal, C. Production of membrane proteins in industry: The example of GPCRs. *Protein Expr. Purif.* **169**, (2020).
  - 105. Zhang, X., Stevens, R. C. & Xu, F. The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 79–87 (2015).
  - 106. Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S. & Shaffer, P. L. Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha$ 3 bound to antagonist strychnine. *Nature* **526**, 277–280 (2015).
  - 107. Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J. P., Sonner, J. M., Delarue, M. & Corringer, P. J. X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431 (2011).
  - 108. Errasti-Murugarren, E., Bartoccioni, P. & Palacín, M. Membrane protein stabilization strategies for structural and functional studies. *Membranes (Basel)*. **11**, (2021).
  - 109. Kühlbrandt, W. The resolution revolution. *Science (80- )*. **343**, 1443–1444 (2014).
  - 110. Le Bon, C., Michon, B., Popot, J.-L. & Zoonens, M. Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy. *Q. Rev. Biophys.* **54**, 1–22 (2021).
  - 111. Guo, W. & Chen, L. Recent progress in structural studies on canonical TRP ion channels. *Cell Calcium* **83**, (2019).
  - 112. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. & Julius, D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504**, 113–118 (2013).
  - 113. Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **504**, 107–112 (2013).
  - 114. Choy, B. C., Cater, R. J., Mancia, F. & Pryor, E. E. A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: Detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1863**, 183533 (2021).
  - 115. García-Nafria, J. & Tate, C. G. Cryo-electron microscopy: Moving beyond X-ray crystal structures for drug receptors and drug development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 51–71 (2020).
  - 116. Nakane, T. et al. Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature* **587**, 152–156 (2020).
  - 117. Yeh, V., Goode, A. & Bonev, B. B. Membrane protein structure determination and characterisation by solution and solid-state nmr. *Biology (Basel)*. **9**, (2020).
  - 118. Schubeis, T., Le Marchand, T., Andreas, L. B. & Pintacuda, G.  $^1$ H magic-angle spinning NMR evolves as a powerful new tool for membrane proteins. *J. Magn. Reson.* **287**, 140–152 (2018).
  - 119. Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
  - 120. White, S. Membrane Proteins of Known 3D Structure. <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/> (2018).
  - 121. Raghuraman, H., Chatterjee, S. & Das, A. Site-directed fluorescence approaches for dynamic structural biology of membrane peptides and proteins. *Front. Mol. Biosci.* **6**, (2019).
  - 122. Zhou, Y., Meng, J., Xu, C. & Liu, J. Multiple GPCR Functional Assays Based on Resonance Energy Transfer Sensors. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
  - 123. Ward, R. J. & Milligan, G. Structural and biophysical characterisation of G protein-coupled receptor ligand binding using resonance energy transfer and fluorescent labelling techniques. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 3–14 (2014).
  - 124. Ma, L., Yang, F. & Zheng, J. Application of fluorescence resonance energy transfer in protein studies. *J. Mol. Struct.* **1077**, 87–100 (2014).

125. Martinac, B. Single-molecule FRET studies of ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **130**, 192–197 (2017).
126. Patching, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 43–55 (2014).
127. Hüttenrauch, F., Nitzki, A., Lin, F. T., Höning, S. & Oppermann, M.  $\beta$ -arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. *J. Biol. Chem.* **277**, 30769–30777 (2002).
128. Christopher, J. A., Brown, J., Doré, A. S., Errey, J. C., Koglin, M., Marshall, F. H., Myszka, D. G., Rich, R. L., Tate, C. G., Tehan, B., Warne, T. & Congreve, M. Biophysical fragment screening of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor: Identification of high affinity arylpiperazine leads using structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **56**, 3446–3455 (2013).
129. Gaston, B., Smith, L., Bosch, J., Seckler, J., Kunze, D., Kiselar, J., Marozkina, N., Hodges, C. A., Wintrobe, P., McGee, K., Morozkina, T. S., Burton, S. T., Lewis, T., Strassmaier, T., Getsy, P., Bates, J. N. & Lewis, S. J. Voltage-gated potassium channel proteins and stereoselective S-nitroso-l-cysteine signaling. *JCI Insight* **5**, (2020).
130. Martin-Eauclaire, M. F., Ferracci, G., Bosmans, F. & Bougis, P. E. A surface plasmon resonance approach to monitor toxin interactions with an isolated voltage-gated sodium channel paddle motif. *J. Gen. Physiol.* **145**, 155–162 (2015).
131. Hayoz, S., Tiwari, P. B., Piszczeck, G., Üren, A. & Breliidze, T. I. Investigating cyclic nucleotide and cyclic dinucleotide binding to HCN channels by surface plasmon resonance. *PLoS One* **12**, e0185359 (2017).
132. West, G. M., Chien, E. Y. T., Katritch, V., Gatchalian, J., Chalmers, M. J., Stevens, R. C. & Griffin, P. R. Ligand-Dependent Perturbation of the Conformational Ensemble for the GPCR  $\beta$ 2 Adrenergic Receptor Revealed by HDX. *Structure* **19**, 1424–1432 (2011).
133. Yang, L. et al. Conformational states of the full-length glucagon receptor. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
134. Giladi, M. & Khananshvili, D. Hydrogen-Deuterium Exchange Mass-Spectrometry of Secondary Active Transporters: From Structural Dynamics to Molecular Mechanisms. *Front. Pharmacol.* **11**, (2020).
135. Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105–117 (2004).
136. Chipot, C., Dehez, F., Schnell, J. R., Zitzmann, N., Pebay-Peyroula, E., Catoire, L. J., Miroux, B., Kunji, E. R. S., Veglia, G., Cross, T. A. & Schanda, P. Perturbations of Native Membrane Proteins Structure in Alkyl Phosphocholine Detergents : A Critical Assessment of NMR and Biophysical Studies. *Chem. Rev.* **118**, 3559–3607 (2018).
137. Thompson, A. A., Liu, J. J., Chun, E., Wacker, D., Wu, H., Cherezov, V. & Stevens, R. C. GPCR stabilization using the bicelle-like architecture of mixed sterol-detergent micelles. *Methods* **55**, 310–317 (2011).
138. Durand, G., Abla, M., Ebel, C. & Breyton, C. New Amphiphiles to Handle Membrane Proteins: 'Ménage à Trois' Between Chemistry, Physical Chemistry, and Biochemistry. in *Membrane Proteins Production for Structural Analysis* (ed. Springer) 205–251 (2014).
139. Chae, P. S. et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat. Methods* **7**, 1003–1008 (2010).
140. Lee, A. G. *Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1612 (2003).
141. Damian, M., Louet, M., Gomes, A. A. S., M'Kadmi, C., Denoyelle, S., Cantel, S., Mary, S., Bisch, P. M., Fehrentz, J.-A., Catoire, L. J., Floquet, N. & Banères, J. L. Allosteric modulation of ghrelin receptor signaling by lipids. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
142. Palsdottir, H. & Hunte, C. Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 2–18 (2004).

