

UNIVERSITE PARIS-SACLAY
Spécialité : Biologie Structurale, Biochimie et Signalisations Cellulaires

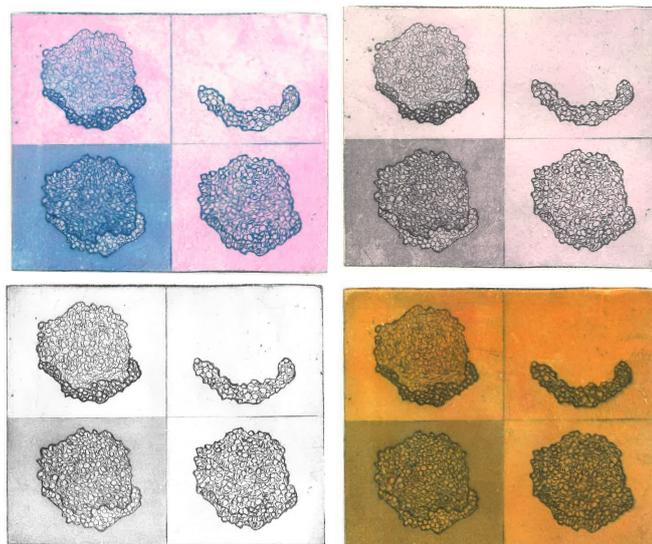
mémoire pour l'obtention de l'

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

présenté par

Sophie COMBET

Sonder la structure des protéines avec... des neutrons



soutenu le 27 février 2020 devant le jury composé de :

Mme	Nathalie	Colloc'h (rapporteur)
Mme	Dominique	Durand
M.	Valentin	Gordeliy (rapporteur)
Mme	Maité	Paternostre
Mme	Véronique	Receveur-Bréchet (rapporteur)

Biologie : du grec *βίος*, la vie, et *λόγος*, le discours.

Sommaire

Préambule	5
1 Introduction générale	9
1.1 L'étude structurale des protéines	10
1.2 La diffusion aux petits angles	10
1.3 La réflectivité de neutrons	11
1.4 La méthode de variation de contraste	12
1.5 Le SANS en biologie	12
2 Structure de protéines en interaction avec un partenaire	15
2.1 Introduction	16
2.2 Structure d'une protéine au sein d'un assemblage	16
Le complexe hémoglobine/PEG	16
2.3 Etudes structurales de protéines en interaction avec des lipides	20
2.3.1 Structure de la dystrophine en interaction avec des lipides membranaires	20
2.3.1.1 Utilisation de bicelles deutérées « contrast matchées » en SANS	22
2.3.1.2 Structure de R1-3 en interaction avec des bicelles	24
2.3.1.3 Structure de l'assemblage R11-15/actine/lipides	25
2.3.2 Adsorption/insertion de protéines en interaction avec des lipides membranaires	27
2.3.2.1 Interaction R1-3/lipides	27
2.3.2.2 Interaction prion/lipides	28
2.4 Perspectives	30
2.4.1 Structure de complexes Ku/ADN/protéines	30
2.4.2 Interaction mTSPO/détergents	32
2.4.3 Interaction magainine-2/phospholipides	33
2.5 Résumé	35
3 Effet de l'environnement sur la structure de protéines	37
3.1 Introduction	38
3.2 Effet de l'encombrement cytoplasmique sur la structure de protéines	38
3.2.1 L'encombrement cytoplasmique	38
3.2.2 Effet de l'encombrement moléculaire sur la structure de la myoglobine	39
3.2.2.1 Effet sur la structure secondaire de Mb	39
3.2.2.2 Effet sur la structure tertiaire de Mb	40
3.3 Effet de la haute pression sur le dépliement de protéines	42
3.3.1 La haute pression : un outil pour étudier le dépliement des protéines	42
3.3.2 Développement d'un prototype de cellule haute pression pour le SANS	42
3.3.3 Effet de ligands sur la stabilité sous pression de la β -lactoglobuline	44
3.4 Perspectives	47
Assemblages de protéines végétales induits par la pression	48
3.5 Résumé	49
4 Conclusion générale	51

Références	53
Annexes	59
<i>Curriculum vitae</i>	60
Publications	61
Communications orales	64
Encadrements	66
Enseignements	68
Financements	69
Expertise et gestion de la recherche	70
Quelques publications	71

Préambule

Je ne vais pas parler du « discours de la vie », je n'en ai pas la prétention. Ce mot *biologie* a cependant résonné très tôt en moi et constitué le fil directeur de ma formation et de ma recherche, même si mon itinéraire semble parfois emprunter des chemins de traverse. C'est ainsi que je me suis souvent trouvée à l'interface entre la biologie et la physique. En particulier, depuis mon arrivée fin 2002 au Laboratoire Léon-Brillouin (LLB, UMR 12 CEA-CNRS), mes collègues sont en majorité des physiciens et des physico-chimistes et mes principaux outils de recherche sont issus de la physique (la diffusion de neutrons, notamment). Cependant, la finalité de mes recherches a toujours été de répondre à des questions de *biologie* et non de faire de la physique sur du matériel biologique.

Je me suis toujours intéressée aux protéines, les « briques de la vie » (voir Section 1.1), pour étudier différentes facettes de la relation « dynamique/structure/fonction » des protéines : leur fonction (mécanismes de régulation ou d'adressage de protéines membranaires), leur dynamique (en lien avec celle de l'eau d'hydratation) et, plus récemment, leur structure en solution.

Je présente dans ce mémoire un bilan de mes travaux en diffusion de neutrons appliquée à des études structurales de protéines, qui correspondent environ aux six dernières années de ma recherche propre. Avant d'aborder le vif du sujet, je vais retracer en quelques mots ce qui a pu m'amener à utiliser des neutrons pour sonder la structure de protéines.

Des vieux rats aux neutrons. J'ai fait mes premiers pas dans la recherche et appris quelques rudiments de biochimie durant un stage de deux mois réalisé pendant mon cursus d'ingénieur en 1996 auprès de Nicolas Morel, au Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire du CNRS à Gif-sur-Yvette. J'ai ensuite découvert la biologie structurale et la biophysique lors de mon stage de DEA et de fin d'études d'école d'ingénieurs, réalisé en 1997 dans le Service de Biologie Cellulaire (SBCe) du CEA de Saclay et encadré par Jean-Marc Verbavatz. Mon stage portait sur la détermination de la structure de canaux à eau des membranes biologiques, appelés « aquaporines » (AQPs), en microscopie électronique à transmission (TEM) sur des cristaux membranaires à deux dimensions.

J'ai poursuivi par ma thèse de doctorat effectuée au SBCe [2]¹, sous l'encadrement de Jean-Marc Verbavatz, et à la Faculté de Médecine de l'Université catholique de Louvain (UCL, Bruxelles, Belgique) [1], sous l'encadrement d'Olivier Devuyst, de 1998 à 2001. Durant ma thèse, j'ai mis en évidence, principalement par des méthodes de biochimie et de biologie cellulaire, le rôle des AQPs et de l'oxyde nitrique dans les mécanismes moléculaires des altérations du transport d'eau dans deux cas physiopathologiques : (i) la perte du transport d'eau à travers l'AQP1 présente dans les vaisseaux sanguins du péritoine², au cours de la dialyse péritonéale³ [3-8,10,33]; (ii) le rôle de l'AQP2 et de l'AQP3 dans la polyurie⁴ liée au vieillissement rénal, sur un modèle de « vieux rats » [9,11,13,32].

Peu de temps avant mon arrivée en post-doctorat à l'Institut Curie⁵, le LLB m'a proposé⁶

1. Les références en gras correspondent à celles de ma liste de publications page 61 dans l'Annexe.
2. Membrane qui recouvre la plupart des organes de l'abdomen.
3. Alternative à l'hémodialyse consistant à injecter une solution de dialyse dans l'abdomen du patient et à utiliser le péritoine comme membrane pour filtrer, par diffusion et osmose, le sang du patient.
4. Symptôme caractérisé par des urines abondantes.
5. J'y suis restée quatre mois avant d'être en congé maternité.
6. Un soir de décembre 2001, après une journée de ski dans une petite station haut-savoyarde, je trouvais un message téléphonique de Marie-Claire Bellissent-Funel, dans lequel j'entendis parler pour la première fois du LLB

de me présenter au concours du CNRS en tant que « biologiste » pour étudier la dynamique des protéines par diffusion incohérente de neutrons. J'ai été nommée Chargée de Recherche au CNRS fin 2002 et affectée au LLB, situé au CEA de Saclay et associé à Orphée, la source nationale de neutrons⁷. Mon projet avait pour objectif d'obtenir des données expérimentales sur la dynamique de l'AQP1 humaine, purifiée à partir de la membrane du globule rouge, et de l'eau transportée le long du canal pour les comparer à des données de dynamique moléculaire [1]. Après avoir mis en place au LLB des outils de biochimie, j'ai pu commencer à découvrir la « beauté » des neutrons, car je ne pouvais pas dire comme un personnage célèbre que « j'étais tombée dedans quand j'étais petite »...

La traversée du désert. J'avoue que cette « beauté » ne m'a pas sauté aux yeux tout de suite. J'ai dû d'abord réaliser que les expériences de dynamique en neutrons nécessite plusieurs milligrammes d'échantillon (mission impossible pour l'AQP1, comme pour la majorité des protéines membranaires⁸!) et permet d'obtenir au mieux la dynamique *moyenne* des hydrogènes présents dans l'échantillon (re-mission impossible pour déterminer précisément la dynamique des molécules d'eau le long de l'aquaporine!). Je précise qu'au LLB les chercheurs ont des thématiques relativement individuelles voire isolées. J'ai donc réorienté ce projet pour étudier la dynamique de vésicules membranaires issues de globules rouges et contenant principalement des protéines intramembranaires très hydrophobes, telles que l'AQP1. Nos résultats [15] ont confirmé que la dynamique des protéines membranaires est influencée par celle de la membrane [2], alors que la dynamique des protéines solubles est liée à celle de la dynamique de l'eau d'hydratation [3].

J'ai ensuite changé de modèle d'étude pour la C-phycoyanine (CPC), une protéine soluble des antennes des cyanobactéries⁹. Avec des collègues du LLB, nous avons mis en évidence que le tréhalose, un sucre présent chez plusieurs êtres vivants, dont les tardigrades¹⁰, ralentit fortement les mouvements de la protéine, tout en conservant la géométrie de ces mouvements, en formant un état vitreux autour de la protéine [12].

La fonction de la CPC au sein des cyanobactéries est de collecter la lumière au cours de la photosynthèse. Pour la CPC isolée, l'énergie lumineuse capturée est réémise sous forme de fluorescence ou dissipée par des vibrations rapides et localisées des pigments de la protéine. Pour mesurer si cette dissipation d'énergie peut également induire des modifications de la dynamique interne de la CPC, nous avons illuminé *in situ* une solution de CPC au cours des mesures de diffusion quasi-élastique de neutrons. Le système d'acquisition du spectromètre à temps-de-vol a été modifié pour synchroniser les flashes d'un laser avec l'arrivée des neutrons au niveau de l'échantillon et obtenir des mesures relatives en « double faisceau » (CPC illuminée/CPC dans le noir) au cours du temps. Cette technique novatrice de mesures en « double faisceau » a permis de s'affranchir d'effets annexes comme la dénaturation protéique (photo-blanchiment). Nous avons observé une légère modification de la diffusion élastique de la CPC causée par la lumière [14,17].

Enfin, la CPC ayant le bon goût de pouvoir être deutérée relativement facilement, nous avons pu comparer sa dynamique avec celle de sa couche d'eau d'hydratation pour étudier l'influence des mouvements des molécules d'eau sur ceux de la protéine. Pour les protéines solubles, en plus de la « transition dynamique » à ~ 220 K, une autre transition est observée à ~ 150 K. L'attribution de cette transition à des sauts de torsion des groupes méthyles de la protéine [4] ou à la dynamique de l'eau d'hydratation [5] restait encore largement débattue. Pour trancher ce débat, nous avons mesuré séparément, par échange isotopique en remplaçant l'hydrogène (H) par le deutérium (^2H ou D)¹¹, soit la dynamique de la protéine (dans l'échantillon de CPC hydrogénée dans D_2O), soit la dynamique de l'eau d'hydratation (dans l'échantillon de CPC deutérée dans H_2O). La dynamique

et de diffusion de neutrons...

7. Orphée a délivré ses derniers neutrons le 29 octobre dernier, après environ 40 ans de bons et loyaux services.

8. Les protéines membranaires sont souvent mises de côté par les chercheurs car ce sont des protéines très difficiles à manipuler.

9. Bactéries capables de photosynthèse. Elles seraient l'origine de la présence du dioxygène dans l'atmosphère terrestre.

10. Petits animaux capables de supporter des conditions extrêmes : amplitude thermique gigantesque, vide ou très haute pression.

11. La diffusion incohérente des hydrogènes est plus intense, de près de deux ordres de grandeur, que celle du deutérium et des autres atomes présents dans les molécules biologiques.

rapide (< 20 ps) de la protéine et de l'eau d'hydratation coïncide avec une transition dynamique à ~ 220 K. A plus grande résolution (dynamique < 400 ps), deux types de mouvements peuvent être séparés : (i) les mouvements localisés de la CPC, qui coïncident avec les mouvements rotationnels de l'eau d'hydratation et qui montrent deux transitions, à ~ 170 et ~ 240 K ; (ii) les fluctuations de plus grande amplitude de la protéine et les mouvements diffusionnels/translationnels de l'eau interfaciale, avec une seule transition à ~ 240 K et une amplitude plus importante des mouvements de l'eau interfaciale en comparaison avec ceux de la protéine au-delà de 240 K. En mesurant également la dynamique de l'eau « bulk » (non associée à la protéine), nous avons pu conclure que l'eau d'hydratation est la principale force gouvernant les mouvements à la fois localisés et de plus grande amplitude de la protéine [18].

Cependant, malgré ces résultats, je restais peu convaincue par ce type d'études, qui à mon avis ne répondait pas assez directement à des questions pertinentes de *biologie*, ou du moins qui intéressaient suffisamment les biologistes.

Des projets qui font SANS. J'ai orienté progressivement ma recherche, à partir de 2014, vers la diffusion cohérente de neutrons aux petits angles¹², technique permettant de sonder la structure à des échelles « grandes », par rapport à la diffraction, et parfaitement adaptée aux tailles caractéristiques des macromolécules biologiques. Dans une géométrie de transmission, la diffusion de neutrons aux petits angles (en anglais, Small-Angle Neutron Scattering (SANS)) permet de déterminer la structure des objets en volume. En incidence rasante, la réflectivité spéculaire de neutrons (en anglais, Specular Neutron Reflectivity (SNR)) sonde le profil d'une interface plane dans la direction perpendiculaire à la surface. Ces techniques sont particulièrement intéressantes lorsqu'elles sont associées à la variation de contraste, méthode unique qui permet d'éteindre ou de révéler sélectivement le signal d'un composant d'un échantillon. La diffusion de neutrons, qui est peu utilisée par rapport aux autres techniques structurales en biologie, comme la cristallographie des rayons X, la résonance magnétique nucléaire ou la cryo-TEM, peut alors se révéler incontournable pour répondre à certaines problématiques.

Je me suis peu à peu formée à ces techniques de diffusion de neutrons et j'ai pu alors remplir la mission de service, propre aux grands instruments comme le LLB, en accueillant en tant que « local contact » des utilisateurs extérieurs pour des expériences de SANS ou pour des formations (travaux pratiques des FAN du LLB¹³, HERCULES¹⁴, etc.). Cependant, la diffusion de neutrons étant peu répandue au sein des laboratoires de biologie, il n'existait pas de « réseau » d'utilisateurs dans ce domaine, comme cela est le cas pour la matière molle par exemple, et j'ai donc souvent dû solliciter ces expériences en collaboration. Je suis devenue responsable en 2015 de PACE, un appareil de SANS du LLB.

Au menu de ce mémoire. J'introduirai d'abord le contexte scientifique de mes travaux en situant le SANS et le SNR dans le paysage de la biologie structurale des protéines (Chapitre 1). Etant donné que ces techniques sont relativement peu utilisées en biologie, je rappellerai les principes des deux techniques. En particulier, je parlerai de leur complémentarité par rapport aux techniques à plus haute résolution et de l'atout de la méthode de la variation de contraste. Je traiterai ensuite plus spécifiquement deux thématiques, pour lesquelles j'ai pu mettre en pratique la variation de contraste pour déterminer, en collaboration avec des biologistes, la structure de protéines dans des environnements complexes : (i) des assemblages biologiques composés de protéines en interaction avec un partenaire, en particulier des lipides membranaires (Chapitre 2) ; (ii) des protéines soumises à des environnements très concentrés ou sous pression (Chapitre 3). Les structures protéiques à basse résolution obtenues dans ces études ont permis de mieux comprendre la fonction de ces protéines, en vue d'applications possibles, dans le biomédical notamment.