143. Dijkman, P. M. & Watts, A. Lipid modulation of early G protein-coupled receptor signalling events. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 2889–2897 (2015).
144. Popot, J.-L. Amphipols, Nanodiscs, and Fluorinated Surfactants: Three Nonconventional Approaches to Studying Membrane Proteins in Aqueous Solutions. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 737–775 (2010).
145. Racker, E. Reconstitution of a Calcium Pump with Phospholipids and a Purified Ca<sup>++</sup> - Adenosine Triphosphatase from Sacroplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **247**, 8198–8200 (1972).
146. Kagawa, Y. & Racker, E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **241**, 2467–2474 (1966).
147. Hinkle, P. C., Kim, J. J. & Racker, E. Ion transport and respiratory control in vesicles formed from cytochrome oxidase and phospholipids. *J. Biol. Chem.* **247**, 1338–1339 (1972).
148. Rigaud, J. L., Pitard, B. & Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1231**, 223–246 (1995).
149. Rigaud, J. L. & Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* **372**, 65–86 (2003).
150. Oates, J., Faust, B., Attrill, H., Harding, P., Orwick, M. & Watts, A. The role of cholesterol on the activity and stability of neurotensin receptor 1. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 2228–2233 (2012).
151. Goddard, A. D., Dijkman, P. M., Adamson, R. J. & Watts, A. Lipid-Dependent GPCR Dimerization. in *Methods in Cell Biology* vol. 117 341–357 (Elsevier Inc., 2013).
152. Redka, D. S., Morizumi, T., Elmslie, G., Paranthaman, P., Shivnaraine, R. V., Ellis, J., Ernst, O. P. & Wells, J. W. Coupling of G proteins to reconstituted monomers and tetramers of the M2 muscarinic receptor. *J. Biol. Chem.* **289**, 24347–24365 (2014).
153. Berstein, G., Blank, J. L., Smrcka, A. V., Higashijima, T., Sternweis, P. C., Exton, J. H. & Ross, E. M. Reconstitution of Agonist-stimulated Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Hydrolysis Using Purified m1 Muscarinic Receptor, Gq/11, and Phospholipase C-β1. *J. Biol. Chem.* **267**, 8081–8088 (1992).
154. Su, Z., Brown, E. C., Wang, W. & MacKinnon, R. Novel cell-free high-throughput screening method for pharmacological tools targeting K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 5748–5753 (2016).
155. Cabanos, C., Wang, M., Han, X. & Hanser, S. B. A Soluble Fluorescent Binding Assay Reveals PIP2 Antagonism of TREK-1 Channels. *Cell Rep.* **20**, 1287–1294 (2017).
156. Wang, S., Lee, S.-J., Maksaev, G., Fang, X., Zuo, C. & Nichols, C. G. Potassium channel selectivity filter dynamics revealed by single-molecule FRET. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 377–383 (2019).
157. Collins, M. D. & Gordon, S. E. Giant liposome preparation for imaging and patch-clamp electrophysiology. *J. Vis. Exp.* **76**, 1–9 (2013).
158. Martinac, B., Rohde, P. R., Battle, A. R., Petrov, E., Pal, P., Foo, A. F., Vásquez, V., Huynh, T. & Kloda, A. Studying mechanosensitive ion channels using liposomes. *Methods Mol. Biol.* **606**, 31–53 (2010).
159. Morera, F. J., Vargas, G., González, C., Rosenmann, E. & Latorre, R. Ion-Channel Reconstitution. *Methods Mol. Biol.* **400**, 571–585 (2007).
160. Stockbridge, R. B. & Tsai, M. F. *Lipid reconstitution and recording of recombinant ion channels*. in *Methods in Enzymology* vol. 556 (Elsevier Inc., 2015).
161. Demarche, S., Sugihara, K., Zambelli, T., Tiefenauer, L. & Vörös, J. Techniques for recording reconstituted ion channels. *Analyst* **136**, 1077–1089 (2011).
162. D'Avanzo, N., Cheng, W. W. L., Doyle, D. A. & Nichols, C. G. Direct and specific activation of human inward rectifier K<sup>+</sup> channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **285**, 37129–37132 (2010).
163. Shi, L., Lake, E. M. R., Ahmed, M. A. M., Brown, L. S. & Ladizhansky, V. Solid-state NMR study

- of proteorhodopsin in the lipid environment: Secondary structure and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 2563–2574 (2009).
- 164. Bhate, M. P., Wylie, B. J., Tian, L. & McDermott, A. E. Conformational dynamics in the selectivity filter of KcsA in response to potassium ion concentration. *J. Mol. Biol.* **401**, 155–166 (2010).
  - 165. Bhate, M. P., Wylie, B. J., Thompson, A., Tian, L., Nimigean, C. & McDermott, A. E. Preparation of uniformly isotope labeled KcsA for solid state NMR: Expression, purification, reconstitution into liposomes and functional assay. *Protein Expr. Purif.* **91**, 119–124 (2013).
  - 166. Schubeis, T., Schwarzer, T. S., Le Marchand, T., Stanek, J., Movellan, K. T., Castiglione, K., Pintacuda, G. & Andreas, L. B. Resonance assignment of the outer membrane protein AlkL in lipid bilayers by proton-detected solid-state NMR. *Biomol. NMR Assign.* **14**, 295–300 (2020).
  - 167. Schubeis, T., Le Marchand, T., Daday, C., Kopec, W., Movellan, K. T., Stanek, J., Schwarzer, T. S., Castiglione, K., de Groot, B. L., Pintacuda, G. & Andreas, L. B. A  $\beta$ -barrel for oil transport through lipid membranes: Dynamic NMR structures of AlkL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 21014–21021 (2020).
  - 168. Eddy, M. T., Su, Y., Silvers, R., Andreas, L., Clark, L., Wagner, G., Pintacuda, G., Emsley, L. & Griffin, R. G. Lipid Bilayer-Bound Conformation of an Integral Membrane Beta Barrel Protein by Multidimensional MAS NMR. *J. Biomol. NMR* **62**, 299–310 (2015).
  - 169. Saurel, O., Iordanov, I., Nars, G., Demange, P., Le Marchand, T., Andreas, L. B., Pintacuda, G. & Milon, A. Local and global dynamics in Klebsiella pneumoniae outer membrane protein a in lipid bilayers probed at atomic resolution. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 1590–1597 (2017).
  - 170. Park, S. H., Casagrande, F., Chu, M., Maier, K., Kiefer, H. & Opella, S. J. Optimization of purification and refolding of the human chemokine receptor CXCR1 improves the stability of proteoliposomes for structure determination. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 584–591 (2012).
  - 171. Park, S. H., Das, B. B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H. J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A. A., Marassi, F. M. & Opella, S. J. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* **491**, 779–783 (2012).
  - 172. Sanders, C. R. & Prosser, R. S. Bicelles: A model membrane system for all seasons? *Structure* **6**, 1227–1234 (1998).
  - 173. De Angelis, A. A. & Opella, S. J. Bicelle samples for solid-state NMR of membrane proteins. *Nat. Protoc.* **2**, 2332–2338 (2007).
  - 174. Faham, S. & Bowie, J. U. Bicelle crystallization: A new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J. Mol. Biol.* **316**, 1–6 (2002).
  - 175. Poulos, S., Morgan, J. L. W., Zimmer, J. & Faham, S. Bicelles Coming of Age: An Empirical Approach to Bicelle Crystallization. in *Methods in Enzymology* vol. 557 393–416 (Elsevier Inc., 2015).
  - 176. Tribet, C., Audebert, R. & Popot, J.-L. Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15047–15050 (1996).
  - 177. Dahmane, T., Rappaport, F. & Popot, J. L. Amphipol-assisted folding of bacteriorhodopsin in the presence or absence of lipids: Functional consequences. *Eur. Biophys. J.* **42**, 85–101 (2013).
  - 178. Martinez, K. L., Gohon, Y., Corringer, P. J., Tribet, C., Mérola, F., Changeux, J. P. & Popot, J. L. Allosteric transitions of Torpedo acetylcholine receptor in lipids, detergent and amphipols: molecular interactions vs. physical constraints. *FEBS Lett.* **528**, 251–256 (2002).
  - 179. Zoonens, M. & Popot, J.-L. Amphipols for Each Season. *J. Membr. Biol.* **247**, 759–706 (2014).
  - 180. Le Bon, C., Marconnet, A., Masscheleyn, S., Popot, J. L. & Zoonens, M. Folding and stabilizing membrane proteins in amphipol A8-35. *Methods* **147**, 95–105 (2018).
  - 181. Giusti, F., Rieger, J., Catoire, L. J., Qian, S., Calabrese, A. N., Watkinson, T. G., Casiraghi, M., Radford, S. E., Ashcroft, A. E. & Popot, J.-L. Synthesis, Characterization and Applications of a Perdeuterated Amphipol. *J. Membr. Biol.* **247**, 909–924 (2014).
  - 182. Giusti, F., Popot, J. L. & Tribet, C. Well-defined Critical Association Concentration and Rapid Adsorption at the Air/Water Interface of a Short Amphiphilic Polymer, Amphipol A8-35: A study