12. Correspondant aux petits vecteurs de diffusion Q , voir Section 1.2.

13. Formation Annuelle à la Neutronique.

14. Higher European Research Courses for Users of Large Experimental Systems.

Chapitre 1

Introduction générale

Contenu

1.1	L'étude structurale des protéines	10
1.2	La diffusion aux petits angles	10
1.3	La réflectivité de neutrons	11
1.4	La méthode de variation de contraste	12
1.5	Le SANS en biologie	12

1.1 L'étude structurale des protéines

Les protéines sont essentielles au fonctionnement et à la construction des organismes vivants. Leurs fonctions sont variées : certaines jouent un rôle de soutien (cytosquelette, protection, etc.), d'autres interviennent dans les membranes (support, transport, etc.), d'autres encore, comme les enzymes, agissent comme catalyseurs des réactions chimiques du vivant.

La plupart des protéines adoptent des structures particulières. Elles peuvent être classées en quatre groupes principaux selon leurs caractéristiques structurales : (i) les protéines globulaires ; (ii) les protéines fibreuses qui possèdent une structure étendue ; (iii) les protéines membranaires ; et (iv) les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) qui, comme les régions intrinsèquement désordonnées de certaines protéines, ne suivent pas le dogme de la relation structure/fonction.

Les protéines sont composées d'un enchaînement d'acides aminés, appelé séquence ou structure primaire. La chaîne polypeptidique peut s'organiser localement en structures secondaires composées d'hélices α , de feuillets β , de boucles ou de coudes. Le positionnement de ces structures les unes par rapport aux autres dans l'espace définit la forme caractéristique tridimensionnelle, ou structure tertiaire, de la protéine. Au cours de ce repliement, des interactions entrent en jeu, telles que les interactions électrostatiques ou hydrophobes, ainsi que les liaisons hydrogène ou de van der Waals. Enfin, si la protéine contient plusieurs chaînes polypeptidiques, cette organisation est qualifiée de structure quaternaire.

Déterminer la structure des protéines est un sujet central en biologie puisque la fonction des protéines est, sauf pour les IDPs, intimement liée à leur structure. Le mauvais repliement des protéines est ainsi la source de nombreuses maladies [6], telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson (voir Section 3.1).

Les méthodes classiques de détermination de la structure tridimensionnelle à haute résolution des protéines sont la cristallographie par rayons X (XRC), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et, plus récemment, la microscopie électronique à transmission (TEM) et la cryo-TEM. Ces techniques ont cependant leurs limitations : la non-obtention de monocristaux qui diffractent en XRC, la trop grande taille de la protéine ou la présence de motifs de répétition en RMN et, pour la TEM et la cryo-TEM, le manque de statistique et de contraste, ainsi que la difficulté à préparer des échantillons (séchage, congélation). La diffusion des rayons X ou des neutrons aux petits angles (SAXS ou SANS) s'avère alors une alternative incontournable. De plus, la XRC et la microscopie ne permettent pas de réaliser des mesures dans l'environnement physiologique des protéines, c'est-à-dire en solution. Là aussi, le SAXS ou le SANS s'avèrent des techniques essentielles pour vérifier que les structures proposées sont correctes.

Classiquement, la XRC et la RMN, et de plus en plus la cryo-TEM, sont les techniques de référence pour obtenir des informations sur la structure 3D des protéines. Sur les 124000 structures protéiques environ que compte la base de données PDB (« Protein Data Bank »), 90% ont été résolues par XRC, 8.5% par RMN et moins de 1% par cryo-TEM. Les structures à basse résolution obtenues par diffusion aux petits angles sont regroupées dans une base de données dédiée (« Small-Angle Scattering Biological Data Bank », SASBDB), qui compte actuellement ~ 2000 modèles de structure.

1.2 La diffusion aux petits angles

Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes, contrairement aux rayons X (RX) qui interagissent avec le nuage électronique. Alors que la capacité d'un atome à diffuser les RX augmente avec son numéro atomique, celle d'un atome à diffuser les neutrons varie de manière aléatoire et dépend de l'isotope. L'interaction entre un neutron et le noyau d'un isotope est mesurée par la longueur de diffusion cohérente. Pour une molécule, la densité de longueur de diffusion cohérente (« Scattering Length Density » (SLD) en anglais) correspond à la somme des longueurs de diffusion cohérente des noyaux la composant divisée par son volume (Fig. 1.1).

Les intensités de diffusion aux petits angles (SAS) sont mesurées en fonction du vecteur de

diffusion \vec{Q} , dont la norme est définie par :

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$$

où λ est la longueur d'onde du rayonnement et 2θ l'angle de diffusion. En SAS, nous faisons l'hypothèse d'une diffusion élastique.

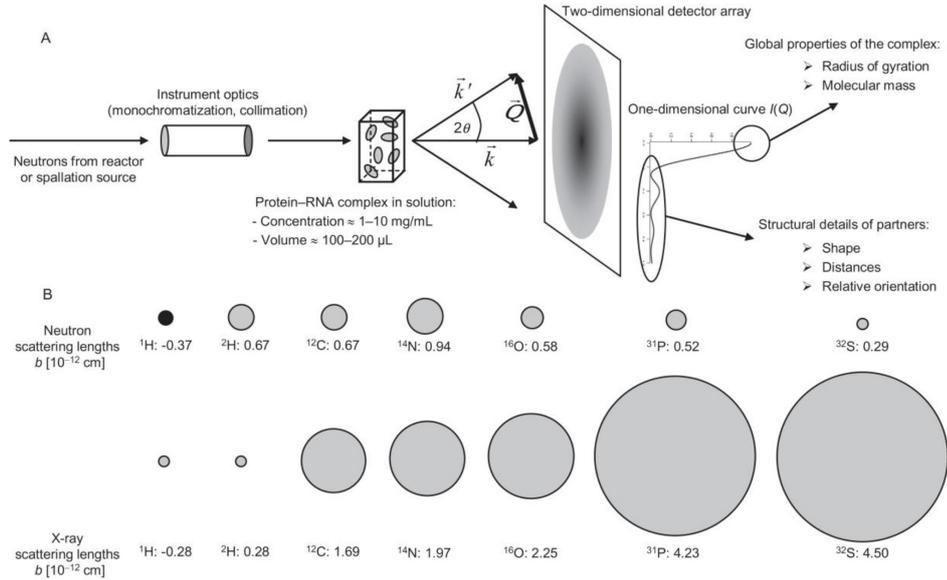


FIGURE 1.1 – (A) Représentation simplifiée d'une expérience de SANS ou de SAXS, où $\vec{Q} = \vec{k}' - \vec{k}$ avec \vec{Q} le vecteur de diffusion, \vec{k} le vecteur d'onde incident et \vec{k}' le vecteur d'onde diffusé. L'angle de diffusion est 2θ . (B) Comparaison des SLD de certains atomes pour le SANS et le SAXS. Les isotopes H et D ont des SLD très différentes en diffusion de neutrons. C'est cette propriété qui est exploitée dans les expériences de variation de contraste en biologie (d'après [7]).

Pour un système à deux composantes, en particulier dans le cas de diffuseurs sphériques relativement monodisperses (ce qui est généralement le cas des protéines) en suspension dans un solvant (généralement un tampon en biologie), l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion est définie par [8] :

$$I(Q) = (\Delta\rho)^2 NV^2 P(Q) S(Q)$$

où $\Delta\rho$ est le contraste (différence de SLD) entre le diffuseur et le solvant, N le nombre de diffuseurs par unité de volume, V le volume de chaque diffuseur, $P(Q)$ le facteur de forme et $S(Q)$ le facteur de structure.

Le facteur de forme donne accès à la taille et à la forme globale de macromolécules biologiques en solution et le facteur de structure à leurs interactions mutuelles (dans un système suffisamment dilué, $S(Q) = 1$). Des données moins précises fournissent des informations sur le rayon de gyration (R_g) et les interfaces. Ces données sont dérivées de corrélations dans l'espace de domaines de taille allant de 1 à 1000 Å. Les résultats obtenus présentent l'avantage de correspondre à des moyennes statistiques sur un très grand nombre d'objets diffusants puisque le volume d'un échantillon est généralement de l'ordre de quelques centaines de μ L. L'extrapolation à un angle nul de l'intensité diffusée ($I(0)$) fournit des informations sur la masse moléculaire ou la compressibilité osmotique.

1.3 La réflectivité de neutrons

La réflectivité de neutrons consiste à envoyer un faisceau de neutrons collimaté sur une surface avec un certain angle d'incidence et à mesurer la réflectivité de l'échantillon en fonction du vecteur

de diffusion \vec{Q}_z , dans la direction *normale* à la surface (Fig. 1.2, droite), et avec une norme égale à :

$$Q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$$

où λ est la longueur d'onde des neutrons et θ est l'angle d'incidence. La courbe de réflectivité obtenue permet de déterminer l'épaisseur et les SLD de chaque couche de l'échantillon. Il s'agit de réflectivité « spéculaire » (à la manière d'un miroir) par opposition à la technique de SANS à incidence rasante (« Grazing-Incidence » ou GI-SANS) qui permet d'obtenir des informations dans le plan.

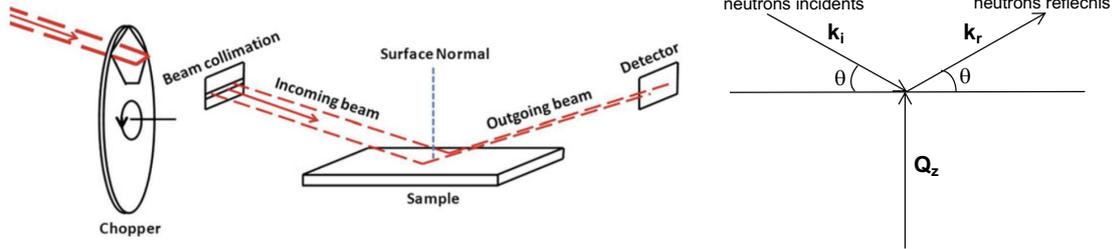


FIGURE 1.2 – *à gauche* Représentation simplifiée d'un instrument de réflectivité de neutrons montrant un faisceau de neutrons illuminant une surface et dont certains neutrons sont réfléchis par interaction avec les noyaux de l'échantillon (d'après [9]). *à droite* Schéma de réflectivité d'un faisceau incident de neutrons sur une surface plane idéale. \mathbf{k}_i et \mathbf{k}_r sont les vecteurs d'onde incident et réfléchi, respectivement, et $\mathbf{Q}_z = \mathbf{k}_r - \mathbf{k}_i$.

La réflectivité des RX procède du même principe mais, en biologie, la réflectivité de neutrons est bien plus souvent utilisée car le remplacement isotopique d'une partie l'échantillon permet d'obtenir un meilleur contraste et donc un signal plus intense.

1.4 La méthode de variation de contraste

Il y a une différence notable dans la capacité d'un neutron à être diffusé par un atome d'hydrogène (H) et par l'un de ses isotopes, le deutérium (^2H ou D)¹, dont la SLD est proche de la plupart des autres atomes présents dans les macromolécules biologiques (*e.g.* C, N, O). Cette différence entre H et D est particulièrement intéressante en biologie puisque l'hydrogène représente près de 50% des atomes de la plupart des macromolécules biologiques et est uniformément réparti. Grâce à cette différence, il est possible de faire de la « variation de contraste » pour masquer sélectivement le signal d'un composant au sein d'un assemblage biologique, par la deutération spécifique [10] et/ou par l'utilisation d'un mélange approprié $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ dans le solvant² [10]. La diffusion de neutrons aux petits angles et la réflectivité de neutrons sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude de la structure en solution de protéines en interaction avec un partenaire ou dans des environnements complexes, tels que les milieux très encombrés et les cellules de pression, que l'on pourra ainsi masquer.

1.5 Le SANS en biologie

Le SANS est une technique peu voire sous-utilisée en biologie, ce qui réduit son importance et son impact dans la communauté des biologistes. Cela est notamment dû aux difficultés d'accès puisque les faisceaux de neutrons ne sont produits que dans des réacteurs nucléaires ou des sources

1. Les longueurs de diffusion cohérente de H et D sont, respectivement, de -3.74 et +6.67 fm.

2. Pour un complexe formé de deux partenaires (1 et 2), le signal SANS peut être décrit par : $I(Q) = N[(\Delta\rho_1)^2 V_1^2 P_1(Q) + (\Delta\rho_2)^2 V_2^2 P_2(Q) + 2\Delta\rho_1 V_1 \Delta\rho_2 V_2 P_{1,2}(Q)]$, où le dernier terme correspond aux termes croisés du complexe [8]. Si le contraste du partenaire 2 avec le solvant est nul ($\Delta\rho_2 = 0$), alors le signal résultant correspond uniquement à la contribution du partenaire 1.

à spallation et ne sont donc pas accessibles en laboratoire, comme c'est le cas pour le SAXS de laboratoire, en complément du SAXS de synchrotron. Plus profondément, cette sous-utilisation est due également aux difficultés de communication entre physiciens et biologistes, puisque la diffusion de neutrons n'a été appliquée à des thématiques de biologie que relativement récemment [10]. Cependant, au cours des dernières années, le développement considérable des simulations informatiques a changé la situation et des groupes, associés aux synchrotrons DESY (Allemagne), ISIS (Grande-Bretagne) ou à Berkeley (USA), ont développé des logiciels facilement utilisables, comme ScÅtter³ et la suite ATSAS⁴ [11].

Un moyen d'obtenir des informations plus précises (que R_g) concernant la forme de l'échantillon consiste à ajuster les données SAS avec un modèle analytique, en d'autres termes déterminer le facteur de forme $P(Q)$. Il existe énormément de modèles, développés pour les objets physico-chimiques et accessibles directement avec des logiciels comme SasView⁵ ou SASfit⁶. Nous avons ainsi utilisé le modèle de cylindre flexible pour les fragments de dystrophine (Section 2.3.1, page 22) dans l'étude détaillée sur l'interaction dystrophine/lipides et les modèles de cylindre « core-shell » et de bicelle « core-shell » pour ajuster les données des bicelles (Section 2.3.1.1, page 23).

Par transformée de Fourier inverse, pour passer de l'espace réciproque à l'espace réel⁷, en utilisant par exemple le logiciel GNOM (ATSAS), on peut évaluer la fonction de distribution des distances du diffuseur, notée $P(r)$, selon l'équation :

$$I(Q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} P(r) \frac{\sin Q(r)}{Qr} dr$$

Cette fonction permet de déterminer la distance maximale (D_{\max}) au sein de la molécule diffusante, ainsi que R_g et $I(0)$ dans l'espace réel. Plusieurs logiciels sont alors disponibles, comme DAMMIN et GASBOR (ATSAS), pour obtenir des enveloppes à basse résolution de la protéine d'intérêt. Elles sont basées sur la génération de modèles *ab initio* par recuit simulé.

Une application majeure du SAS consiste en la comparaison de la structure cristalline obtenue par XRC à celle obtenue en solution. Ceci permet de vérifier si les conditions de cristallisation ne sont pas artéfactuelles et n'ont pas donné lieu à des changements de conformation ou d'état oligomérique de la protéine. La combinaison avec les données SAS permet également d'obtenir des informations sur la position de résidus manquants des données XRC. Le SAS peut également être combinée avec la RMN [12], la cryo-TEM et la modélisation moléculaire (voir Section 2.3.1). Les logiciels CRY SOL et CRYSON (ATSAS) permettent la génération de courbes de diffusion théorique à partir de modèles tout-atome pour les données SAXS et SANS, respectivement.

Pour l'acquisition de données SAS, un contrôle drastique des échantillons doit être réalisé en amont pour vérifier la qualité de l'échantillon, notamment l'absence d'agrégats, et éviter toute interprétation biaisée des données [13]. Pour s'assurer de la monodispersité de l'échantillon, certaines lignes SAXS sont équipées d'un système HPLC avec une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en amont, comme la ligne SWING à SOLEIL [14]. L'utilisation d'un tel système nécessite un fort flux de RX, ce qui est possible avec un rayonnement synchrotron. A l'ILL, grâce à un flux de neutrons relativement important, des mesures de SEC-SANS sont désormais possibles [15]. En aval, il est nécessaire aussi de vérifier que le faisceau de RX (en synchrotron) n'endommage pas l'échantillon. Ce n'est pas le cas des neutrons, dont le flux est beaucoup plus faible que celui des RX.

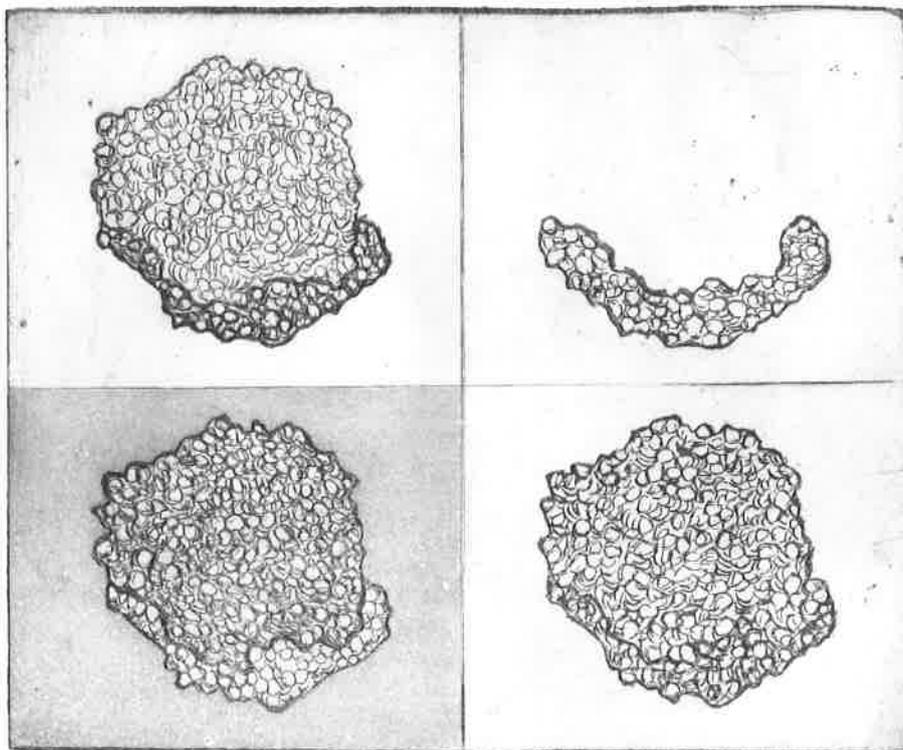
3. <http://www.bioisis.net/tutorial/9>

4. <https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>

5. <http://www.sasview.org/>

6. <https://sourceforge.net/projects/sasfit/>

7. Ce que préfèrent généralement les biologistes!



Variation de contraste sur un assemblage bicelle/protéine, vue en gravure à l'eau-forte.

Chapitre 2

Structure de protéines en interaction avec un partenaire

Contenu

2.1	Introduction	16
2.2	Structure d'une protéine au sein d'un assemblage	16
	Le complexe hémoglobine/PEG	16
2.3	Etudes structurales de protéines en interaction avec des lipides . .	20
2.3.1	Structure de la dystrophine en interaction avec des lipides membranaires	20
2.3.2	Adsorption/insertion de protéines en interaction avec des lipides membranaires	27
2.4	Perspectives	30
2.4.1	Structure de complexes Ku/ADN/protéines	30
2.4.2	Interaction mTSP0/détergents	32
2.4.3	Interaction magainine-2/phospholipides	33
2.5	Résumé	35

2.1 Introduction

Dans la cellule, les protéines ne sont généralement pas seules en solution mais interagissent avec des macromolécules biologiques (autres protéines, lipides, acides nucléiques, etc.) pour former des assemblages. Ces interactions peuvent être d'ordre électrostatique, hydrophobe ou d'ordre intermédiaire (liaisons hydrogène, forces de van der Waals). Je ne présente pas ici de données sur ces interactions elles-mêmes mais sur la structure en solution des assemblages obtenus. Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, l'utilisation de la variation de contraste en diffusion de neutrons permet de sonder spécifiquement la structure de la protéine d'intérêt au sein d'un assemblage, en masquant la contribution d'une partie de l'échantillon.

2.2 Structure d'une protéine au sein d'un assemblage

Dans le cadre de mon activité d'accueil sur des appareils de SANS, j'ai participé à des études de structure de protéines en interaction avec divers composants. A titre d'exemple, je cite une étude de copolymères amphiphiles formant des micelles chimériques avec un peptide pour des études d'internalisation cellulaire [20] et la dynamique structurale d'une capsid virale, la variation de contraste permettant de masquer le génome pour mesurer les protéines de la capsid [25,26]. Des mesures de SAXS et de SANS ont pu se compléter pour déterminer par exemple la structure en solution de protéines membranaires photo-excitable [23] ou de complexes formés par une protéine adsorbée sur des nanoparticules d'or [22].

Je présente ci-dessous brièvement une étude par SANS de la structure d'un complexe protéine/polymère [21], qui m'a permis à l'époque de me familiariser avec ce type d'études. Je détaille ensuite un cas représentatif de l'apport du SANS pour déterminer la structure d'une protéine en interaction avec un partenaire, en l'occurrence des lipides (voir Section 2.3.1).

Le complexe hémoglobine/PEG

Dans le cadre de la thèse de Clémence Le Coeur (dir. Stéphane Longeville, LLB), nous avons caractérisé par SANS la structure des complexes formés entre l'hémoglobine (Hb) et le PEG, le polyéthylène glycol, un polymère biocompatible. Ces complexes sont particulièrement intéressants pour des applications médicales car ils pourraient être utilisés comme substituts sanguins : l'utilisation de l'hémoglobine seule provoque en effet des problèmes d'hypertension et de toxicité rénale.

Nous avons purifié l'hémoglobine à partir de sang humain et produit des conjugués Hb/PEG par greffage de deux chaînes de polymère au niveau des deux cystéines accessibles de la protéine [16]. Par variation de contraste, dans un tampon en 100% D₂O, nous avons montré, en masquant le signal SANS du PEG deutéré, que la structure de la protéine n'est pas affectée par le greffage du polymère. Nous avons alors déterminé la structure des chaînes de polymère en masquant le signal SANS de la protéine dans un tampon en 39% D₂O (Fig. 2.1).

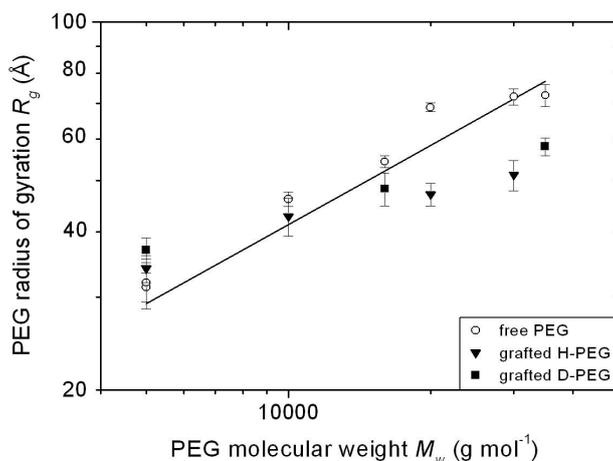


FIGURE 2.1 – Evolution du rayon de gyration (R_g) des PEG libres en solution ou greffés à Hb. Le R_g des H et D-PEG libres (cercles vides) et des H et D-PEG greffés (triangles et carrés pleins, respectivement) en 39% D_2O (pour effacer le contraste de la protéine), est représenté comme une fonction de la racine carrée du poids moléculaire (M_w) du polymère. La ligne continue représente l'évolution théorique du rayon de gyration du PEG (H- ou D-PEG) libre dans l'eau (respectivement en 100% D_2O ou H_2O) : en effet, R_g étant proportionnel à $N^{1/2}$ pour une chaîne gaussienne dans un solvant de type θ , avec N le nombre de monomères, R_g est proportionnel à $M_w^{1/2}$.

Pour les PEG de petit poids moléculaire, la structure globale du complexe Hb/PEG peut être décrite par un modèle en « haltère » : les deux chaînes de PEG greffées adoptent un comportement gaussien à la fois localement et globalement (Fig. 2.2, <10 kDa). Les PEG d'un poids moléculaire supérieur à 10 kDa sont plus compactés par rapport aux chaînes libres en solution et suivent aussi un modèle en « haltère » (Fig. 2.2, ~ 10 kDa). Le caractère gaussien des chaînes est maintenu localement. Une autre représentation peut cependant être proposée, dans laquelle les chaînes greffées s'enveloppent à la surface de la protéine (Fig. 2.2, ~ 10 kDa). Pour un PEG de très haut poids moléculaire (30-35 kDa), une seule chaîne peut être greffée sur la protéine, celle-ci empêchant l'accès au second site de greffage (Fig. 2.2, $>>10$ kDa).

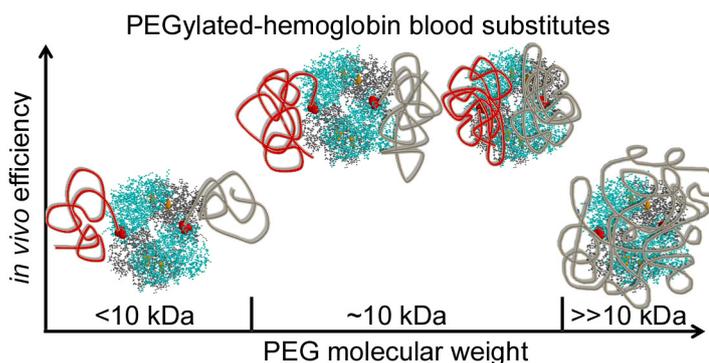


FIGURE 2.2 – Représentation des modèles proposés pour les conjugués Hb/PEG à partir des mesures de SANS. Le tétramère de l'hémoglobine est représenté avec les sous-unités α et β en gris et bleu, respectivement. Les chaînes de PEG sont représentées en rouge et gris, avec une longueur proportionnelle à leur poids moléculaire, et sont greffées sur les cystéines accessibles (points rouges) de la protéine.

Ces résultats ont mis en évidence deux structures différentes du polymère greffé sur l'hémoglobine en fonction de la taille du PEG et sont corrélés aux données physiologiques de la littérature, qui suggeraient comme seuil maximal d'efficacité une utilisation de chaînes de polymère inférieures

à 10 kDa [16] (Fig. 2.2).

Publications dans la thématique :

- [16] Cousin F *et al.* *Advances in Colloid and Interface Science* 167 : 71-84, 2011.
- [20] Drappier C *et al.* *Faraday Disc* 166, 83-100, 2013.
- [22] Spinozzi F *et al.* *Langmuir* 33 : 2248-2256, 2017.
- [23] Golub M *et al.* *Biochim Biophys Acta* 1858 : 318-324, 2017.
- [25] Chen J *et al.* *J Phys Condens Matter* 29 : 474001, 2017.
- [26] Chevreuil M *et al.* *Nature Comm* 9 : 3071, 2018.

Publication pour le projet « Hb/PEG » :

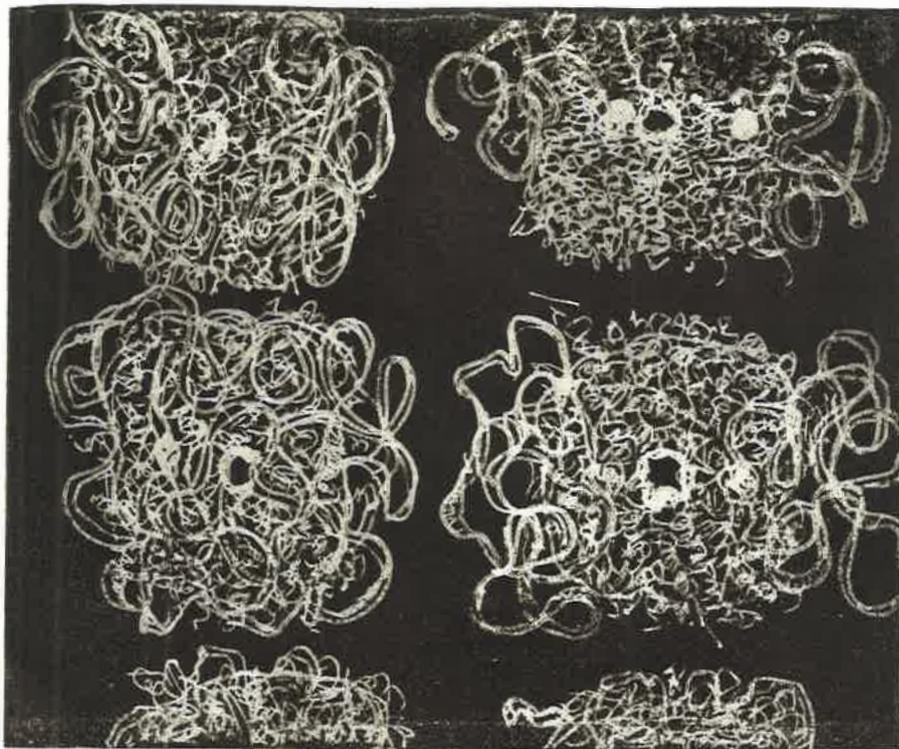
- [21] Le Coeur C *et al.* *Langmuir* 31 : 8402-8410, 2015.

Communication orale¹ :

- [16] *Conformation of the polyethylene glycol chains in diPEGylated hemoglobin specifically probed by SANS : correlation with PEG length and in vivo efficiency.* 23^{èmes} Journées de la Diffusion Neutronique, Evian-les-Bains, 7 octobre 2015.

Collaboration pour le projet « Hb/PEG » : Stéphane Longeville et Géraldine Carrot (LLB).

1. Les références en gras correspondent à celles des communications orales que j'ai données et qui sont listées page 64 dans l'Annexe.



Une représentation à l'aquatinte des complexes Hb/PEG.

2.3 Etudes structurales de protéines en interaction avec des lipides

Environ 26% du protéome humain a été prédit comme étant composé de protéines membranaires, ce qui correspond à ~ 5000 protéines membranaires qui jouent des rôles majeurs dans tous les organismes. Cependant, tout organisme confondu, seulement ~ 700 structures 3D de protéines membranaires sont disponibles à ce jour dans la base PDB. Ceci met en évidence la difficulté à manipuler les protéines membranaires du point de vue de leur solubilisation et/ou de leur purification pour obtenir des données structurales. En effet, pour déterminer leurs structures, les protéines membranaires intégrales doivent être extraites des membranes et maintenues dans un état monodisperse, stable et fonctionnel dans un environnement membrano-mimétique, tel que les micelles de détergent (voir Section 2.4.2) [17].

2.3.1 Structure de la dystrophine en interaction avec des lipides membranaires

Ce projet s'inscrit dans le travail de thèse (2014-2017) de Raphael Dos Santos Morais, que j'ai co-encadré avec Jean-François Hubert de l'IGDR (UMR CNRS 6290) à Rennes, laboratoire qui a une expertise reconnue sur la dystrophine. Nous avons collaboré avec Olivier Delalande, du même laboratoire, pour les simulations de dynamique moléculaire.

La dystrophine, codée par le plus grand gène humain, est une protéine essentielle du muscle squelettique. Elle lui confère des propriétés de résistance au stress au cours du processus de contraction/élongation grâce aux interactions qu'elle réalise avec le cytosquelette et les lipides de la membrane musculaire (Fig. 2.3).

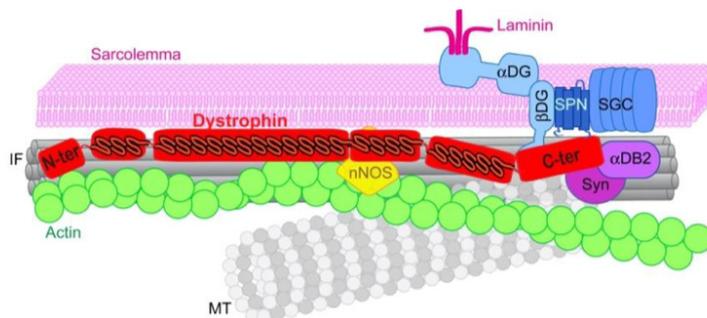


FIGURE 2.3 – Schéma de la dystrophine (en rouge) au sein de la cellule musculaire, en interaction avec les protéines du cytosquelette, dont l'actine (en vert), et les lipides (en rose) de la membrane musculaire (sarcolemme). IF : filament intermédiaire ; MT : microtubule ; nNOS : NO synthase neuronale.