- by Förster Resonance Energy Transfer and Dynamic Surface Tension Measurements. *Langmuir* **28**, 10372–10380 (2012).
- 183. Pocanschi, C. L., Dahmane, T., Gohon, Y., Rappaport, F., Apell, H. J., Kleinschmidt, J. H. & Popot, J. L. Amphipathic polymers: Tools to fold integral membrane proteins to their active form. *Biochemistry* **45**, 13954–13961 (2006).
  - 184. Rahmeh, R., Damian, M., Cottet, M., Orcel, H., Mendre, C., Durroux, T., Sharma, K. S., Durand, G., Pucci, B., Trinquet, E., Zwier, J. M., Deupi, X., Bron, P., Banères, J. L., Mouillac, B. & Granier, S. Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6733–6738 (2012).
  - 185. Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J. L. & Le Maire, M. Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 18623–18637 (2000).
  - 186. Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., Le Maire, M., Popot, J. L. & Champeil, P. Protective and Inhibitory Effects of Various Types of Amphipols on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: A Comparative Study. *Biochemistry* **45**, 1861–1869 (2006).
  - 187. Mary, S., Damian, M., Rahmeh, R., Mouillac, B., Marie, J., Granier, S. & Banères, J. L. Amphipols in G Protein-Coupled Receptor Pharmacology: What Are They Good For? *J. Membr. Biol.* **247**, 853–860 (2014).
  - 188. Dahmane, T., Damian, M., Mary, S., Popot, J. L. & Banères, J. L. Amphipol-assisted in vitro folding of G protein-coupled receptors. *Biochemistry* **48**, 6516–6521 (2009).
  - 189. Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Suivaji Sharma, K., Catoire, L. J., Mary, S., Le Bon, C., Point, E., Banères, J. L., Durand, G., Zito, F., Pucci, B. & Popot, J. L. Nonionic Homopolymeric Amphipols: Application to Membrane Protein Folding, Cell-free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* **51**, 1416–1430 (2012).
  - 190. Zoonens, M., Catoire, L. J., Giusti, F. & Popot, J. L. NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8893–8898 (2005).
  - 191. Catoire, L. J., Zoonens, M., Van Heijenoort, C., Giusti, F., Guittet, É. & Popot, J. L. Solution NMR mapping of water-accessible residues in the transmembrane  $\beta$ -barrel of OmpX. *Eur. Biophys. J.* **39**, 623–630 (2010).
  - 192. Etzkorn, M., Zoonens, M., Catoire, L. J., Popot, J. L. & Hiller, S. How Amphipols Embed Membrane Proteins: Global Solvent Accessibility and Interaction with a Flexible Protein Terminus. *J. Membr. Biol.* **247**, 965–970 (2014).
  - 193. Etzkorn, M., Raschle, T., Hagn, F., Gelev, V., Rice, A. J., Walz, T. & Wagner, G. Cell-free Expressed Bacteriorhodopsin in Different Soluble Membrane Mimetics: Biophysical Properties and NMR Accessibility. *Structure* **21**, 394–401 (2013).
  - 194. Catoire, L. J., Damian, M., Giusti, F., Martin, A., Heijenoort, C. Van, Popot, J. L., Guittet, É. & Banères, J. L. Structure of a GPCR ligand in its receptor-bound state: Leukotriene B4 adopts a highly constrained conformation when associated to human BLT2. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9049–9057 (2010).
  - 195. Popot, J.-L. *Membrane Proteins in Aqueous Solutions -From Detergents to Amphipols. Biological and Medical Physics Biomedical Engineering* (2018).
  - 196. Cvetkov, T. L., Huynh, K. W., Cohen, M. R. & Moiseenkova-Bell, V. Y. Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **286**, 38168–38176 (2011).
  - 197. Paulsen, C. E., Armache, J. P., Gao, Y., Cheng, Y. & Julius, D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **520**, 511–517 (2015).
  - 198. Watkinson, T. G., Calabrese, A. N., Giusti, F., Zoonens, M., Radford, S. E. & Ashcroft, A. E. Systematic analysis of the use of amphipathic polymers for studies of outer membrane proteins using mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **391**, 54–61 (2015).
  - 199. Bechara, C., Bolbach, G., Bazzacco, P., Sharma, K. S., Durand, G., Popot, J. L., Zito, F. & Sagan, S. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of amphipol-trapped membrane proteins. *Anal.*

- Chem. **84**, 6128–6135 (2012).
- 200. Catoire, L. J., Zoonens, M., van Heijenoort, C., Giusti, F., Popot, J. L. & Guittet, E. Inter- and intramolecular contacts in a membrane protein/surfactant complex observed by heteronuclear dipole-to-dipole cross-relaxation. *J. Magn. Reson.* **197**, 91–95 (2009).
  - 201. Leney, A. C., McMorran, L. M., Radford, S. E. & Ashcroft, A. E. Amphipathic polymers enable the study of functional membrane proteins in the gas phase. *Anal. Chem.* **84**, 9841–9847 (2012).
  - 202. Zubcevic, L., Hsu, A. L., Borgnia, M. J. & Lee, S. Y. Symmetry transitions during gating of the TRPV2 ion channel in lipid membranes. *Elife* **8**, (2019).
  - 203. Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V. & Sligar, S. G. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* **2**, 853–856 (2002).
  - 204. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 481–486 (2016).
  - 205. Bao, H., Duong, F. & Chan, C. S. A step-by-step method for the reconstitution of an ABC transporter into nanodisc lipid particles. *J. Vis. Exp.* **66**, (2012).
  - 206. Guyot, L., Hartmann, L., Mohammed-Bouteben, S., Caro, L. & Wagner, R. Preparation of Recombinant Membrane Proteins from *Pichia pastoris* for Molecular Investigations. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **100**, (2020).
  - 207. Goddard, A. D., Dijkman, P. M., Adamson, R. J., Dos Reis, R. I. & Watts, A. Reconstitution of Membrane Proteins: A GPCR as an Example. *Methods Enzymol.* **556**, 405–424 (2015).
  - 208. Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A. & Sligar, S. G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3477–3487 (2004).
  - 209. Sligar, S. G. & Denisov, I. G. Nanodiscs: A toolkit for membrane protein science. *Protein Sci.* **30**, 297–315 (2021).
  - 210. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem. Rev.* **117**, 4669–4713 (2017).
  - 211. Lavington, S. & Watts, A. Lipid nanoparticle technologies for the study of G protein-coupled receptors in lipid environments. *Biophys. Rev.* **12**, 1287–1302 (2020).
  - 212. Leitz, A. J., Bayburt, T. H., Barnakov, A. N., Springer, B. A. & Sligar, S. G. Functional reconstitution of  $\beta$ 2-adrenergic receptors utilizing self-assembling Nanodisc technology. *Biotechniques* **40**, 601–612 (2006).
  - 213. Whorton, M. R., Bokoch, M. P., Rasmussen, S. G. F., Huang, B., Zare, R. N., Kobilka, B. & Sunahara, R. K. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7682–7687 (2007).
  - 214. El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Banères, J. L., Rondard, P. & Pin, J. P. Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16342–16347 (2012).
  - 215. Damian, M., Marie, J., Leyris, J. P., Fehrentz, J. A., Verdié, P., Martinez, J., Banères, J. L. & Mary, S. High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: A study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J. Biol. Chem.* **287**, 3630–3641 (2012).
  - 216. Bocquet, N., Kohler, J., Hug, M. N., Kusznir, E. A., Rufer, A. C., Dawson, R. J., Hennig, M., Ruf, A., Huber, W. & Huber, S. Real-time monitoring of binding events on a thermostabilized human A2A receptor embedded in a lipid bilayer by surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 1224–1233 (2015).
  - 217. Kuszak, A. J., Pitchiaya, S., Anand, J. P., Mosberg, H. I., Walter, N. G. & Sunahara, R. K. Purification and functional reconstitution of monomeric  $\mu$ -opioid receptors. Allosteric modulation of agonists binding by Gi2. *J. Biol. Chem.* **284**, 26732–26741 (2009).
  - 218. Adamson, R. J. & Watts, A. Kinetics of the early events of GPCR signalling. *FEBS Lett.* **588**, 4701–4707 (2014).