Cette fonction est indispensable à la survie du muscle : son absence due à des mutations du gène conduit à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), maladie très invalidante et actuellement incurable. La dystrophie musculaire de Becker (BMD), moins sévère, est associée à des mutations du gène qui permettent l'expression de formes raccourcies de la dystrophine (appelées mini-dystrophines). Notre objectif était d'étudier la structure des parties de la protéine capables d'interagir avec des lipides afin de pouvoir proposer des mini-dystrophines fonctionnelles dans le cadre de la thérapie génique de patients DMD.

La dystrophine est une protéine membranaire de grande taille (427 kDa), monomérique, amphipathique (donc soluble contrairement aux protéines membranaires intégrales) et fibreuse. La majeure partie de la protéine consiste en un domaine central constitué de 24 répétitions (notées de R1 à R24) repliées en surenroulements, ou « coiled coils », du même type que la protéine spectrine (Fig. 2.4).

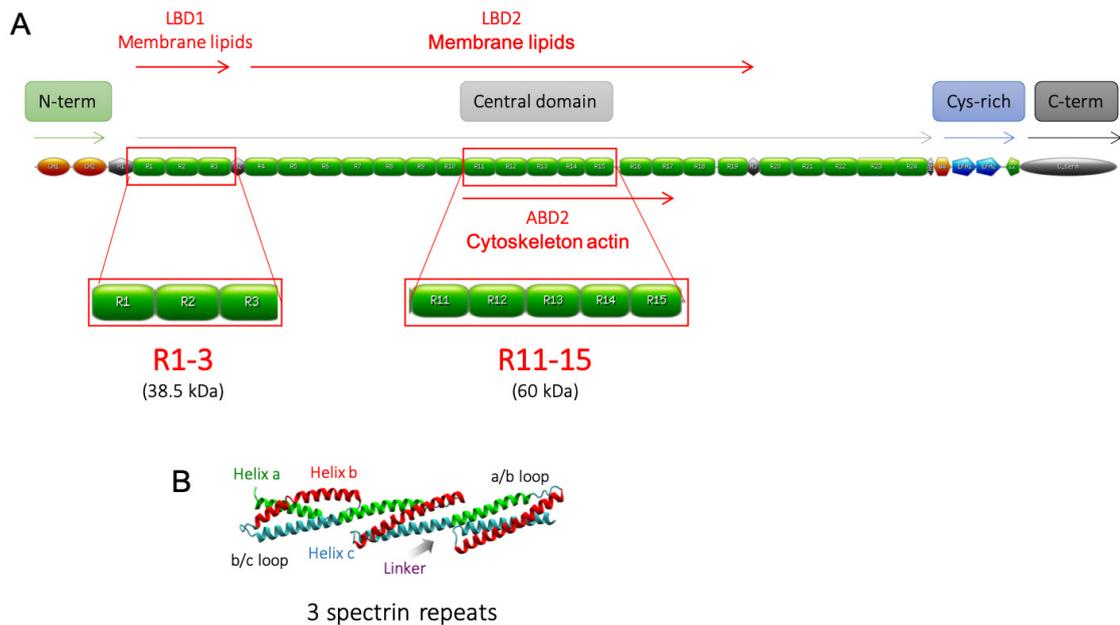


FIGURE 2.4 – (A) Représentation schématique du domaine central (vert) de la dystrophine, composé de 24 répétitions de type spectrine (R1-R24). Les fragments R1-3 et R11-15, encadrés en rouge, peuvent interagir avec les phospholipides membranaires, par le domaine LBD (« Lipid Binding Domain »). R11-15 peut également interagir avec l’actine, par le domaine ABD (« Actin Binding Domain »). (B) La structure 3D de trois répétitions de spectrine repliées en « coiled coils » montrant l’organisation du domaine central de la dystrophine. Le « linker » est la jonction entre l’hélice C d’une répétition et l’hélice A de la répétition suivante.

L’analyse structurale du domaine central de la dystrophine n’est pas accessible par les méthodes classiques à haute résolution (XRC ou RMN) à cause de sa trop grande taille, de sa flexibilité et de la répétition de ses motifs. Sa structure tridimensionnelle à basse résolution a été partiellement élucidée par l’équipe de Rennes grâce à l’utilisation combinée de SAXS et de modélisation moléculaire (Fig. 2.5) [18].

Par leurs interactions spécifiques avec les lipides du sarcolemme, R1-3 et R11-15 peuvent être considérés comme deux sous-domaines fonctionnels du domaine central de la dystrophine [19, 20], comme cela a été confirmé récemment *in vivo* [21]. R1-3 est également retrouvé dans de nombreuses mini-dystrophines chez les patients BMD [22]. L’objectif de ce projet était donc de comparer la structure de R1-3 et R11-15 seules en solution (Fig. 2.5) à celles adoptées en présence de phospholipides.

Pour le mener à bien, nous avons utilisé la méthode structurale alternative du SANS pour étudier spécifiquement par variation de contraste la structure de ces fragments de dystrophine en présence de phospholipides dont le contraste est effacé. Les expériences ont été réalisées sur les spectromètres SANS du LLB, KWS1 (MLZ, Allemagne) et D22 (ILL, Grenoble).

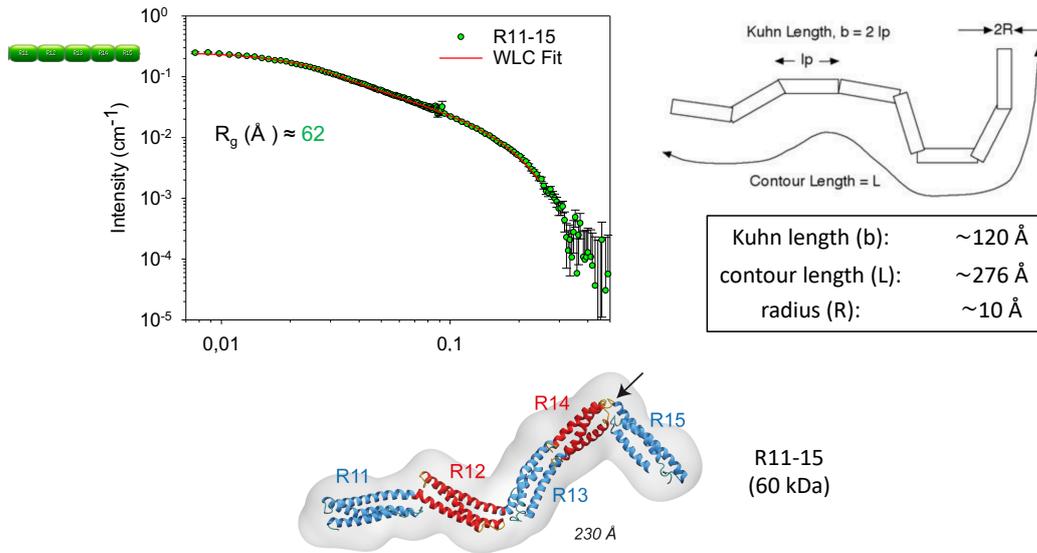


FIGURE 2.5 – *en haut, à gauche* Intensité SANS obtenue pour le fragment R11-15 du domaine central de la dystrophine. Les données expérimentales peuvent être ajustées (courbe rouge) par le modèle analytique « worm like chain » (WLC) (*en haut, à droite*). *en bas* Le modèle atomique de la protéine a été obtenu par l'équipe de l'IGDR (Rennes) après optimisation de l'ajustement d'un modèle gros grains, construit par homologie, à l'enveloppe à faible résolution obtenue à partir d'une courbe expérimentale SAXS ou SANS [18].

2.3.1.1 Utilisation de bicelles deutérées « contrast matchées » en SANS

Des travaux avaient montré que les propriétés interfaciales de la dystrophine dépendent du domaine protéique impliqué, de la nature des lipides et de la courbure de la membrane [23]. Pour mieux comprendre le rôle physiologique de l'interaction dystrophine/sarcolemme, il était nécessaire de déterminer la structure et les modes d'interaction de la dystrophine avec la membrane. Nous avons utilisé des bicelles de phospholipides comme modèle membranaire biomimétique. Nous ne pouvons pas utiliser des nanodisques [24] car la dystrophine aurait pu interagir avec la protéine ou le polymère servant à leur fabrication. Nous avons utilisé deux mélanges de lipides, zwitterioniques (DMPC/DHPC, 1:1) ou anioniques (DMPC/DMPS/DHPC, 0.67:0.33:1), pour moduler les interactions électrostatiques.

Les bicelles sont des auto-assemblages constitués d'un mélange de phospholipides à chaînes longues et de phospholipides à chaînes courtes ou de détergents. Ces mélanges lipidiques peuvent adopter différentes morphologies selon plusieurs paramètres, dont la température et le ratio molaire q des constituants à chaînes longues et à chaînes courtes ($q = \frac{[\text{chaînes longues}]}{[\text{chaînes courtes}]}$).

Les bicelles que nous avons utilisées ($q_{\text{effectif}} = 1,3$ avec $q_{\text{effectif}} = \frac{[\text{DMPC}]}{[\text{DHPC}]_{\text{total}} - [\text{DHPC}]_{\text{libre}}}$ pour tenir compte de la concentration de DHPC libre en solution), adoptent la morphologie la plus courante pour un système bicellaire, à savoir un disque, où les phospholipides à chaînes longues forment une bicouche entourée par des phospholipides à chaînes courtes ou par des détergents formant un tore (Fig. 2.6).

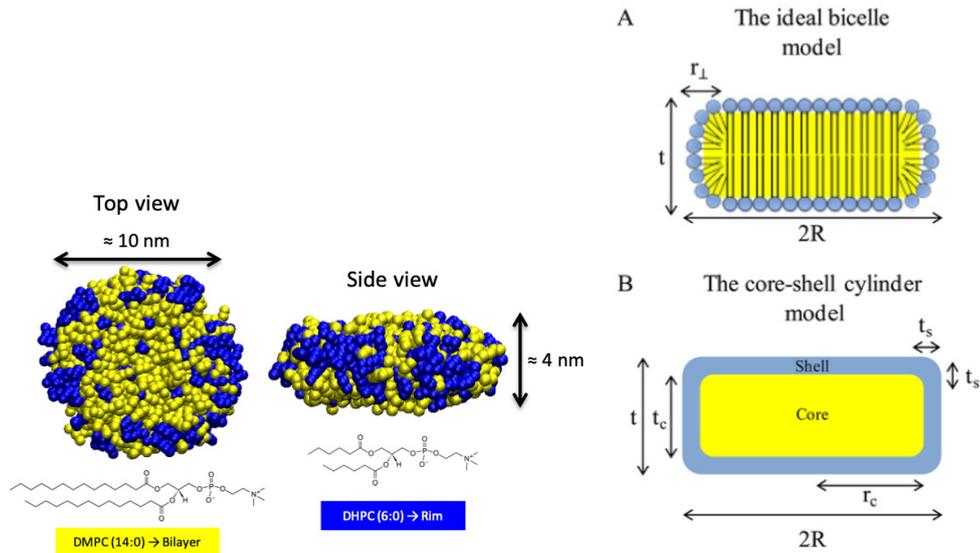


FIGURE 2.6 – *à gauche* Représentation des bicelles, composées du mélange DMPC/DHPC, que nous avons utilisées pour notre étude, obtenues par modélisation gros grains. *à droite (A)* Représentation schématique du modèle idéal de bicelle : R est le rayon de la bicelle, r_{\perp} l'épaisseur du bord (*i.e.* l'épaisseur d'une molécule de DHPC) et t l'épaisseur de la bicouche de DMPC. *(B)* Représentation schématique du modèle analytique de cylindre « core-shell », où t_c est l'épaisseur du noyau (« core »), r_c le rayon du noyau et t_s l'épaisseur de la coque (« shell »).

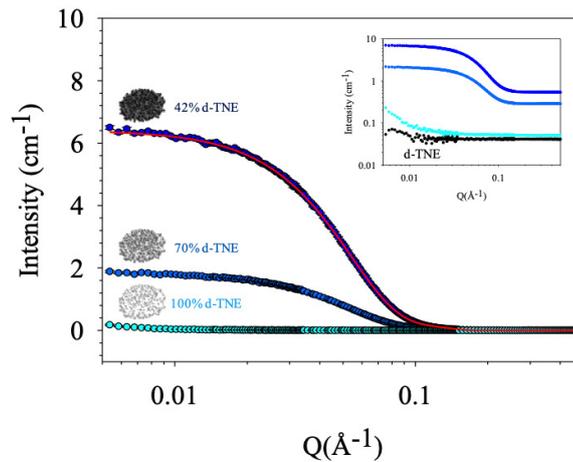


FIGURE 2.7 – Intensités SANS mesurées pour des bicelles deutérées (d-bicelles) dans 42% (bleu foncé), 70% (bleu clair) ou 100% (cyan) de tampon TNE (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) deutéré (d-TNE, noir), pD 7,5, à 20°C. Le signal des d-bicelles dans 42% d-TNE a été ajusté avec le modèle de cylindre « core-shell » (ligne rouge), donnant respectivement 40 et 42 Å pour l'épaisseur t et le rayon R . Le signal SANS incohérent a été soustrait. **Encart** : les mêmes données, mais sans la soustraction de l'intensité incohérente et représentées avec une échelle log/log, pour souligner le faible signal résiduel des d-bicelles aux très faibles valeurs de Q , comparé au signal du tampon d-TNE (noir).

Nous avons montré par SANS que ces bicelles ont bien les dimensions attendues (~ 40 Å d'épaisseur et ~ 100 Å de diamètre) et que des bicelles constituées de lipides deutérés (disponibles commercialement avec seulement quelques hydrogènes résiduels au niveau du glycérol des lipides) peuvent être masquées en SANS dans un tampon en 100% D_2O (Fig. 2.7) [24].

Nous avons également montré que les bicelles peuvent être utilisées pour des mesures de SEC-SANS, de SEC-MALS et de thermophorèse (« Microscale Thermophoresis », MST) [24][27].

2.3.1.2 Structure de R1-3 en interaction avec des bicelles

Le « contrast matching » des bicelles deutérées nous a permis de sonder spécifiquement le signal de fragments de la dystrophine en interaction avec des bicelles. Les résultats soulignent que, lorsque R1-3 est liée aux bicelles zwitterioniques, aucune modification conformationnelle importante du fragment de dystrophine n'est détectée. Au contraire, lorsque R1-3 est lié à des bicelles anioniques, les données SANS montrent des modifications significatives de sa structure 3D, comme le révèle une augmentation importante du rayon de giration de la protéine, qui passe de 42 ± 1 à 62 ± 4 Å (Fig. 2.8) [27].

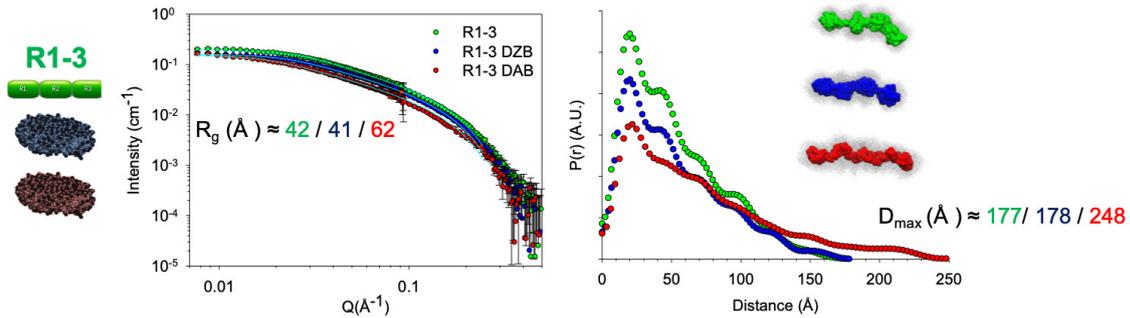


FIGURE 2.8 – **à gauche** Intensités SANS mesurées en tampon d-TNE, pD 7,5, et les rayons de giration R_g correspondant, pour R1-3 seule en solution (vert) ou en interaction avec des bicelles deutérées « contrast matchées » zwitterioniques (DZB, bleu) ou anioniques (DAB, rouge). Les modèles de R1-3 et des bicelles sont représentés schématiquement à gauche du graphe. **à droite** L'analyse de la fonction de distribution de paires $P(r)$, avec le même code couleur, montre une augmentation du D_{\max} de R1-3 lorsque le fragment de protéine est en interaction avec des bicelles anioniques. Les formes *ab initio* de R1-3 libres en solution (vert) ou en interaction avec DZB (bleu) ou DAB (rouge), correspondant aux modèles DAMMIF obtenus avec la plus petite divergence spatiale, sont représentées au-dessus des courbes et entourées par le modèle DAMAVER correspondant (gris clair).