219. Bayburt, T. H., Vishnivetskiy, S. A., McLean, M. A., Morizumi, T., Huang, C. C., Tesmer, J. J. G., Ernst, O. P., Sligar, S. G. & Gurevich, V. V. Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *J. Biol. Chem.* **286**, 1420–1428 (2011).
220. Inagaki, S., Ghirlando, R., White, J. F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Northup, J. K. & Grisshammer, R. Modulation of the interaction between neuropeptide receptor NTS1 and Gq protein by lipid. *J. Mol. Biol.* **417**, 95–111 (2012).
221. Inagaki, S., Ghirlando, R., Vishnivetskiy, S. A., Homan, K. T., White, J. F., Tesmer, J. J. G., Gurevich, V. V. & Grisshammer, R. G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) and 5 (GRK5) Exhibit Selective Phosphorylation of the Neuropeptide Receptor in Vitro. *Biochemistry* **54**, 4320–4329 (2015).
222. Dawaliby, R., Trubbia, C., Delporte, C., Masureel, M., Van Antwerpen, P., Kobilka, B. K. & Govaerts, C. Allosteric Regulation of GPCR Activity by Phospholipids. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 35–39 (2016).
223. Strohman, M. J., Maeda, S., Hilger, D., Masureel, M., Du, Y. & Kobilka, B. K. Local membrane charge regulates  $\beta$ 2 adrenergic receptor coupling to Gi3. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
224. Eggensperger, S., Fisette, O., Parcej, D., Schäfer, L. V. & Tampé, R. An annular lipid belt is essential for allosteric coupling and viral inhibition of the antigen translocation complex TAP (Transporter Associated with Antigen Processing). *J. Biol. Chem.* **289**, 33098–33108 (2014).
225. Kawai, T., Caaveiro, J. M. M., Abe, R., Katagiri, T. & Tsumoto, K. Catalytic activity of MsbA reconstituted in nanodisc particles is modulated by remote interactions with the bilayer. *FEBS Lett.* **585**, 3533–3537 (2011).
226. Borch, J., Torta, F., Sligar, S. G. & Roepstorff, P. Nanodiscs for immobilization of lipid bilayers and membrane receptors: Kinetic analysis of cholera toxin binding to a glycolipid receptor. *Anal. Chem.* **80**, 6245–6252 (2008).
227. Das, A., Zhao, J., Schatz, G. C., Sligar, S. G. & Van Duyne, R. P. Screening of Type I and II Drug Binding to Human Cytochrome P450-3A4 in Nanodiscs by Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.* **81**, 3754–3759 (2009).
228. Trahey, M., Jiarong Li, M., Kwon, H., Woodahl, E. L., McClary, W. D. & Atkins, W. M. Applications of Lipid Nanodiscs for the Study of Membrane Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **81**, 29.13.1-29.13.16 (2015).
229. Efremov, R. G., Leitner, A., Aebersold, R. & Raunser, S. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* **517**, 39–43 (2015).
230. Yin, J., Chen, K. Y. M., Clark, M. J., Hijazi, M., Kumari, P., Bai, X. Chen, Sunahara, R. K., Barth, P. & Rosenbaum, D. M. Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane. *Nature* **584**, 125–129 (2020).
231. Lee, Y., Warne, T., Nehmé, R., Pandey, S., Dwivedi-Agnihotri, H., Chaturvedi, M., Edwards, P. C., García-Nafría, J., Leslie, A. G. W., Shukla, A. K. & Tate, C. G. Molecular basis of  $\beta$ -arrestin coupling to formoterol-bound  $\beta$ 1-adrenoceptor. *Nature* **583**, 862–866 (2020).
232. Staus, D. P., Hu, H., Robertson, M. J., Kleinhenz, A. L. W., Wingler, L. M., Capel, W. D., Latorraca, N. R., Lefkowitz, R. J. & Skiniotis, G. Structure of the M2 muscarinic receptor– $\beta$ -arrestin complex in a lipid nanodisc. *Nature* **579**, 297–302 (2020).
233. Zhao, D. Y., Pöge, M., Morizumi, T., Gulati, S., Van Eps, N., Zhang, J., Miszta, P., Filipek, S., Mahamid, J., Plitzko, J. M., Baumeister, W., Ernst, O. P. & Palczewski, K. Cryo-EM structure of the native rhodopsin dimer in nanodiscs. *J. Biol. Chem.* **294**, 14215–14230 (2019).
234. Li, Y., Kijac, A. Z., Sligar, S. G. & Rienstra, C. M. Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys. J.* **91**, 3819–3828 (2006).
235. Mineev, K. S., Goncharuk, S. A., Kuzmichev, P. K., Vilar, M. & Arseniev, A. S. NMR Dynamics of Transmembrane and Intracellular Domains of p75NTR in Lipid-Protein Nanodiscs. *Biophys. J.* **109**, 772–782 (2015).
236. Zhang, M., Huang, R., Ackermann, R., Im, S. C., Waskell, L., Schwendeman, A. & Ramamoorthy,

- A. Reconstitution of the Cytb5-CytP450 Complex in Nanodiscs for Structural Studies using NMR Spectroscopy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 4497–4499 (2016).
237. Hagn, F. & Wagner, G. Structure refinement and membrane positioning of selectively labeled OmpX in phospholipid nanodiscs. *J. Biomol. NMR* **61**, 249–260 (2015).
238. Kucharska, I., Edrington, T. C., Liang, B. & Tamm, L. K. Optimizing nanodiscs and bicelles for solution NMR studies of two  $\beta$ -barrel membrane proteins. *J. Biomol. NMR* **61**, 261–274 (2015).
239. Morgado, L., Zeth, K., Burmann, B. M., Maier, T. & Hiller, S. Characterization of the insertase BamA in three different membrane mimetics by solution NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **61**, 333–345 (2015).
240. Casiraghi, M., Damian, M., Lescop, E., Point, E., Moncoq, K., Morellet, N., Levy, D., Marie, J., Guittet, E., Banères, J. L. & Catoire, L. J. Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a Lipid Bilayer. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 11170–11175 (2016).
241. Alvarez, F. J. D., Orelle, C., Huang, Y., Bajaj, R., Michael, R., Klug, C. S. & Davidson, A. L. Full engagement of liganded maltose-binding protein stabilizes a semi-open ATP-binding cassette dimer in the maltose transporter. *Mol. Microbiol.* **98**, 878–894 (2015).
242. Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S. & Shimada, I. Functional dynamics of deuterated  $\beta$ 2-adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 13376–13379 (2014).
243. Yoshiura, C., Ueda, T., Kofuku, Y., Matsumoto, M., Okude, J., Kondo, K., Shiraishi, Y. & Shimada, I. Elucidation of the CCR1- and CCR5-binding modes of MIP-1 $\alpha$  by application of an NMR spectra reconstruction method to the transferred cross-saturation experiments. *J. Biomol. NMR* **63**, 333–340 (2015).
244. Sadler, E. E., Kapanidis, A. N. & Tucker, S. J. Solution-Based Single-Molecule FRET Studies of K $^{+}$  Channel Gating in a Lipid Bilayer. *Biophys. J.* **110**, 2663–2670 (2016).
245. Zocher, M., Roos, C., Wegmann, S., Bosshart, P. D., Dötsch, V., Bernhard, F. & Müller, D. J. Single-Molecule Force Spectroscopy from Nanodiscs: An assay to Quantify Folding, Stability, and Interactions of Native Membrane Proteins. *ACS Nano* **6**, 961–971 (2012).
246. Baas, B. J., Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Homotropic cooperativity of monomeric cytochrome P450 3A4 in a nanoscale native bilayer environment. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**, 218–228 (2004).
247. Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V. & Sligar, S. G. Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Arch. Biochem. Biophys.* **450**, 215–222 (2006).
248. Bayburt, T. H., Leitz, A. J., Xie, G., Oprian, D. D. & Sligar, S. G. Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *J. Biol. Chem.* **282**, 14875–14881 (2007).
249. Georgieva, E. R. Nanoscale lipid membrane mimetics in spin-labeling and electron paramagnetic resonance spectroscopy studies of protein structure and function. *Nanotechnol. Rev.* **6**, 75–92 (2017).
250. Van Eps, N., Altenbach, C., Caro, L. N., Latorraca, N. R., Hollingsworth, S. A., Dror, R. O., Ernst, O. P. & Hubbell, W. L. Gi- and Gs-coupled GPCRs show different modes of G-protein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 2383–2388 (2018).
251. Van Eps, N., Caro, L. N., Morizumi, T., Kusnetzow, A. K., Szczepek, M., Hofmann, K. P., Bayburt, T. H., Sligar, S. G., Ernst, O. P. & Hubbell, W. L. Conformational equilibria of light-activated rhodopsin in nanodiscs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E3268–E3275 (2017).
252. Skrzypek, R., Iqbal, S. & Callaghan, R. Methods of reconstitution to investigate membrane protein function. *Methods* **147**, 126–141 (2018).
253. Knowles, T. J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y. P., Dafforn, T. & Overduin, M. Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7484–7485 (2009).
254. Jamshad, M., Charlton, J., Lin, Y.-P., Routledge, S. J., Bawa, Z., Knowles, T. J., Overduin, M.,

- Dekker, N., Dafforn, T. R., Bill, R. M., Poyner, D. R. & Wheatley, M. G-Protein-Coupled Receptor Solubilization and Purification for Biophysical Analysis and Functional Studies, in the Total Absence of Detergent. *Biosci. Rep.* **35**, (2015).
255. Orwick-Rydmark, M., Lovett, J. E., Lindholm, L., Graziadei, A., Hicks, M. & Watts, A. Detergent-free Incorporation of a Seven-Transmembrane Receptor Protein into Nanosized Bilayer Lipodisq® Particles for Functional and Biophysical Studies - supplementary data. *Nano Lett.* **12**, 4687–4692 (2012).
256. Dörr, J. M., Koorengevel, M. C., Schäfer, M., Prokofyev, A. V., Scheidelaar, S., van der Cruijsen, E. A. W., Dafforn, T. R., Baldus, M. & Killian, J. A. Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K<sup>+</sup> channel: The power of native nanodiscs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 18607–18612 (2014).
257. Hothersall, J. D., Jones, A. Y., Dafforn, T. R., Perrior, T. & Chapman, K. L. Releasing the technical 'shackles' on GPCR drug discovery: opportunities enabled by detergent-free polymer lipid particle (PoLiPa) purification. *Drug Discov. Today* **25**, 1944–1956 (2020).
258. Pollock, N. L., Lee, S. C., Patel, J. H., Gulamhussein, A. A. & Rothnie, A. J. Structure and function of membrane proteins encapsulated in a polymer-bound lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 809–817 (2018).
259. Dörr, J. M., Scheidelaar, S., Koorengevel, M. C., Dominguez, J. J., Schäfer, M., van Walree, C. A. & Killian, J. A. The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur. Biophys. J.* **45**, 3–21 (2016).
260. Scheidelaar, S., Koorengevel, M. C., Pardo, J. D., Meeldijk, J. D., Breukink, E. & Killian, J. A. Molecular model for the solubilization of membranes into nanodisks by styrene maleic acid copolymers. *Biophys. J.* **108**, 279–290 (2015).
261. Xue, M., Cheng, L., Faustino, I., Guo, W. & Marrink, S. J. Molecular Mechanism of Lipid Nanodisk Formation by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophys. J.* **115**, 494–502 (2018).
262. Frauenfeld, J., Löving, R., Armache, J.-P., Sonnen, A., Guettou, F., Moberg, P., Zhu, L., Jegerschöld, C., Flayhan, A., Briggs, J. A. G., Garoff, H., Löw, C., Cheng, Y. & Nordlund, P. A novel lipoprotein nanoparticle system for membrane proteins. *Nat. Methods* **13**, 345–351 (2016).
263. Lyons, J. A., Bøggild, A., Nissen, P. & Frauenfeld, J. Saposin-Lipoprotein Scaffolds for Structure Determination of Membrane Transporters. in *Methods in Enzymology* vol. 594 85–99 (Elsevier Inc., 2017).
264. Nguyen, N. X., Armache, J.-P., Lee, C., Yang, Y., Zeng, W., Mootha, V. K., Cheng, Y., Bai, X. & Jiang, Y. Cryo-EM structure of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **559**, 570–574 (2018).
265. Chien, C. T. H., Helfinger, L. R., Bostock, M. J., Solt, A., Tan, Y. L. & Nietlispach, D. An Adaptable Phospholipid Membrane Mimetic System for Solution NMR Studies of Membrane Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 14829–14832 (2017).
266. Flayhan, A., Mertens, H. D. T., Ural-Blimke, Y., Martinez Molledo, M., Svergun, D. I. & Löw, C. Saposin Lipid Nanoparticles: A Highly Versatile and Modular Tool for Membrane Protein Research. *Structure* **26**, 345–355 (2018).
267. Kehlenbeck, D. M., Josts, I., Nitsche, J., Busch, S., Forsyth, T. & Tidow, H. Comparison of lipidic carrier systems for integral membrane proteins - MsbA as case study. *Biol. Chem.* **400**, 1509–1518 (2019).
268. Kanonenberg, K., Smits, S. H. J. & Schmitt, L. Functional Reconstitution of HlyB, a Type I Secretion ABC Transporter, in Saposin-A Nanoparticles. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
269. Lloris-Garcera, P., Klinter, S., Chen, L., Skynner, M. J., Löving, R. & Frauenfeld, J. DirectMX – One-Step Reconstitution of Membrane Proteins From Crude Cell Membranes Into Salipro Nanoparticles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, (2020).
270. Carlson, M. L., Young, J. W., Zhao, Z., Fabre, L., Jun, D., Li, J., Li, J., Dhupar, H. S., Wason, I., Mills, A. T., Beatty, J. T., Klassen, J. S., Rouiller, I. & Duong, F. The peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins in detergent-free solution. *Elife* **7**, (2018).

271. Marconnet, A., Michon, B., Le Bon, C., Giusti, F., Tribet, C. & Zoonens, M. Solubilization and Stabilization of Membrane Proteins by Cycloalkane-Modified Amphiphilic Polymers. *Biomacromolecules* **21**, 3459–3467 (2020).
272. Overduin, M., Trieber, C., Prosser, R. S., Picard, L. P. & Sheff, J. G. Structures and dynamics of native-state transmembrane protein targets and bound lipids. *Membranes (Basel)*. **11**, (2021).
273. Ravula, T., Ramadugu, S. K., Di Mauro, G. & Ramamoorthy, A. Bioinspired, size-tunable self-assembly of polymer-lipid bilayer nanodiscs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 11466–11470 (2017).
274. Ravula, T., Hardin, N. Z., Ramadugu, S. K. & Ramamoorthy, A. pH Tunable and Divalent Metal Ion Tolerant Polymer Lipid Nanodiscs. *Am. Chem. Soc.* **33**, 10655–10662 (2017).
275. Yang, L., Catalano, C., Xu, Y., Qiu, W., Zhang, D., McDermott, A., Guo, Y. & Blount, P. A native cell membrane nanoparticles system allows for high-quality functional proteoliposome reconstitution. *BBA Adv.* **1**, (2021).
276. Lindhoud, S., Carvalho, V., Pronk, J. W. & Aubin-Tam, M. E. SMA-SH: Modified Styrene-Maleic Acid Copolymer for Functionalization of Lipid Nanodiscs. *Biomacromolecules* **17**, 1516–1522 (2016).
277. Hall, S. C. L., Tognoloni, C., Charlton, J., Bragginton, É. C., Rothnie, A. J., Sridhar, P., Wheatley, M., Knowles, T. J., Arnold, T., Edler, K. J. & Dafforn, T. R. An acid-compatible co-polymer for the solubilization of membranes and proteins into lipid bilayer-containing nanoparticles. *Nanoscale* **10**, 10609–10619 (2018).
278. Ravula, T., Hardin, N. Z., Ramadugu, S. K., Cox, S. J. & Ramamoorthy, A. Formation of pH-Resistant Monodispersed Polymer-Lipid Nanodiscs. *Angew. Chemie* **57**, 1342–1345 (2018).
279. Fiori, M. C., Jiang, Y., Altenberg, G. A. & Liang, H. Polymer-encased nanodiscs with improved buffer compatibility. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
280. Esmaili, M., Acevedo-Morantes, C., Wille, H. & Overduin, M. The effect of hydrophobic alkyl sidechains on size and solution behaviors of nanodiscs formed by alternating styrene maleamic copolymer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, (2020).
281. Oluwole, A. O., Danielczak, B., Meister, A., Babalola, J. O., Vargas, C. & Keller, S. Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 1919–1924 (2017).
282. Yasuhara, K., Arakida, J., Ravula, T., Ramadugu, S. K., Sahoo, B., Kikuchi, J. I. & Ramamoorthy, A. Spontaneous Lipid Nanodisc Fomation by Amphiphilic Polymethacrylate Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18657–18663 (2017).
283. Hardin, N. Z., Ravula, T., Mauro, G. Di & Ramamoorthy, A. Hydrophobic Functionalization of Polyacrylic Acid as a Versatile Platform for the Development of Polymer Lipid Nanodisks. *Small* **1804813**, (2019).
284. Smith, A. A. A., Autzen, H. E., Faust, B., Mann, J. L., Muir, B. W., Howard, S., Postma, A., Spakowitz, A. J., Cheng, Y. & Appel, E. A. Lipid Nanodiscs via Ordered Copolymers. *Chem* **6**, (2020).
285. Esmaili, M., Brown, C. J., Shaykhutdinov, R., Acevedo-Morantes, C., Wang, Y. L., Wille, H., Gandour, R. D., Turner, S. R. & Overduin, M. Homogeneous nanodiscs of native membranes formed by stilbene-maleic-acid copolymers. *Nanoscale* **12**, 16705–16709 (2020).
286. Unger, L., Ronco-Campaña, A., Kitchen, P., Bill, R. M. & Rothnie, A. J. Biological insights from SMA-extracted proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 1349–1359 (2021).
287. Gulati, S., Jamshad, M., Knowles, T. J., Morrison, K. A., Downing, R., Cant, N., Collins, R., Koenderink, J. B., Ford, R. C., Overduin, M., Kerr, I. D., Dafforn, T. R. & Rothnie, A. J. Detergent-free purification of ABC (ATP-binding-cassette) transporters. *Biochem. J.* **461**, 269–278 (2014).
288. Rehan, S., Paavilainen, V. O. & Jaakola, V. P. Functional reconstitution of human equilibrative nucleoside transporter-1 into styrene maleic acid co-polymer lipid particles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859**, 1059–1065 (2017).
289. Grime, R. L., Goulding, J., Uddin, R., Stoddart, L. A., Hill, S. J., Poyner, D. R., Briddon, S. J. & Wheatley, M. Single molecule binding of a ligand to a G-protein-coupled receptor in real time