Le complexe R1-3/bicelle anionique a été analysé par des simulations de dynamique moléculaire gros grains (CG-MD) et par la méthode innovante de CG-MD interactive (CG-IMD) [25]. Le fragment R1-3 a été localisé au niveau de la partie torique des bicelles, qui présente un défaut d'empilement (« packing ») des lipides DHPC (Fig. 2.9) et cette localisation a été confirmée par TEM et cryo-TEM. Ces données sont en bon accord avec la cartographie précise des interactions R1-3/lipides, obtenue par spectrométrie de masse en couplant chimie « click » et « cross linking ».

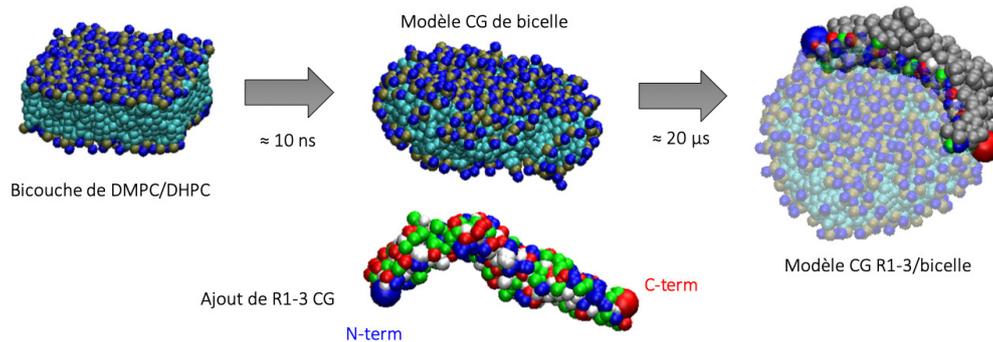


FIGURE 2.9 – Représentations issues de la dynamique moléculaire gros grains (CG-MD) de la formation d'une bicelle à partir d'une bicouche lipidique, constituée d'un mélange DMPC/DHPC ($q_{\text{eff}} = 1,3$), et du complexe R1-3/bicelle, après ajout du fragment de dystrophine. La protéine est localisée au niveau de la partie torique de la bicelle qui présente un défaut de « packing ».

Les modèles finaux proposés pour R1-3 lié aux lipides sont totalement en adéquation avec les données expérimentales de SANS (Fig. 2.10). Ces résultats montrent que les hélices de type « coiled coil » de la première répétition (R1) s’ouvrent spécifiquement lors de la liaison à des bicelles anioniques. Nous avons proposé qu’une telle ouverture pourrait se produire lors du processus de contraction/élongation du muscle pour assurer l’ancrage de dystrophine dans la membrane du sarcolemme. La compréhension de ces changements structurels est essentielle pour concevoir des mini-dystrophines efficaces pour le traitement par thérapie génique de patients DMD.

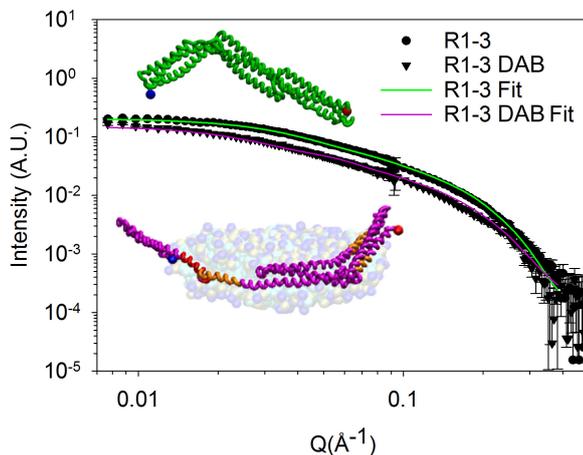


FIGURE 2.10 – Intensités expérimentales SANS (cercles et triangles pour R1-3 seul ou lié aux bicelles deutérées anioniques (DAB) « contrast matchées », respectivement) ajustées par les courbes CRYSON théoriques générées à partir du modèle de R1-3 seul en solution (vert) et au modèle de R1-3 lié aux bicelles anioniques (violet) obtenus par CG-MD interactive. Les modèles tout-atome correspondants sont représentés avec le même code couleur. Les points bleus et rouges représentent les extrémités N- et C-terminales, respectivement.

De manière plus générale, notre approche peut être utilisée pour la caractérisation des interactions protéine/lipide. Cette analyse, couplant pour la première fois des mesures de SANS avec des bicelles « contrast matchées », ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la détermination structurale de protéines membranaires périphériques, et même intégrales, incompatibles avec les méthodes structurales classiques.

2.3.1.3 Structure de l’assemblage R11-15/actine/lipides

Dans la continuité de ce projet, nous avons publié récemment une étude sur le fragment R11-15 du domaine central de la dystrophine, qui a la particularité d’interagir à la fois avec la membrane lipidique, comme R1-3, mais aussi, *via* son motif ABD2, avec l’actine-F² (Figs. 2.3 et 2.4, A), une protéine du cytosquelette qui joue également un rôle essentiel dans le maintien et la rigidité de la membrane musculaire [23].

Comme dans le projet précédent, en combinant des mesures de SANS, de spectrométrie de masse et des simulations CG-IMD, nous avons caractérisé les propriétés structurales des complexes ABD2-actine et ABD2-membrane [30]. Les fonctions de distribution de paires $P(r)$ montrent une légère augmentation du D_{\max} de R11-15 lorsque le fragment de protéine est en interaction avec des bicelles anioniques, alors qu’il n’y a pas de changement significatif dans le cas des bicelles zwitterioniques.

Deux sous-domaines interagissant avec l’actine-F ont été identifiés : l’un situé au niveau des répétitions R11-R12 et l’autre au niveau de R15, tandis que seul le fragment R12 a été identifié comme domaine de liaison aux lipides. Les simulations de « docking » (amarrage moléculaire) compatibles avec les données de spectrométrie de masse ont permis d’obtenir les orientations relatives

2. L’actine-F est un microfilament polymérisé d’actine globulaire (actine-G).

du domaine central de la dystrophine avec l'actine-F et un modèle de membrane (Fig. 2.11). Ces résultats sont compatibles avec un complexe ternaire actine-F/dystrophine/lipides membranaires et ouvrent la voie à une meilleure compréhension de la façon dont la dystrophine joue le rôle de charpente de la membrane musculaire [23].

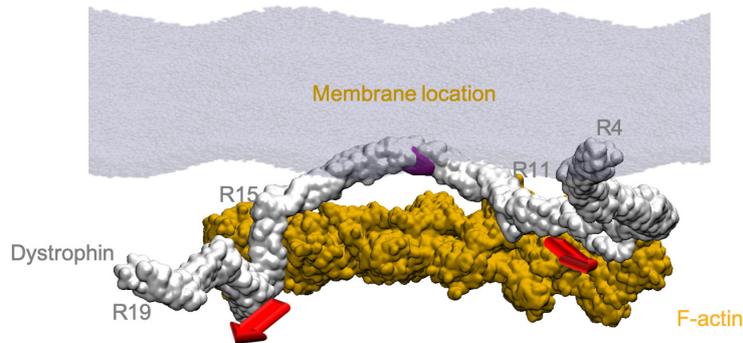


FIGURE 2.11 – Modèle structural d'un fragment du domaine central de la dystrophine (blanc), comprenant R11-15, lié à l'actine-F (orange) et au sarcolemme (gris) par le biais de peptides de contact identifiés par spectrométrie de masse. Les répétitions R11 et R15 sont en contact avec l'actine-F alors que la répétition R12 peut en même temps être en contact avec des lipides membranaires (zone en violet du fragment de dystrophine). Une telle disposition permettrait un éventuel désengagement de la dystrophine de la zone de liaison à l'actine-F (flèches rouges), pour réduire l'encombrement stérique en cas d'interaction avec d'autres partenaires cellulaires.

Publications :

- [24] Dos Santos Morais R *et al.* *Langmuir* 33: 6572-6580, 2017.
- [27] Dos Santos Morais R *et al.* *Biophys J* 115: 1231, 2018.
- [30] Mias-Lucquin D *et al.* *J Struct Biol* (sous presse).

Communications orales :

- [17] *Membrane-interfacial protein interactions: SAXS, SANS, and molecular modeling analysis of dystrophin 3D structure in the presence of membrane lipids.* GDR 3696 ProMemMoCe, Protéines membranaires : aspects moléculaires et cellulaires, La Londe-les-Maures, 5 avril 2016.
- [18] *Analysis of dystrophin 3D structure in the presence of membrane lipids.* 24^{èmes} Journées de la Diffusion Neutronique, Carqueiranne, 3 mai, 2016.
- [20] *Membrane-interfacial protein interactions: analysis of dystrophin 3D structure in the presence of membrane lipids.* GDR 3696 ProMemMoCe, Protéines membranaires : aspects moléculaires et cellulaires, Porquerolles, 15-18 mai 2017.
- [21] *Analysis of the 3D structure of dystrophin fragments in the presence of isotropic bicelles.* Neutrons in Structural Biology (NISB) International Conference, Grenoble, 6-9 juin 2017.
- [22] *Structural analysis reveals opening of a coiled-coil repeat of human dystrophin upon binding to anionic membrane lipids.* XVII International Small-Angle Scattering Conference (SAS 2018), Traverse City, USA, 7-12 octobre 2018.
- [23] *Dystrophin structural changes upon binding to membrane lipids: a small-angle neutron scattering (SANS) and specular neutron reflectivity (SNR) study.* Workshop franco-allemand, Garching, Allemagne, 14-16 mai 2019.

Collaborations : Jean-François Hubert et Olivier Delalande (IGDR, Rennes), Javier Pérez (synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin).

2.3.2 Adsorption/insertion de protéines en interaction avec des lipides membranaires

2.3.2.1 Interaction R1-3/lipides

Nous avons vu que le fragment R1-3 interagit avec les lipides au niveau de la partie torique des bicelles qui présente un défaut d'empilement (« packing ») des lipides. Pour déterminer plus précisément si R1-3 s'insère ou pas dans la membrane et, le cas échéant, mesurer son degré d'enfouissement, nous avons réalisé des mesures de réflectivité spéculaire de neutrons (SNR). Nous avons utilisé deux systèmes différents : (i) des monocouches de phospholipides à l'interface air/eau en cuve de Langmuir sur les réflectomètres FIGARO (ILL, Grenoble) et REFSANS (MLZ, Allemagne); (ii) des bicouches lipidiques déposées sur des blocs (ou « wafers ») de silicium sur le réflectomètre MARIA (MLZ, Allemagne). Pour les mesures sur FIGARO, nous avons comparé le comportement de R1-3 avec celui de R11-15.

Nous avons ajusté, en utilisant le logiciel Motofit [26], les données des bicouches seules avec un modèle à cinq couches correspondant à : (1) une couche d'oxyde de silicium, (2) une couche d'eau, (3) les têtes polaires internes des lipides, (4) les chaînes alkyles des lipides et (5) les têtes polaires externes (Fig. 2.12, gauche). Ce modèle donne pour les bicouches DMPC et DMPC/DMPS les dimensions attendues, avec une épaisseur de la bicouche de ~ 40 Å. L'ajout de R1-3 induit des petites différences, mais significatives, dans les signaux SNR et plus particulièrement dans le cas des bicouches anioniques (DMPC/DMPS) hydrogénées, en contraste 100% D_2O (Fig. 2.12, droite), suggérant une adsorption de la protéine au niveau de têtes polaires, accompagnée d'une augmentation de l'hydratation des têtes, sans insertion dans la partie hydrophobe de la bicouche.

Le contraste SMW (pour « Silicon Matched Water » correspondant à 38% de D_2O) n'a permis d'obtenir que le signal de la bicouche, voire seulement que de la partie hydrophobe, car les protéines et les têtes hydrophiles sont quasiment masquées dans ce contraste. Nous avons vérifié, par la superposition des courbes, que R1-3 ne pénètre pas dans la bicouche au niveau des queues hydrophobes.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par SANS avec le modèle de bicelle, où R1-3 ne pénètre pas dans la bicelle mais s'adsorbe au niveau de la partie torique, ainsi qu'avec des données précédentes de l'équipe de Rennes en microscopie à force atomique et en spectroscopie d'absorption infrarouge en réflexion et modulation de polarisation (PM-IRRAS) [27, 28].

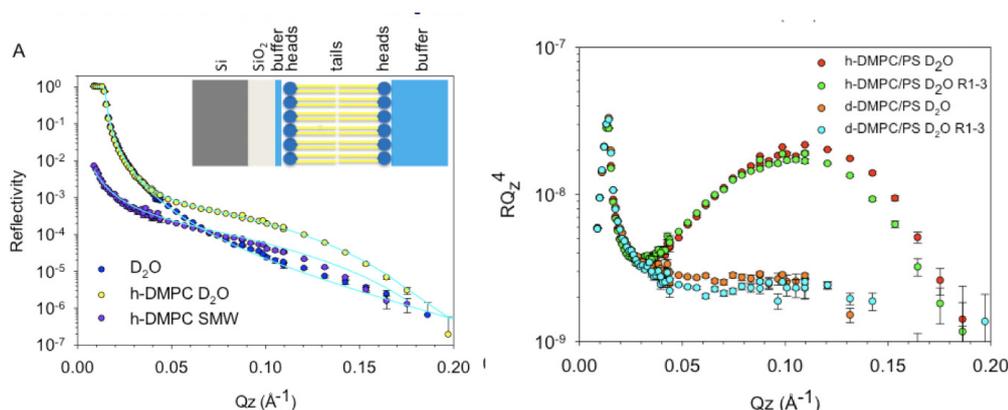


FIGURE 2.12 – *à gauche* Mesures SNR obtenues sur des bicouches lipidiques de DMPC supportées et ajustées avec un modèle à cinq couches (en insert). *à droite* Courbes obtenues dans deux contrastes (lipides hydrogénés ou deutérés en 100% D_2O) pour le fragment R1-3 de la dystrophine en interaction avec une bicouche de phospholipides anioniques (DMPC/DMPS) montrant un faible changement entre les courbes de la bicouche seule et celles de la bicouche en présence de la protéine. Ces résultats suggèrent que la protéine s'adsorbe à la surface de la bicouche lipidique, sans s'insérer dans les queues hydrophobes.

Nous avons traité les données obtenues sur les monocouches de Langmuir en suivant la méthode proposée récemment par Campbell *et al.* [29] pour tenir compte de la compressibilité de la mo-

nocouche et de la conservation de la stoechiométrie entre les têtes et les queues lipidiques, l'ajout d'une protéine pouvant modifier la monocouche avec un effet détergent sur les lipides.

Un traitement préliminaire donne, sur la monocouche seule, un modèle préférentiel comprenant 10% d'air dans la couche des chaînes. Deux modèles permettent alors d'ajuster les données expérimentales de R1-3 et R11-15, dans lesquels R1-3 se trouverait préférentiellement dans les chaînes et R11-15 au niveau des têtes lipidiques. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus en bicouches supportées et doivent encore être confirmés. On peut néanmoins souligner que les modèles biomimétiques que nous avons utilisés (bicelles en solution, bicouches membranaires supportées et monocouches lipidiques à l'interface air/eau) sont très différents.

Publication en préparation :

Dos Santos Morais R, Campbell RA, Koutsioubas A, Moulin JF, Chéron A, Vié V, Hubert JF, Combet* S. Human dystrophin interaction with phospholipid membranes: a neutron reflectivity study. En préparation pour *Langmuir*.

Collaborations : Jean-François Hubert (IGDR, Rennes), Richard Campbell (ILL, Grenoble), Alexandros Koutsioumpas (MLZ, Munich, Allemagne), Jean-François Moulin (MLZ, Munich, Allemagne).

2.3.2.2 Interaction prion/lipides

J'ai collaboré avec Sylvie Noinville, spécialiste de la spectroscopie infra-rouge (IR) de type ATR (pour « Attenuated Total Reflectance » en anglais) sur des bicouches supportées, qui travaillait à l'époque au Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires de l'INRA à Jouy-en-Josas. Nous avons couplé l'approche IR-ATR avec la réflectivité de neutrons pour étudier l'interaction de la protéine prion (PrP) avec la membrane lipidique, sur des bicouches supportées. L'objectif était de mieux comprendre comment se comportent les différents intermédiaires du PrP au cours de la formation de fibres amyloïdes neurotoxiques. Le mauvais repliement de la protéine PrP est associé à toute une gamme de maladies neurodégénératives mortelles, notamment la maladie de la « vache folle », la tremblante chez le mouton et la maladie de Creutzfeld-Jacob chez l'homme [30].