- using fluorescence correlation spectroscopy, rendered possible by nano-encapsulation in styrene maleic acid lipid particles. *Nanoscale* **12**, 11518–11525 (2020).
290. Routledge, S. J., Jamshad, M., Little, H. A., Lin, Y. P., Simms, J., Thakker, A., Spickett, C. M., Bill, R. M., Dafforn, T. R., Poyner, D. R. & Wheatley, M. Ligand-induced conformational changes in a SMALP-encapsulated GPCR. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, 183235 (2020).
291. Logez, C., Damian, M., Legros, C., Dupré, C., Guéry, M., Mary, S., Wagner, R., M'Kadmi, C., Nosjean, O., Fould, B., Marie, J., Fehrentz, J. A., Martinez, J., Ferry, G., Boutin, J. A. & Baneires, J. L. Detergent-free Isolation of Functional G Protein-Coupled Receptors into Nanometric Lipid Particles. *Biochemistry* **55**, 38–48 (2016).
292. Damian, M. et al. GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4501–4506 (2018).
293. Luna, V. M., Vazir, M., Vaish, A., Chong, S., Chen, I. & Yamane, H. K. Generation of membrane proteins in polymer-based lipoparticles as flow cytometry antigens. *Eur. Polym. J.* **109**, 483–488 (2018).
294. Hardy, D., Bill, R. M., Rothnie, A. J. & Jawhari, A. Stabilization of Human Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) Using Novel Solubilization Agents. *SLAS Discov.* **24**, 1009–1017 (2019).
295. Horsey, A. J., Briggs, D. A., Holliday, N. D., Briddon, S. J. & Kerr, I. D. Application of fluorescence correlation spectroscopy to study substrate binding in styrene maleic acid lipid copolymer encapsulated ABCG2. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, (2020).
296. Dutta, D., Esmaili, M., Overduin, M. & Fliegel, L. Expression and detergent free purification and reconstitution of the plant plasma membrane Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiporter SOS1 overexpressed in *Pichia pastoris*. *BBA - Biomembr.* (2019) doi:10.1016/j.bbamem.2019.183111.
297. Dilworth, M. V., Findlay, H. E. & Booth, P. J. Detergent-free purification and reconstitution of functional human serotonin transporter (SERT) using diisobutylene maleic acid (DIBMA) copolymer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1863**, (2021).
298. Karlova, M. G., Voskoboynikova, N., Gluhov, G. S., Abramochkin, D., Malak, O. A., Mulkidzhanyan, A., Loussouarn, G., Steinhoff, H.-J., Shaitan, K. V. & Sokolova, O. S. Detergent-free solubilization of human Kv channels expressed in mammalian cells. *Chem. Phys. Lipids* **219**, 50–57 (2019).
299. Yu, J., Zhu, H., Lape, R., Greiner, T., Du, J., Lü, W., Sivilotti, L. & Gouaux, E. Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell* **184**, 957–968 (2021).
300. Stefanski, K. M., Russell, C. M., Westerfield, J. M., Lamichhane, R. & Barrera, F. N. PIP2 promotes conformation-specific dimerization of the EphA2 membrane region. *J. Biol. Chem.* **296**, (2021).
301. Tedesco, D., Maj, M., Malarczyk, P., Cingolani, A., Zaffagnini, M., Wnorowski, A., Czapinski, J., Benelli, T., Mazzoni, R., Bartolini, M. & Józwiak, K. Application of the SMALP technology to the isolation of GPCRs from low-yielding cell lines. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1863**, (2021).
302. Harwood, C. R., Sykes, D. A., Hoare, B. L., Heydenreich, F. M., Uddin, R., Poyner, D. R., Briddon, S. J. & Veprintsev, D. B. Functional solubilization of the  $\beta$ 2-adrenoceptor using diisobutylene maleic acid. *iScience* **24**, 103362 (2021).
303. Lavington, S. & Watts, A. Detergent-free solubilisation & purification of a G protein coupled receptor using a polymethacrylate polymer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1863**, (2021).
304. Bada Juarez, J. F., Muñoz-García, J. C., Inácio dos Reis, R., Henry, A., McMillan, D., Kriek, M., Wood, M., Vandenplas, C., Sands, Z., Castro, L., Taylor, R. & Watts, A. Detergent-free extraction of a functional low-expressing GPCR from a human cell line. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, 183152 (2020).
305. Ayub, H., Clare, M., Milic, I., Chmel, N. P., Böning, H., Devitt, A., Krey, T., Bill, R. M. & Rothnie, A. J. CD81 extracted in SMALP nanodiscs comprises two distinct protein populations within a lipid environment enriched with negatively charged headgroups. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, 183419 (2020).

306. Broecker, J., Eger, B. T. & Ernst, O. P. Crystallogenesis of Membrane Proteins Mediated by Polymer-Bounded Lipid Nanodiscs. *Structure* **25**, 384–392 (2017).
307. Postis, V., Rawson, S., Mitchell, J. K., Lee, S. C., Parslow, R. A., Dafforn, T. R., Baldwin, S. A. & Muench, S. P. The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 496–501 (2015).
308. Qiu, W., Fu, Z., Xu, G. G., Grassucci, R. A., Zhang, Y., Frank, J., Hendrickson, W. A. & Guo, Y. Structure and activity of lipid bilayer within a membrane-protein transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 12985–12990 (2018).
309. Lee, S. C., Collins, R., Lin, Y. pin, Jamshad, M., Broughton, C., Harris, S. A., Hanson, B. S., Tognoloni, C., Parslow, R. A., Terry, A. E., Rodger, A., Smith, C. J., Edler, K. J., Ford, R., Roper, D. I. & Dafforn, T. R. Nano-encapsulated Escherichia coli Divisome Anchor ZipA, and in Complex with FtsZ. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
310. Tascón, I., Sousa, J. S., Corey, R. A., Mills, D. J., Griwatz, D., Aumüller, N., Mikusevic, V., Stansfeld, P. J., Vonck, J. & Hänelt, I. Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
311. Flegler, V. J., Rasmussen, A., Rao, S., Wu, N., Zenobi, R., Sansom, M. S. P., Hedrich, R., Rasmussen, T. & Böttcher, B. The MscS-like channel Ynal has a gating mechanism based on flexible pore helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 28754–28762 (2020).
312. Johnson, R. M., Fais, C., Parmar, M., Cheruvara, H., Marshall, R. L., Hesketh, S. J., Feasey, M. C., Ruggerone, P., Vargiu, A. V., Postis, V. L. G., Muench, S. P. & Bavro, V. N. Cryo-EM structure and molecular dynamics analysis of the fluoroquinolone resistant mutant of the AcrB transporter from *Salmonella*. *Microorganisms* **8**, (2020).
313. Caveney, N. A., Workman, S. D., Yan, R., Atkinson, C. E., Yu, Z. & Strynadka, N. C. J. CryoEM structure of the antibacterial target PBP1b at 3.3 Å resolution. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
314. Li, J., Han, L., Vallese, F., Ding, Z., Choi, S. K., Hong, S., Luo, Y., Liu, B., Chan, C. K., Tajkhorshid, E., Zhu, J., Clarke, O., Zhang, K. & Gennis, R. Cryo-EM structures of *Escherichia coli* cytochrome bo3 reveal bound phospholipids and ubiquinone-8 in a dynamic substrate binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
315. Kumar, P., Cymes, G. D. & Grosman, C. Structure and function at the lipid-protein interface of a pentameric ligand-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
316. Yoder, N. & Gouaux, E. The His-Gly motif of acid-sensing ion channels resides in a reentrant 'loop' implicated in gating and ion selectivity. *Elife* **9**, (2020).
317. Smith, A. A. A., Autzen, H. E., Faust, B., Mann, J. L., Muir, B. W., Howard, S., Postma, A., Spakowitz, A. J., Cheng, Y. & Appel, E. A. Lipid Nanodiscs via Ordered Copolymers. *Chem* **6**, 1–14 (2020).
318. Voskoboinikova, N., Karlova, M., Kurre, R., Mulkidjanian, A. Y., Shaitan, K. V., Sokolova, O. S., Steinhoff, H. J. & Heinisch, J. J. A three-dimensional model of the yeast transmembrane sensor Wsc1 obtained by SMA-based detergent-free purification and transmission electron microscopy. *J. Fungi* **7**, (2021).
319. Deng, Y. N., Kashtoh, H., Wang, Q., Zhen, G. X., Li, Q. Y., Tang, L. H., Gao, H. L., Zhang, C. R., Qin, L., Su, M., Li, F., Huang, X. H., Wang, Y. C., Xie, Q., Clarke, O. B., Hendrickson, W. A. & Chen, Y. H. Structure and activity of SLAC1 channels for stomatal signaling in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
320. Alkhalfioui, F., Logez, C., Bornert, O. & Wagner, R. Expression Systems: *Pichia pastoris*. in *Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation* 75–108 (2011).
321. Igonet, S., Raingeval, C., Cecon, E., Pučić-Baković, M., Lauc, G., Cala, O., Baranowski, M., Perez, J., Jockers, R., Krimm, I. & Jawhari, A. Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR: A case study of adenosine receptor. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
322. Logez, C., Berger, S., Legros, C., Banères, J. L., Cohen, W., Delagrange, P., Nosjean, O., Boutin, J. A., Ferry, G., Simonin, F. & Wagner, R. Recombinant human melatonin receptor MT1 isolated in mixed detergents shows pharmacology similar to that in mammalian cell membranes. *PLoS*