Ces maladies sont caractérisées par l'accumulation d'agrégats amyloïdes insolubles toxiques pour les cellules du système nerveux. Les prions sont des agents pathogènes non conventionnels puisque l'agent infectieux n'est pas un virus ou une bactérie mais une protéine de conformation anormale. Dans un état normal, PrP contient principalement des hélices α comme structure secondaire. Dans les cas pathologiques, la structure de la protéine est modifiée en conformères enrichis en feuillets β , qui s'oligomérisent pour former des fibres amyloïdes (ce sont les oligomères « on-pathway »). D'autres oligomères (appelés « off-pathway »), comme les 12-mères, sont coproduits mais ils ne donnent pas lieu à la formation de fibres. Pour cette étude, nous avons utilisé à la fois les 12-mères « off pathway » et les monomères, qui peuvent évoluer en oligomères « on pathway ».

Ces oligomères, et non les fibres amyloïdes, seraient la principale espèce neurotoxique [31] en formant des pores dans les membranes [32]. Pour mieux comprendre ce mode d'action, nous avons étudié quels oligomères peuvent perméabiliser la membrane lipidique et quels sont les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons utilisé la spectroscopie ATR pour mesurer les changements conformationnels des protéines et la réflectivité de neutrons pour étudier une possible pénétration des protéines dans les membranes lipidiques. Les deux mesures ont été réalisées dans les mêmes conditions, en utilisant, comme modèle membranaire, des bicouches lipidiques (DOPC:DOPS 7:3) supportées sur un « wafer » de silicium, avec un rapport protéines/lipides élevé (6:1).

Les mesures d'ATR ont mis en évidence que l'environnement lipidique entraîne pour les monomères PrP un changement de conformation des hélices α en feuillets β , ce qui prouve que les monomères se sont oligomérisés, le long de la voie « on pathway ». Les structures secondaires des 12-mères sont également affectées par la bicouche lipidique avec une augmentation des feuillets β intramoléculaires [28].

Les mesures de SNR ont été réalisées sur le réflectomètre EROS (LLB). Pour améliorer la sensibilité des mesures, nous avons utilisé deux contrastes différents : des protéines et des lipides

hydrogénés dans des tampons en 100% D₂O ou en 100% H₂O. En l'absence de protéines, nous avons utilisé un modèle à quatre couches avec (1) une couche d'oxyde de silicium, (2) les têtes polaires internes, (3) les chaînes alkyles et (4) les têtes polaires externes. Avec l'ajustement de ce modèle, nous trouvons une épaisseur globale de bicouche d'environ 55 Å, en accord avec les valeurs attendues. En présence des oligomères « on pathway », les données de réflectivité dans D₂O (Fig. 2.13, gauche, A) montrent une faible déviation de la position de la première oscillation, ce qui signifie que l'épaisseur ne varie pas. Nous observons cependant une différence d'amplitude, suggérant fortement un changement dans la composition de la bicouche. L'hypothèse d'une insertion des protéines dans la bicouche, avec un modèle à quatre couches, a permis d'ajuster correctement les données expérimentales (Fig. 2.13, gauche).

En présence des PrP 12-mères « off pathway », le minimum du spectre de réflectivité (en représentation RQ_z^4 en fonction de Q_z) dans D₂O est décalé vers les faibles valeurs de Q_z par rapport à la courbe de la bicouche seule, signifiant une augmentation de l'épaisseur du système 12-mères/membrane par rapport à la membrane seule (Fig. 2.13, droite, A). Il n'est pas possible d'ajuster les données en supposant une insertion, même partielle, de la protéine. Par contre, les courbes peuvent être ajustées en utilisant un modèle à cinq couches, en ajoutant une couche supplémentaire de protéines d'environ 70 Å, avec une adsorption partielle des protéines, formant comme des « patches » sur la membrane (Fig. 2.13, droite) [28].

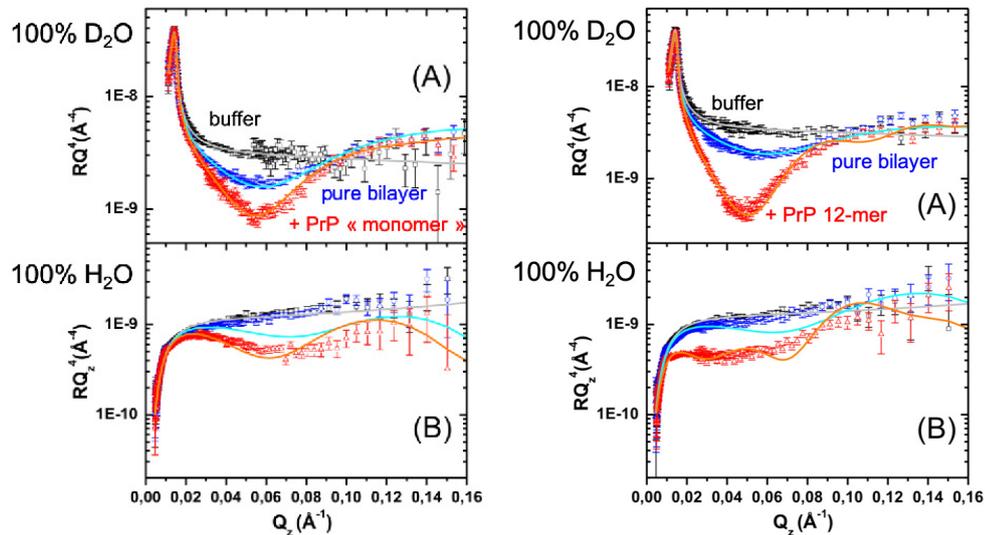


FIGURE 2.13 – *à gauche* Mesures de réflectivité des oligomères PrP « on-pathway » produits à partir des monomères en interaction avec une membrane lipidique supportée. Profils SNR en contraste 100% D₂O (A) ou 100% H₂O (B) du « wafer » de silicium nu (carrés noirs), de la bicouche membranaire pure (en l'absence de PrP), constituée de phospholipides hydrogénés DOPC/DOPS (7:3) dans un tampon 20 mM MOPS, pD (A) ou pH (B) 7,2 (cercles bleus), et de la même bicouche en présence des oligomères PrP « on-pathway » (triangles rouges). Les lignes continues (gris, cyan et orange, pour les données correspondantes) sont les meilleurs ajustements globaux obtenus avec le modèle à quatre couches décrit dans le texte. *à droite* Mesures de réflectivité d'oligomères PrP « off-pathway » (12-mères) en interaction avec une membrane lipidique supportée. Profils SNR dans les mêmes conditions que pour les oligomères « on pathway » mais en présence des 12-mères (triangles rouges). Les lignes continues sont les meilleurs ajustements globaux obtenus avec le même modèle à cinq couches décrit dans le texte. Les données ont été analysées avec le logiciel Motofit [26].

En conclusion, nos résultats indiquent que les oligomères PrP « on-pathway » et « off-pathway » interagissent avec les membranes lipidiques *via* des mécanismes distincts, mais qu'ils jouent tous les deux un rôle potentiel dans la neurotoxicité des maladies à prions. En faveur de l'hypothèse de la formation de pores membranaires, les espèces « on-pathway » induites par les lipides pénètrent profondément dans la membrane sans protrusion protéique significative (Fig. 2.14, gauche). Les espèces « off-pathway » forment une couche de « patches » de protéines adsorbées à la surface de la

membrane, ce qui déstabilise la membrane et provoque sa perméabilisation (Fig. 2.14, droite). Ces résultats révèlent une interaction importante des intermédiaires de PrP avec la membrane lipidique et fournissent des indices pour la conception de thérapies ciblant les prions.

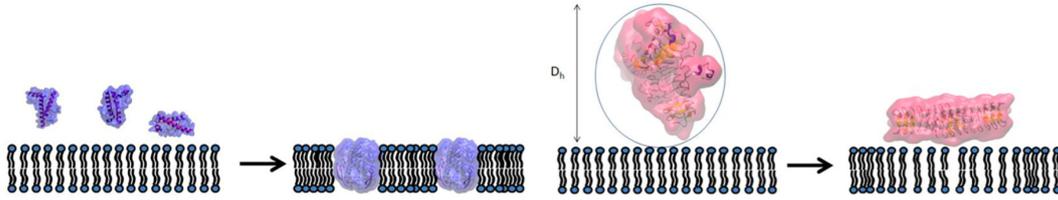


FIGURE 2.14 – *à gauche* Oligomérisation du monomère PrP composé d'hélices α , induite par la membrane, conduisant à la formation et à l'insertion d'oligomères en feuillettes β , de type « on-pathway » (la voie principale de la formation de fibres amyloïdes) pour former des pores dans la membrane. *à droite* Interaction d'oligomères (12-mères) « off-pathway » (une voie annexe de formation d'oligomères PrP), composés de feuillettes β , qui s'adsorbent à l'interface membranaire.

Publications :

[28] Combet S *et al.* *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861: 514-523, 2019.

Communication orale :

[24] *Membrane interaction of off-pathway prion oligomers and lipid-induced on-pathway intermediates during prion conversion: a clue for neurotoxicity.* European Conference on Neutron Scattering (ECNS), Saint-Pétersbourg, Russie, 30 juin-5 juillet 2019.

Collaborations : Sylvie Noinville (Laboratoire MONARIS, UMR 8233, Paris), Fabrice Cousin (LLB).

2.4 Perspectives

Je suis actuellement impliquée dans de nouveaux projets où j'utilise les propriétés des techniques de SANS et de SNR pour révéler la structure de protéines au sein d'assemblages ou en interaction avec des membranes.

2.4.1 Structure de complexes Ku/ADN/protéines

Je co-encadre depuis novembre 2018, avec Jean-Baptiste Charbonnier de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC/LBSR, Saclay) et Léonard Chavas (synchrotron SOLEIL), une étudiante de doctorat, Sayma Zahid, sur un projet de détermination de la structure de complexes formés par l'hétérodimère Ku70-Ku80 (Ku), l'ADN et plusieurs protéines partenaires. Ces complexes protéiques sont impliqués dans la réparation des cassures double-brin (CDB) de l'ADN *via* un mécanisme par « jonction directe des extrémités » de l'ADN (NHEJ en anglais pour « Non-Homologous End-Joining »). De nombreux traitements anti-cancéreux ont pour principe de générer des CDB de l'ADN par chimiothérapie ou radiothérapie, les cellules tumorales étant plus sensibles aux CDB que les cellules saines [33]. Certaines cellules tumorales résistent cependant aux traitements *via* notamment la voie de réparation NHEJ : un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer est donc aujourd'hui de trouver des inhibiteurs puissants de la voie NHEJ. L'équipe de JB. Charbonnier mène depuis de nombreuses années un travail de compréhension des mécanismes moléculaires des protéines impliquées dans cette voie de réparation, ainsi que la recherche de nouveaux inhibiteurs.

Ku est la protéine principale de la voie NHEJ et joue un rôle de plateforme de recrutement : elle reconnaît non seulement les CDB de l'ADN mais recrute aussi plusieurs protéines partenaires qui interviennent dans cette voie, dont les protéines Werner (WRN) et PAXX (Fig. 2.15). La protéine

WRN présente deux activités enzymatiques (domaines hélicase et exonucléase) et la protéine PAXX est un facteur de ligation. Le recrutement des partenaires de Ku se fait par des interactions directes et implique, notamment pour WRN et PAXX, des motifs spécifiques, appelés KBM (pour « Ku Binding Motif »). Des structures cristallographiques de complexes protéiques de la voie NHEJ ont déjà été décrites par l'équipe de JB. Charbonnier [34, 35]. L'enjeu est désormais de caractériser des assemblages protéiques de taille supérieure, comme les complexes Ku/ADN/protéines avec WRN ou PAXX par XRC, TEM et cryo-TEM.

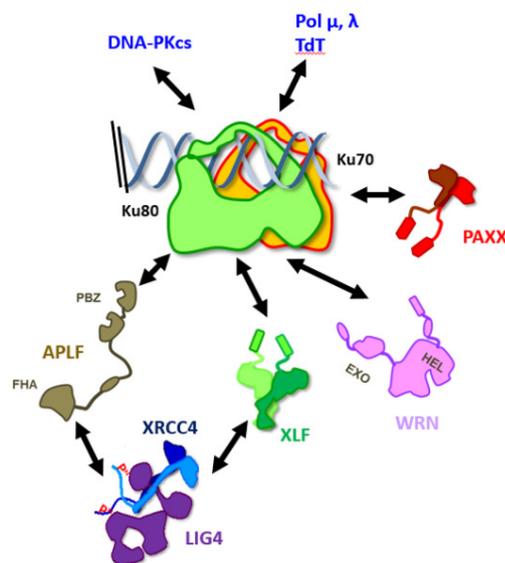


FIGURE 2.15 – Hétérodimère Ku70-Ku80 (Ku) (jaune/vert) en présence d'ADN double-brin et de différentes protéines partenaires, dont les protéines WRN (rose) et PAXX (rouge), impliquées dans la voie NHEJ de réparation des cassures double-brin de l'ADN.

Dans ce projet, le SAS permet de caractériser les structures en solution, à basse résolution, de ces assemblages protéiques en présence d'ADN mimant une CDB, pour valider les structures obtenues à haute résolution par XRC et TEM/cryo-TEM. Le SAS est également indispensable pour analyser ces assemblages en présence d'ADN de tailles et de structures chimiques différentes pour mimer la variété des extrémités des CDB. Les facteurs de la voie de réparation NHEJ ont en effet une efficacité différente selon la nature de l'extrémité de l'ADN [36].

Nous avons réalisé, par SAXS et SEC-SAXS, des premières mesures sur les complexes Ku/ADN seuls ou en présence de peptides de WRN (des parties de WRN contenant les motifs KBM d'intérêt). La SEC s'avère indispensable à cause de la présence du peptide en excès et d'agrégats de petite taille que nous avons observés. Les résultats de SEC-SAXS sur ces deux types de complexes montrent qu'ils sont bien de la taille attendue mais que leur conformation n'est pas significativement modifiée par l'association du peptide. L'objectif à présent est d'étudier des domaines plus gros de WRN, ainsi que PAXX, associés aux complexes Ku/ADN.

Déterminer la structure en solution de tels assemblages multi-protéines et protéines/ADN par SAXS uniquement s'avère très souvent insuffisant car cette technique ne permet pas de distinguer les protéines de l'ADN au sein de l'assemblage. La variation de contraste en SANS permettra de positionner sans ambiguïté l'ADN, en utilisant différents mélanges H₂O/D₂O du tampon afin de masquer, soit l'ADN (dans ~70% D₂O), soit les protéines (dans ~40% D₂O). Nous pourrions ainsi documenter en solution le mode de reconnaissance de plusieurs types d'ADN par l'assemblage protéique au sein des complexes, en utilisant comme référence les structures à haute résolution obtenues pour des ADN de petite taille.

Collaborations : Jean-Baptiste Charbonnier et Virginie Ropars (I2BC/LBSR, Saclay), Léonard Chavas (synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin).

2.4.2 Interaction mTSPO/détergents

Je participe à un projet sur l'étude de complexes protéines membranaires/détergents (ou tensio-actifs). L'objectif est de caractériser, en couplant expériences (SAXS, SANS, SEC-MALS) et simulations de dynamique moléculaire, la structure de chaque composant du complexe et de modéliser leurs interactions. A plus long terme, ce projet vise à mieux comprendre l'influence des détergents sur la stabilisation des protéines membranaires et sur les mécanismes de cristallisation de ces protéines, en vue de trouver les conditions permettant leur étude par XRC.

Notre modèle d'étude est la protéine membranaire TSPO (pour « Translocator Protein Outer Membrane »), d'environ 18 kDa, fonctionnellement importante et présente principalement dans les membranes externes des bactéries et des mitochondries. Elle a été décrite à l'origine comme un récepteur périphérique des benzodiazépines dans le cerveau, mais d'autres données ont montré que ce récepteur est également exprimé dans le reste du corps. Chez les mammifères, elle se lie à divers ligands, dont le cholestérol, et pourrait être impliquée dans la neuro-dégénérescence et le cancer chez l'homme. La première structure 3D à haute résolution d'un TSPO de mammifère (mTSPO de souris) a été résolue par RMN dans des micelles de dodécylphosphocholine (DPC) en présence d'un ligand stabilisant [37], confirmant une structure transmembranaire à cinq hélices α obtenue précédemment pour mTSPO [38].

Bien que l'on n'ait pas encore obtenu de cristaux pour mTSPO, avec ou sans ligand, des cristaux ont été obtenus en phase cubique lipidique pour deux TSPO bactériennes homologues [39]. Dans ce contexte, mon projet vise à caractériser la structure à basse résolution de mTSPO et de sa couronne de détergents, en utilisant des détergents pertinents pour la cristallogénèse et la XRC. Nous avons commencé par le SDS, le détergent de solubilisation de mTSPO, et poursuivrons avec le DPC, utilisé dans la structure résolue par RMN de mTSPO [38]. Ces deux détergents ont la même chaîne aliphatique mais des têtes polaires différentes (chargée ou zwitterionique, respectivement).

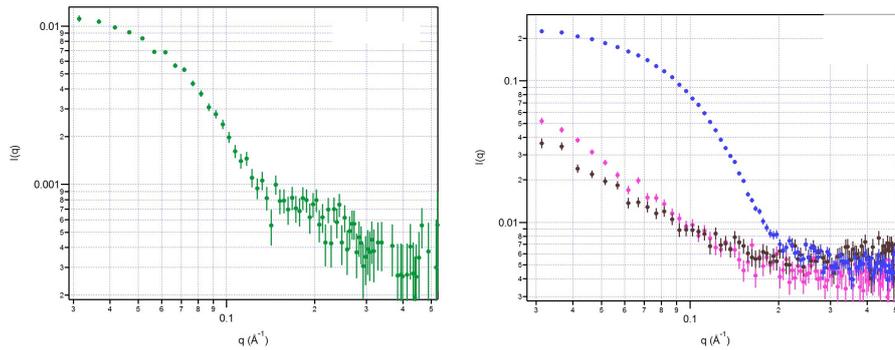


FIGURE 2.16 – Profils SEC-SANS du complexe mTSPO/SDS élué sur une colonne Superdex-200 Hiload 300/100 (24 mL) en tampon 50 mM Tris, 0,1% SDS deutéré (d-SDS), pD 7. **à gauche** Mesure SANS (vert) de la protéine mTSPO au sein du complexe (en 100% D₂O, le d-SDS étant masqué dans ce contraste). **à droite** Mesure SANS des micelles de d-SDS libres (bleu) et de la couronne de d-SDS autour de la protéine (rose ou marron) au sein du complexe (en 42% D₂O, contraste qui masque la contribution de la protéine).

J'ai effectué des mesures préliminaires de SANS au LLB en utilisant le SDS et en éteignant la contribution de la protéine dans un tampon à 42% D₂O. Les courbes ont montré que les complexes mTSPO/SDS présentent des interactions répulsives en solution et les complexes mTSPO/DPC s'agrègent, ce qui empêche une modélisation correcte du facteur de forme. Nous avons donc adapté les conditions physico-chimiques (ajout de 150 mM de NaCl) et utilisé une chromatographie par exclusion de taille (SEC), qui s'avère indispensable pour éviter la contribution du signal des micelles de détergent en excès et d'agrégats éventuels. Des premières mesures ont été effectuées sur l'appareil D22, à l'ILL, sur un échantillon de mTSPO en présence de SDS deutéré, qui montrent que les deux conditions de variation de contraste (42 ou 100% D₂O) permettent bien de sonder sélectivement la couronne de SDS ou la protéine mTSPO, respectivement (Fig. 2.16).

La caractérisation des complexes sera effectuée prochainement en SDS et DPC, en couplant : (i) la diffusion de rayonnement (SANS, SAXS, SEC-MALS) pour obtenir les caractéristiques structu-

rales (géométrie, nombre de molécules de détergent liées à la protéine); (ii) la modélisation [40] et la simulation par dynamique moléculaire [41] pour obtenir les caractéristiques des interactions moléculaires entre la protéine et le détergent, en fonction de la nature et de la structure du détergent, ainsi que les interactions faibles entre micelles.

Collaborations : Françoise Bonneté (IBPC, Paris), Stéphanie Finet (IMPMC, Paris), Stéphane Abel et Massimo Marchi (I2BC, Saclay), Jean-Jacques Lacapère (Laboratoire des BioMolécules, Paris).

2.4.3 Interaction magainine-2/phospholipides

Je collabore avec Burkhard Bechinger et Arnaud Marquette de l'Institut de Chimie de Strasbourg (ICS) pour étudier l'insertion membranaire d'un peptide anti-microbien amphiphile, la magainine-2 (mag2) (Fig. 2.17, gauche). L'objectif est de comparer des mesures de réflectivité de neutrons avec des mesures obtenues par RMN et par d'autres méthodes biophysiques [42]. Les peptides anti-microbiens comme mag2 sont de puissants antibiotiques à large spectre qui présentent donc un fort potentiel en tant que nouveaux agents thérapeutiques. En raison de la résistance croissante aux antibiotiques classiques, il est en effet urgent de développer des composés dotés de nouveaux mécanismes d'action.

Des études ont montré que les interactions peptide anti-microbien/membrane dépendent d'un jeu complexe d'interactions entre la composition lipidique de la membrane, la chimie des peptides et les propriétés de la phase aqueuse (pH, force ionique, etc.), mais de nombreux détails restent à élucider [43]. Pendant longtemps, on a pensé que la connaissance de la structure et de la topologie des peptides permettait d'expliquer leur fonctionnement, jusqu'à ce qu'une action concertée des lipides et des peptides soit suggérée [44]. Cependant, les données concernant l'interaction peptides/lipides au niveau moléculaire restent vagues et même contradictoires [43].

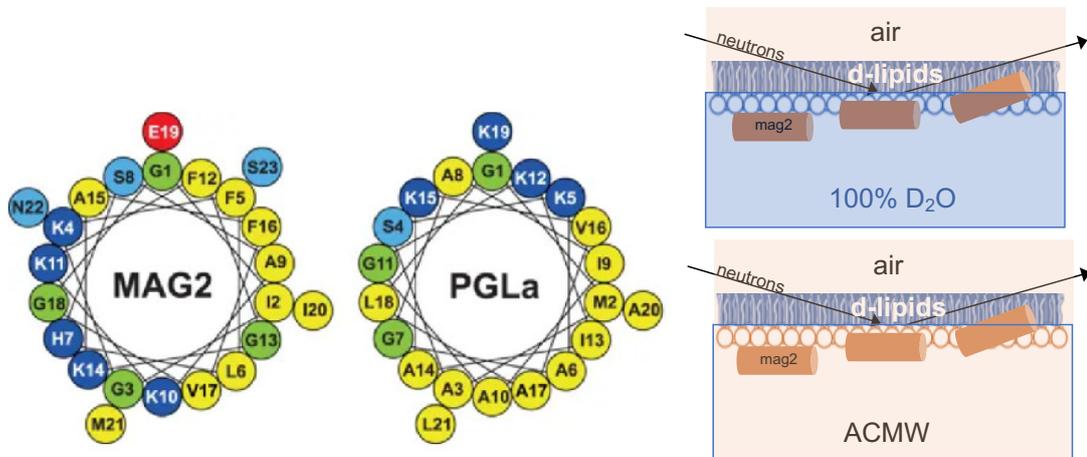


FIGURE 2.17 – *à gauche* Répartition des acides aminés dans la roue des hélices α de mag2 et de PGLa (d'après [45]). Les résidus hydrophobes sont en jaune, les cationiques en bleu foncé, les polaires en bleu clair, les glycines en vert et le résidu anionique en rouge. *à droite* Représentation schématique du montage des expériences SNR à l'interface air/eau en cuve de Langmuir dans les deux conditions de contraste du tampon (100% D₂O et ACMW). Les chaînes alkyles sont deutérées (bleu) alors que les têtes polaires et les peptides sont hydrogénés (orange). Dans la condition 100% D₂O, l'hydratation des têtes polaires rend cependant leur SLD proche de celle de D₂O.

Ainsi, l'objectif de notre projet est d'obtenir des détails structurels pour mieux comprendre comment les peptides linéaires cationiques comme mag2 sont souvent moins actifs, paradoxalement, en présence de phospholipides chargés négativement, tels que le DMPG [46]. Pendant longtemps, cet effet n'a pas été reconnu car l'attraction électrostatique entre les peptides cationiques et la surface de la membrane chargée négativement entraîne une concentration locale élevée en peptides

et une augmentation de l'association de la membrane [47]. Cependant, la différence devient évidente lorsque seul le peptide associé à la membrane est pris en compte [46].

Nous faisons l'hypothèse que cette différence provient de variations de la profondeur de pénétration du peptide dans la membrane, dues aux interactions électrostatiques. Pour tester cette hypothèse et savoir comment se positionne mag2 dans la membrane (Fig. 2.17, droite), nous étudions l'interaction de mag2 avec des lipides zwitterioniques, tels que le DPPC, et des lipides anioniques, tels que le DPPG.

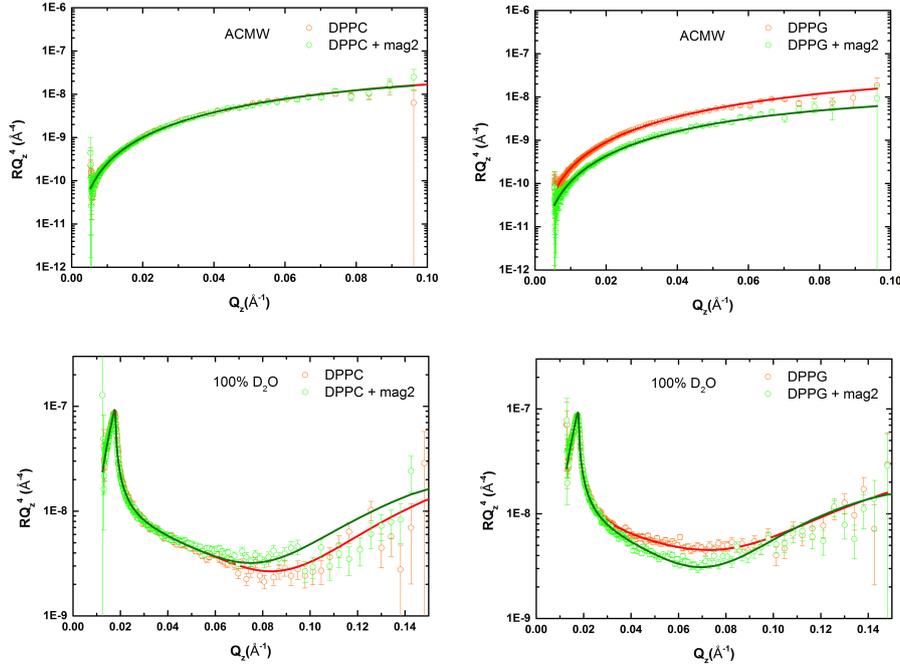


FIGURE 2.18 – Profils SNR des monocouches lipidiques deutérées, seules (rouge) ou après ajout de mag2 hydrogénée (vert), en ACMW ou 100% D₂O Les traits pleins sont les meilleurs ajustements obtenus avec le logiciel Motofit [26] avec un modèle à deux ou trois couches (deux couches correspondant aux têtes polaires et aux queues hydrophobes des lipides et une troisième couche correspondant au peptide) pour la monocouche seule ou en présence de mag2, respectivement.

Nous avons débuté cette étude par des expériences de SNR réalisées sur le réflectomètre HERMES (LLB) en cuve de Langmuir, à l'interface air/eau, avant des mesures ultérieures sur des bicouches membranaires supportées. Nous avons utilisé d'abord des lipides contenant des queues hydrophobes deutérées (d-lipides). Les mesures des d-lipides ont été réalisées dans deux contrastes avec les tampons suivants (Fig. 2.17, droite) : (i) 100% D₂O qui permet de sonder les peptides hydrogénés ; (ii) ACMW (pour « Air Contrast-Matched Water », *i.e.* = 8% D₂O) dont la SLD, égale à zéro, correspond à celle de l'air, afin de sonder plus spécifiquement les chaînes alkyles des lipides deutérés.

Les premiers profils de réflectivité donnent une épaisseur de la monocouche de phospholipides en accord avec les tailles attendues (~ 24 Å), aussi bien pour DPPC que pour DPPG. L'ajout de mag2 modifie de manière significative la monocouche de DPPG mais très peu la monocouche de DPPC (Fig. 2.18). On trouve une couche de ~ 8 Å et de ~ 15 Å de mag2 adsorbée sous les têtes lipidiques de la monocouche de DPPC ou de DPPG, respectivement, et cette adsorption s'accompagne d'une solvatation plus élevée des têtes. On peut interpréter cela comme une plus grande interaction de mag2 avec DPPG. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature obtenues avec le même type de lipides sur un autre peptide anti-microbien [48].

Pour confirmer sans équivoque les profils de SLD, nous avons ajouté une troisième condition de contraste par des mesures, en 100% D₂O, avec un mélange de lipides deutérés et hydrogénés de façon à obtenir une SLD des chaînes hydrophobes égale à zéro (ACM-lipides, pour « Air

Contrast-Matched »). Les résultats sont en cours d'analyse, pour, comme dans le projet dystrophine/lipides en SNR (Section 2.3.2.1), tenir compte de la compressibilité de la monocouche et de la stoechiométrie entre les têtes et les queues [29].

Enfin, nous avons ajouté le PGLa, un autre peptide anti-microbien proche de mag2 (Fig. 2.17, gauche), au système mag2/lipides pour tester son influence sur l'interaction de mag2 avec la membrane. En effet, les deux peptides sont connus pour agir en synergie au niveau de leur activité anti-microbienne [45].

Collaboration : Burkhard Bechinger et Arnaud Marquette (ICS, Strasbourg).

2.5 Résumé

La variation de contraste est un outil puissant permettant d'étudier la structure de protéines au sein d'assemblages par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) ou leur interaction avec des membranes (adsorption/insertion) par réflectivité spéculaire de neutrons (SNR). J'ai mis à profit cette méthode dans différents travaux que j'ai menés en collaboration avec des équipes de biophysiciens et de biologistes.

Nous avons étudié par SANS des complexes Hb/PEG, proposés comme substituts du sang, en masquant sélectivement le signal de la protéine ou du polymère. Les structures du PEG greffé à Hb confirment les données physiologiques, montrant un seuil de ~ 10 kDa pour la taille des PEG à partir duquel l'efficacité biologique de ces complexes diminue.

Dans le projet dystrophine/membrane, j'ai montré qu'il est possible de masquer le signal SANS de bicelles deutérées. En appliquant cette propriété à l'étude structurale du fragment R1-3 de la dystrophine, connu pour interagir avec les lipides de la membrane musculaire (sarcolemme), nous avons observé, en combinant SANS, modélisation moléculaire et spectrométrie de masse, que les hélices de la première répétition de R1-3 s'ouvrent au contact des lipides. Ce changement structural pourrait permettre un ancrage de la protéine au sarcolemme au cours du processus de contraction/élongation du muscle.

Par réflectivité de neutrons, j'ai étudié le mode d'interaction de deux types d'oligomères de la protéine prion, qui s'insèrent pour former des pores membranaires (oligomères de la voie « on-pathway ») ou s'adsorbent à la surface de la membrane en la déstabilisant (12-mères de la voie « off-pathway »). Cette étude permet de mieux comprendre la neurotoxicité de ces espèces par perméabilisation des membranes biologiques.

Comme perspectives à court terme, j'ai présenté des projets en cours, dans lesquels le SANS et le SNR sont des techniques incontournables pour sonder des protéines d'intérêt au sein d'assemblages ou en interaction avec des membranes : adsorption/insertion de R1-3 dans différents modèles de membrane lipidique par SNR ; structure de la protéine Ku en interaction avec l'ADN et des protéines partenaires de la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN ; structure et interaction de la protéine membranaire mTSPO et des détergents de sa couronne de solubilisation en vue de l'étude par cristallographie du complexe ; rôle des interactions électrostatiques dans l'interaction de la magainine-2, un peptide anti-microbien, avec une monocouche lipidique.

Chapitre 3

Effet de l'environnement sur la structure de protéines

Contenu

3.1	Introduction	38
3.2	Effet de l'encombrement cytoplasmique sur la structure de protéines	38
3.2.1	L'encombrement cytoplasmique	38
3.2.2	Effet de l'encombrement moléculaire sur la structure de la myoglobine	39
3.3	Effet de la haute pression sur le dépliement de protéines	42
3.3.1	La haute pression : un outil pour étudier le dépliement des protéines	42
3.3.2	Développement d'un prototype de cellule haute pression pour le SANS	42
3.3.3	Effet de ligands sur la stabilité sous pression de la β -lactoglobuline	44
3.4	Perspectives	47
	Assemblages de protéines végétales induits par la pression	48
3.5	Résumé	49

3.1 Introduction

Le *repliement* des protéines est un sujet central en biologie mais il n'est pas facile de l'appréhender directement. En étudiant leur *dépliement*, qui n'est pas intéressant en soi mais qui peut facilement être mis en oeuvre, on accède à des connaissances sur le repliement. Le repliement d'une protéine revient à passer d'une conformation dépliée à sa conformation native « unique ». Pour atteindre l'état natif, la protéine doit passer une barrière d'énergie libre.