- One **9**, (2014).
323. Zollmann, T., Moiset, G., Tumulka, F., Tampé, R., Poolman, B. & Abele, R. Single liposome analysis of peptide translocation by the ABC transporter TAPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2046–2051 (2015).
324. Shalaly, N. D., Aneiros, E., Blank, M., Mueller, J., Nyman, E., Blind, M., Dabrowski, M. A., Andersson, C. V. & Sandberg, K. Positive modulation of the glycine receptor by means of glycine receptor-binding aptamers. *J. Biomol. Screen.* **20**, 1112–1123 (2015).
325. Bornert, O., Møller, T. C., Boeuf, J., Candusso, M. P., Wagner, R., Martinez, K. L. & Simonin, F. Identification of a Novel Protein-Protein Interaction Motif Mediating Interaction of GPCR-Associated Sorting Proteins with G Protein-Coupled Receptors. *PLoS One* **8**, e56336 (2013).
326. Doshi, R., McGrath, A. P., Piñeros, M., Szewczyk, P., Garza, D. M., Kochian, L. V. & Chang, G. Functional characterization and discovery of modulators of SbMATE, the agronomically important aluminium tolerance transporter from Sorghum bicolor. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
327. Rosell, A., Meury, M., Álvarez-Marimon, E., Costa, M., Pérez-Cano, L., Zorzano, A., Fernández-Recio, J., Palacián, M. & Fotiadis, D. Structural bases for the interaction and stabilization of the human amino acid transporter LAT2 with its ancillary protein 4F2hc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2966–2971 (2014).
328. Brohawn, S. G., Su, Z. & MacKinnon, R. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3614–3619 (2014).
329. Schölz, C., Parcej, D., Ejsing, C. S., Robenek, H., Urbatsch, I. L. & Tampe, R. Specific lipids modulate the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Biol. Chem.* **286**, 13346–13356 (2011).
330. Ampah-Korsah, H., Sonntag, Y., Engfors, A., Kirscht, A., Kjellbom, P. & Johanson, U. Single amino acid substitutions in the selectivity filter render NbXIP1;1 $\alpha$  aquaporin water permeable. *BMC Plant Biol.* **17**, (2017).
331. Christenson, E. T., Gallegos, A. S. & Banerjee, A. In vitro reconstitution, functional dissection, and mutational analysis of metal ion transport by mitoferrin-1. *J. Biol. Chem.* **293**, 3819–3828 (2018).
332. Kapri-Pardes, E., Katz, A., Haviv, H., Mahmmoud, Y., Ilan, M., Khalfin-Penigel, I., Carmeli, S., Yarden, O. & Karlish, S. J. D. Stabilization of the  $\alpha$ 2 isoform of Na,K-ATPase by mutations in a phospholipid binding pocket. *J. Biol. Chem.* **286**, 42888–42899 (2011).
333. Deng, Z., Paknejad, N., Maksaei, G., Sala-Rabanal, M., Nichols, C. G., Hite, R. K. & Yuan, P. Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 252–260 (2018).
334. Eddy, M. T., Gao, Z.-G., Mannes, P., Patel, N., Jacobson, K. A., Katritch, V., Stevens, R. C. & Wüthrich, K. Extrinsic Tryptophans as NMR Probes of Allosteric Coupling in Membrane Proteins: Application to the A2A Adenosine Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 8228–8235 (2018).
335. Garaeva, A. A., Guskov, A., Slotboom, D. J. & Paulino, C. A one-gate elevator mechanism for the human neutral amino acid transporter ASCT2. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
336. Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A. D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Iwata, S. & Murata, T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **482**, 237–240 (2012).
337. Kodan, A., Yamaguchi, T., Nakatsu, T., Sakiyama, K., Hipolito, C. J., Fujioka, A., Hirokane, R., Ikeguchi, K., Watanabe, B., Hiratake, J., Kimura, Y., Suga, H., Ueda, K. & Kato, H. Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4049–4054 (2014).
338. Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A. & Jr, D. L. M. K2P2.1 (TREK-1):activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* **547**, 364–368

- (2017).
339. Vinothkumar, K. R., Montgomery, M. G., Liu, S. & Walker, J. E. Structure of the mitochondrial ATP synthase from *Pichia angusta* determined by electron cryo-microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 12709–12714 (2016).
340. Wang, W., Touhara, K. K., Weir, K., Bean, B. P. & MacKinnon, R. Cooperative regulation by G proteins and Na<sup>+</sup> of neuronal GIRK2 K<sup>+</sup> channels. *Elife* **5**, (2016).
341. Ye, L., Neale, C., Sljoka, A., Lyda, B., Pichugin, D., Tsuchimura, N., Larda, S. T., Pomès, R., García, A. E., Ernst, O. P., Sunahara, R. K. & Prosser, R. S. Mechanistic insights into allosteric regulation of the A2A adenosine G protein-coupled receptor by physiological cations. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
342. André, N., Cherouati, N., Prual, C., Steffan, T., Zeder-Lutz, G., Magnin, T., Pattus, F., Michel, H., Wagner, R. & Reinhart, C. Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.* **15**, 1115–1126 (2006).
343. Kermani, A. A. A guide to membrane protein X-ray crystallography. *FEBS J.* (2020).
344. Hansen, R. W., Wang, X., Golab, A., Bornert, O., Oswald, C., Wagner, R. & Martinez, K. L. Functional stability of the human kappa opioid receptor reconstituted in Nanodiscs revealed by a time-resolved scintillation proximity assay. *PLoS One* **11**, e0150658 (2016).
345. Vasseur, L., Cens, T., Wagner, R., Saint, N., Kugler, V., Chavanieu, A., Ouvry, C., Dupré, C., Ferry, G. & Boutin, J. A. Importance of the choice of a recombinant system to produce large amounts of functional membrane protein hERG. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
346. Hartmann, L., Botzanowski, T., Galibert, M., Jullian, M., Chabrol, E., Zeder-Lutz, G., Kugler, V., Stojko, J., Strub, J. M., Ferry, G., Frankiewicz, L., Puget, K., Wagner, R., Cianfran, S. & Boutin, J. A. VHH characterization. Comparison of recombinant with chemically synthesized anti-HER2 VHH. *Protein Sci.* **28**, 1865–1879 (2019).
347. De Lera Ruiz, M., Lim, Y. & Zheng, J. Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target. *J. Med. Chem.* **57**, 3623–3650 (2014).
348. Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F. & Varani, K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol. Rev.* **98**, 1591–1625 (2018).
349. Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K.-N. & Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527–552 (2001).
350. Trevethick, M. A., Mantell, S. J., Stuart, E. F., Barnard, A., Wright, K. N. & Yeadon, M. Treating lung inflammation with agonists of the adenosine A2A receptor: promises, problems and potential solutions. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 463–474 (2008).
351. Jazayeri, A., Andrews, S. P. & Marshall, F. H. Structurally enabled discovery of adenosine A2A receptor antagonists. *Chem. Rev.* **117**, 21–37 (2017).
352. Boknik, P., Eskandar, J., Hofmann, B., Zimmermann, N., Neumann, J. & Gergs, U. Role of Cardiac A2A Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Front. Pharmacol.* **11**, (2021).
353. Leaker, B. R., O'Connor, B., Hansel, T. T., Barnes, P. J., Meng, L., Mathur, V. S. & Lieu, H. D. Safety of regadenoson, an adenosine A2A receptor agonist for myocardial perfusion imaging, in mild asthma and moderate asthma patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Nucl. Cardiol.* **15**, 329–336 (2008).
354. Fuxe, K., Ferré, S., Canals, M., Torvinen, M., Terasmaa, A., Marcellino, D., Goldberg, S. R., Staines, W., Jacobsen, K. X., Lluis, C., Woods, A. S., Agnati, L. F. & Franco, R. Adenosine A2A and the Dopamine D2 Heteromeric Receptor Complexes and Their Function. *J. Mol. Neuroscience* **26**, 209–219 (2005).
355. Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E. I., Lluis, C., Goldberg, S. R., Moratalla, R., Franco, R. & Ferré, S. Striatal Adenosine A2A and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional

- Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2249–2259 (2007).
356. Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutiérrez, M. A., Casadó, V., Fuxe, K., Goldberg, S. R., Lluis, C., Franco, R. & Ciruela, F. Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *PNAS* **99**, 11940–11945 (2002).
357. LeWitt, P. A., Guttman, M., Tetrud, J. W., Tuite, P. J., Mori, A., Chaikin, P. & Sussman, N. M. Adenosine A2A Receptor Antagonist Istradefylline (KW-6002) Reduces 'Off' Time in Parkinson's Disease: A double-blind, Randomized, Multicenter Clinical Trial (6002-US-005). *Ann. Neurol.* **63**, 295–302 (2008).
358. Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P. & Ramkumar, V. Adenosine receptors: Expression, Function and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 2024–2052 (2014).
359. Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G. W. & Tate, C. G. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521–526 (2011).
360. O'Malley, M. A., Lazarova, T., Britton, Z. T. & Robinson, A. S. High-level expression in *Saccharomyces cerevisiae* enables isolation and spectroscopic characterization of functional human adenosine A2A receptor. *J. Struct. Biol.* **159**, 166–178 (2007).
361. Brea, R. J., Cole, C. M., Lyda, B. R., Ye, L., Prosser, R. S., Sunahara, R. K. & Devaraj, N. K. In Situ Reconstitution of the Adenosine A2A Receptor in Spontaneously Formed Synthetic Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 3607–3610 (2017).
362. Piirainen, H., Hellman, M., Tossavainen, H., Permi, P., Kursula, P. & Jaakola, V. P. Human adenosine A2A receptor binds calmodulin with high affinity in a calcium-dependent manner. *Biophys. J.* **108**, 903–917 (2015).
363. Grace, M. S., Bonvini, S. J., Belvisi, M. G. & McIntyre, P. Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol. Ther.* **177**, 9–22 (2017).
364. Darby, W. G., Grace, M. S., Baratchi, S. & McIntyre, P. Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **78**, 217–228 (2016).
365. Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., AndrejŠali, Hudspeth, A. J., Friedman, J. M. & Heller, S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525–535 (2000).
366. Vincent, F. & A.J. Duncton, M. TRPV4 Agonists and Antagonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2216–2226 (2011).
367. Mundt, N., Spehr, M. & Lishko, P. V. TRPV4 is the temperature-sensitive ion channel of human sperm. *Elife* **7**, (2018).
368. Hartmann, L., Kugler, V. & Wagner, R. Heterologous Expression of Membrane Proteins. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1432 143–162 (2016).
369. Bornert, O., Alkhalfioui, F., Logez, C. & Wagner, R. Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris*. in *Current Protocols in Protein Science* (2012).
370. Lee, S. C., Knowles, T. J., Postis, V. L. G., Jamshad, M., Parslow, R. A., Lin, Y. P., Goldman, A., Sridhar, P., Overduin, M., Muench, S. P. & Dafforn, T. R. A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat. Protoc.* **11**, 1149–1162 (2016).
371. Singh, S., Gras, A., Fiez-Vandal, C., Martinez, M., Wagner, R. & Byrne, B. Large-scale production of membrane proteins in *Pichia pastoris*: The production of G protein-coupled receptors as a case study. *Methods Mol. Biol.* **866**, 197–207 (2012).
372. Hartmann, L., Metzger, E., Ottelard, N. & Wagner, R. Direct Extraction and Purification of Recombinant Membrane Proteins from *Pichia pastoris* Protoplasts. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1635 45–56 (Springer, 2017).
373. Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E. In vivo enzymatic protein biotinylation. *Biomol. Eng.* **16**, 119–125 (1999).
374. Logez, C. Etude du récepteur humain de la mélatonine MT1 par des approches in vitro : mise au

- point des conditions de production, de purification et de caractérisation fonctionnelle. (Université de Strasbourg, 2013).
375. Singh, S., Zhang, M., Bertheleme, N., Kara, E., Strange, P. G. & Byrne, B. Radioligand binding analysis as a tool for quality control of GPCR production for structural characterization: Adenosine A2AR as a template for study. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 29.3.1-29.3.22 (2012).
376. Hauer, F., Gerle, C., Fischer, N., Oshima, A., Shinzawa-Itoh, K., Shimada, S., Yokoyama, K., Fujiyoshi, Y. & Stark, H. GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Structure* **23**, 1769–1775 (2015).
377. Rosenthal, P. B. & Henderson, R. Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **333**, 721–745 (2003).
378. Hartmann, L. Développement et caractérisation d'outils immunologiques dirigés contre des récepteurs membranaires d'intérêt thérapeutique. (Université de Strasbourg, 2019).
379. Puetz, J. & Wurm, F. M. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes* **7**, (2019).
380. Charuk, J. H. M., Pirraglia, C. A. & Reithmeier, R. A. F. Interaction of Ruthenium Red with Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins. *Anal. Biochem.* **188**, 123–131 (1990).
381. Higgins, A. J., Flynn, A. J., Marconnet, A., Musgrove, L. J., Postis, V. L. G., Lippiat, J. D., Chung, C. wa, Ceska, T., Zoonens, M., Sobott, F. & Muench, S. P. Cycloalkane-modified amphiphilic polymers provide direct extraction of membrane proteins for CryoEM analysis. *Commun. Biol.* **4**, 1–9 (2021).
382. Dutta, D., Esmaili, M., Overduin, M. & Fliegel, L. Expression and detergent free purification and reconstitution of the plant plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 overexpressed in *Pichia pastoris*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, (2020).
383. Grillitsch, K., Tarazona, P., Klug, L., Wriessnegger, T., Zellnig, G., Leitner, E., Feussner, I. & Daum, G. Isolation and characterization of the plasma membrane from the yeast *Pichia pastoris*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 1889–1897 (2014).
384. Jafurulla, M., Aditya Kumar, G., Rao, B. D. & Chattopadhyay, A. A critical analysis of molecular mechanisms underlying membrane cholesterol sensitivity of GPCRs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1115 (2019).
385. Liu, W., Chun, E., Thompson, A. A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G. W., Roth, C. B., Heitman, L. H., Ijzerman, A. P., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structural Basis for Allosteric Regulation of GPCRs by Sodium Ions. *Science* (80- ). **337**, 232–236 (2012).
386. Huang, S. K., Almurad, O., Pejana, R. J., Morrison, Z. A., Pandey, A., Picard, L.-P., Nitz, M., Sljoka, A. & Prosser, R. S. Allosteric modulation of the adenosine A2A receptor by cholesterol. *bioRxiv* (2021).
387. McGraw, C., Yang, L., Levental, I., Lyman, E. & Robinson, A. S. Membrane cholesterol depletion reduces downstream signaling activity of the adenosine A2A receptor. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1861**, 760–767 (2019).
388. Hirz, M., Richter, G., Leitner, E., Wriessnegger, T. & Pichler, H. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase  $\alpha 3\beta 1$  isoform. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9465–9478 (2013).
389. Boonen, A., Singh, A. K., Hout, A. Van, Das, K., Loy, T. Van, Noppen, S. & Schols, D. Development of a Novel SPR Assay to Study CXCR4-Ligand Interactions. *Biosensors* **10**, (2020).





# Évaluation de polymères amphiphiles pour l'extraction, la purification et la caractérisation de protéines membranaires d'intérêt thérapeutique

## Résumé

Au cours deux dernières décennies, des approches alternatives à l'utilisation de détergents ont été développées pour l'étude des protéines membranaires en solution, dans le but de reproduire un environnement lipidique plus stable et plus proche des membranes biologiques. Récemment, de nouveaux polymères amphiphiles ont ainsi été décrits avec la capacité de déstabiliser les membranes biologiques et de générer des nanoparticules lipidiques contenant les protéines d'intérêt. Si cette approche semble particulièrement prometteuse, peu de données sont disponibles quant à l'obtention et à l'étude de telles particules contenant des protéines membranaires eucaryotes produites dans des systèmes d'expression eucaryotes, et en particulier dans la levure *Pichia pastoris*.

L'objet de cette étude est d'évaluer l'efficacité de ce type de polymères pour l'extraction et la purification de deux protéines modèles produites dans le système *P. pastoris*, à savoir le récepteur à l'adénosine A<sub>2</sub>A (AA<sub>2</sub>A) et le canal perméable au calcium Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4). En comparaison avec des approches basées sur les détergents, notre but est d'évaluer la performance de ces molécules dans le cadre d'études fonctionnelles et structurales de ces protéines membranaires en solution.

Mots clés : protéines membranaires eucaryotes, *Pichia pastoris*, polymères amphiphiles, solubilisation, purification, caractérisation moléculaire

## Abstract

Within the last two decades, alternative approaches to detergent have been developed for the study of membrane proteins in solution, with the goal to better mimic the natural lipidic environment of the membrane and to improve the stability of the protein. Recently, new amphipathic polymers have been described for their effective capacity to isolate membrane proteins of interest within nanolipidic particles. Although this approach seems particularly promising, few data are available regarding the generation and the study of such particles containing eukaryotic membrane proteins produced with eukaryotic expression systems, and in particular with the yeast *Pichia pastoris*.

The aim of this study is thus to evaluate the performance of such polymers for the extraction and purification of two model membrane proteins produced in the *P. pastoris* system, namely the adenosine A<sub>2</sub>A receptor (AA<sub>2</sub>A) and the calcium permeant channel Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4). In comparison with detergent-based approaches, we investigate the suitability of such molecules for the isolation and the functional and structural characterization of these two membrane proteins.

Key words: eukaryotic membrane protein, *Pichia pastoris*, amphipathic polymers, solubilization, purification, molecular characterization