Un modèle à seulement deux états, l'état natif et l'état déplié (correspondant à l'ensemble des conformations dépliées de la protéines), ne permet pas d'expliquer le repliement. Le fameux paradoxe que Levinthal a introduit en 1968 [49], où les protéines dépliées « recherchent au hasard leur conformation native » par une sorte de repliement préférentiel et séquentiel (formation des structures secondaires puis assemblage de la structure tertiaire grâce aux interactions hydrophiles/hydrophobes) est un modèle irréaliste puisque le repliement d'une protéine prendrait des temps géologiques.

Dans les années 1990, de nouveaux concepts ont été proposés par Dill, sans chemins de repliement spécifiques mais dans un paysage énergétique en forme d'entonnoir [50]. Dans ce modèle, le moteur du repliement n'est pas la liaison hydrogène mais est lié à la solvatation. La première étape est un « collapse » rapide de la chaîne correspondant à l'effondrement hydrophobe, conduisant à minimiser l'exposition des chaînes hydrophobes de la protéine au solvant aqueux. Cette force motrice conduit à un nombre restreint de conformations, plus compactes, parmi lesquelles se trouve la conformation native.

L'entonnoir n'est pas forcément lisse mais peut être « rugueux », avec des creux (pièges cinétiques) et des bosses (barrières énergétiques), introduisant des états intermédiaires observables [50]. Cette vision permet d'expliquer à la fois le dépliement/repliement « à deux états » pour certaines protéines, ainsi que la présence d'états intermédiaires dans les chemins de dépliement/repliement d'autres protéines. Elle peut en outre expliquer le mauvais repliement, ainsi que l'irréversibilité du dépliement de certaines protéines.

3.2 Effet de l'encombrement cytoplasmique sur la structure de protéines

3.2.1 L'encombrement cytoplasmique

L'environnement typique des macromolécules *in vivo* est extrêmement encombré, à cause de la présence d'une grande quantité de macromolécules différentes dans la cellule, qui représente une concentration totale de l'ordre de 300 à 400 mg/mL [51], correspondant à une fraction volumique de 20 à 30%. Cet encombrement cytoplasmique affecte le repliement des protéines : le volume exclu, dû à la présence de ces molécules, diminue en effet de manière importante le volume accessible à une protéine [52]. Des études théoriques, basés sur des considérations entropiques, ont suggéré que cet encombrement tend à favoriser les états compacts de la protéine, en déstabilisant les états dépliés plus étendus, et donc à décaler l'équilibre vers l'état natif [53]. L'encombrement favorise également la formation d'agrégats.

Une première étude, en collaboration avec Didier Lairez (LLB), a montré, par dichroïsme circulaire (CD), une stabilisation de l'hélice α de l'acide poly-L-glutamique (PLGA) par le PEG [19]. J'ai ensuite étudié, en collaboration avec Stéphane Longeville, qui a initié ce projet au LLB, l'effet de l'encombrement moléculaire sur la stabilité et le dépliement de la myoglobine (Mb) au cours de la dénaturation thermique. Mb est une hémoprotéine globulaire d'environ 17 kDa, composée principalement d'hélices α et abondante dans les muscles des mammifères.

Nous avons travaillé en présence d'une concentration sous-dénaturante (5 M) d'urée pour décaler la température de transition de Mb (T_m de 84 à 53°C, mesurée en CD, T_m étant la température de demi-dénaturation) afin de pouvoir observer une éventuelle stabilisation de la protéine par l'encombrement moléculaire. Le dépliement de la structure tertiaire de Mb, mesuré en SANS, est en bon accord avec le T_m mesuré en CD (Fig. 3.1).

Le mode d'action de l'urée dans le dépliement des protéines fait débat. Des études ont proposé que l'effet soit lié à une perturbation du réseau de liaisons hydrogène dans l'eau [54]. D'autres études ont au contraire montré que le mécanisme de dénaturation des protéines est basé sur des interactions directes entre l'urée et les molécules de protéines [55].

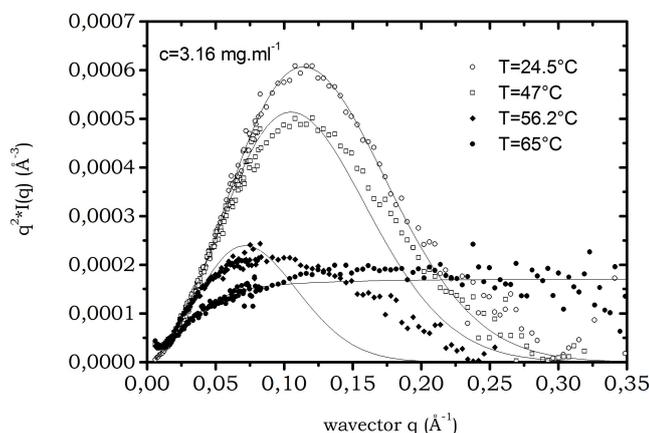


FIGURE 3.1 – Représentation de Kratky (IQ^2 en fonction de Q) des spectres SANS obtenus pour une solution de Mb à 3,3 mg/mL en présence de 5 M d'urée deutérée, dans un tampon 10 mM phosphate, 100% D_2O , pD 7,2, à différentes températures. La forme en cloche des spectres en-dessous de $T_m \simeq 53^\circ C$ montre que la protéine est dans un état natif globulaire (régime de Porod), tandis que les spectres atteignent un plateau à des températures plus élevées, caractéristique d'un comportement de chaîne gaussienne (régime de Debye).

Nous avons réalisé des expériences de CD et de SANS pour mesurer l'effet de l'encombrement sur les structures secondaire (taux d'hélicité) et tertiaire de Mb, respectivement. Le SANS est un outil incontournable dans ce type d'étude puisque, grâce à la variation de contraste, le signal des agents d'encombrement (à une concentration de 300-400 mg/mL) peut être masqué pour sonder spécifiquement le signal de la protéine d'intérêt, présente seulement à quelques mg/mL. Nous parlons d'encombrement *moléculaire* puisque nous utilisons des modèles d'agents d'encombrement pour mimer l'encombrement cytoplasmique.

3.2.2 Effet de l'encombrement moléculaire sur la structure de la myoglobine

3.2.2.1 Effet sur la structure secondaire de Mb

Nous avons étudié l'effet du TMAO (triméthylamine-N-oxyde), un petit osmolyte impliqué dans la réponse cellulaire au stress osmotique et proposé comme agent d'encombrement. Bien que le TMAO soit connu pour stabiliser l'état natif des protéines par effet de volume exclu [56] et par déstabilisation de leur état déplié en diminuant les liaisons hydrogène avec l'eau [57], peu de données expérimentales étaient disponibles sur son effet sur le repliement des protéines. Nous avons mesuré par CD l'effet du TMAO sur la stabilité des hélices α de Mb au cours de la dénaturation thermique et l'avons comparé au Ficoll70 et au PEG, deux polymères également proposés comme agents d'encombrement : le Ficoll70, un polysaccharide de structure proche de celle d'une sphère dure, et le PEG 20 kDa, un polymère assimilé plutôt à un réseau enchevêtré. Nous avons observé des comportements très différents de la protéine en présence de ces différents agents (Fig. 3.2).

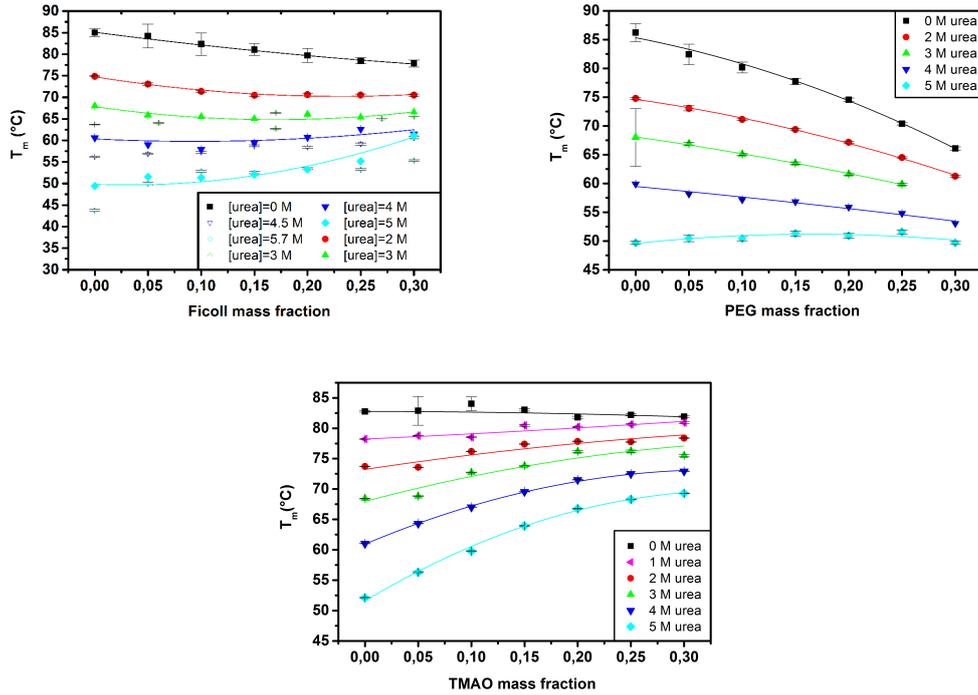


FIGURE 3.2 – Variation du T_m de Mb dans un tampon 10 mM phosphate, pH 7,2, au cours de la dénaturation thermique, en fonction de la fraction massique de différents agents d'encombrement (Ficoll70, PEG 20 kDa et TMAO) et de la concentration sous-dénaturante d'urée (< 5 M). Les effets des différents agents sur la dénaturation thermique de Mb sont significativement différents : *en haut, à gauche* le Ficoll70 ne stabilise que très légèrement la protéine jusqu'à 3 M d'urée ; *en haut, à droite* le PEG 20 kDa au contraire déstabilise la protéine jusqu'à 4 M d'urée ; *en bas* le TMAO stabilise davantage la protéine au fur et à mesure que la quantité d'urée augmente.

Le PEG interagit favorablement avec les chaînes latérales hydrophobes exposées des protéines lors de leur dépliement, conduisant à leur déstabilisation et donc à une diminution du T_m (Fig. 3.2, haut, gauche) [58]. Le PEG n'est donc pas un bon candidat pour ce type d'étude.

Le Ficoll70 est un agent d'encombrement modèle car il s'agit d'un polysaccharide polaire inerte qui se comporte comme une sphère semi-rigide. Il s'agit donc d'une assez bonne imitation des macromolécules globulaires qui peuvent être présentes dans le cytoplasme. Nous observons une faible stabilisation des hélices de Mb par le Ficoll70 (Fig. 3.2, haut, droite). Ce polysaccharide serait donc un candidat intéressant mais il n'a cependant pas encore pu être deutéré pour des études en SANS.

L'effet stabilisateur du TMAO sur les protéines (Fig. 3.2, bas) serait dû à une interaction défavorable entre l'osmolyte et la chaîne principale de la protéine dépliée : cet effet, appelé osmophobe, augmente préférentiellement l'énergie libre de l'état dénaturé et déplace donc l'équilibre vers l'état natif [59]. Il a également été suggéré que le TMAO compense les effets déstabilisateurs de l'urée en contrant les interactions de l'urée avec la protéine et en favorisant la structure de l'eau [60]. Etant de plus disponible commercialement sous forme deutérée, le TMAO est un bon candidat pour être utilisé comme agent d'encombrement en SANS.

3.2.2.2 Effet sur la structure tertiaire de Mb

Nous avons sondé par SANS la conformation tridimensionnelle de Mb, à quelques mg/mL, en présence de fortes concentrations de TMAO deutéré et en présence de 5 M d'urée deutérée dans un tampon 10 mM phosphate, 100% D_2O , pD 7,2. A cette concentration d'urée, nous avons observé en CD que le TMAO stabilise fortement les hélices α de la protéine, malgré une stabilisation relativement moins efficace aux concentrations de TMAO les plus élevées. T_m varie de $\sim 52^\circ C$ à

$\Phi = 0$ (sans TMAO) jusqu'à $\sim 69^\circ\text{C}$ à $\Phi = 0.3$, où Φ est la fraction massique en TMAO (Fig. 3.2, bas, courbe cyan).

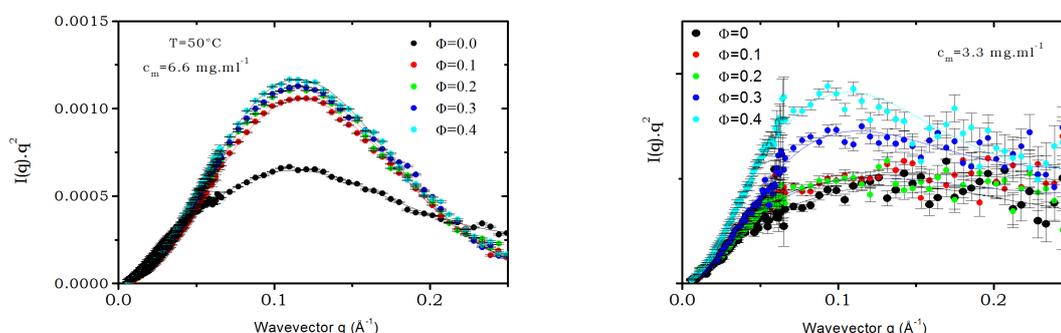


FIGURE 3.3 – Représentation de Kratky des spectres SANS de solutions de Mb (*à gauche* à 6,6 mg/mL et $T \simeq 50^\circ\text{C}$, *à droite* à 3,3 mg/mL et $T \simeq 74^\circ\text{C}$) pour différentes fractions massiques de TMAO deutéré, et en présence de 5 M d'urée deutérée. *à gauche* A $T \simeq 50^\circ\text{C}$, les spectres obtenus de $\Phi = 0,1$ à 0,4 sont caractéristiques d'une protéine repliée tandis que Mb est partiellement dépliée sans TMAO ($\Phi = 0$, noir). *à droite* A $T \simeq 74^\circ\text{C}$, les spectres atteignent un plateau à grandes valeurs de Q , caractéristique de la conformation en chaîne gaussienne que prend la protéine dépliée. En augmentant la concentration en TMAO, un maximum apparaît autour de $Q \simeq 0,1 \text{ \AA}^{-1}$, reflétant une légère diminution de l'extension spatiale de la chaîne ($\Phi = 0,3$ et 0,4, bleu et cyan, respectivement).

Nous rapportons deux effets compétitifs : (i) une agrégation importante de Mb autour de T_m , probablement due à l'association des parties hydrophobes de la protéine une fois exposées au solvant, avant une désagrégation à des températures plus élevées; (ii) une stabilisation significative de l'état replié de Mb en présence de TMAO, attribuée à la fois à un effet de volume exclu et à une compensation de l'effet dénaturant de l'urée.

Publication dans la thématique :

[19] Koutsioubas A *et al.* *J Chem Phys* 136, 215101-7, 2012.

Publications en préparation :

Combet* S, Borukcu S, Chandrabalan P, Ferez Y, Longeville S. Combined effect of crowding and subdenaturing concentrations of urea on myoglobin stability. En préparation pour *Phys Chem Chem Phys*.

Longeville* S, Appavou MS, Combet S. TMAO enhances myoglobin thermal stability without compaction of the unfolded state of the protein. En préparation pour *Biophys J*.

Communications orales :

[10] *Influence de l'encombrement macromoléculaire sur le dépliement et la stabilité de la myoglobine*. 21^{èmes} Journées de la Diffusion Neutronique, Sète, 25 juin 2013.

[14] *Influence of macromolecular crowding on myoglobin unfolding and stability*. Neutrons & Food 3rd International Conference, Paris, 10 juillet 2014.

Collaboration : Stéphane Longeville (LLB).

3.3 Effet de la haute pression sur le dépliement de protéines

3.3.1 La haute pression : un outil pour étudier le dépliement des protéines

La pression, comme la température, est une variable thermodynamique fondamentale pour décrire les états conformationnels des protéines [61]. Alors que la température favorise les conformations d'entropie supérieure, la pression favorise les conformations de volume spécifique inférieur puisque, selon le principe de Le Chatelier, le déplacement d'une réaction se fait vers l'état le plus compact ($\Delta V < 0$). Elle a l'avantage considérable de réduire l'agrégation des protéines dénaturées et de permettre ainsi des études précises de la conformation des états dépliés d'un grand nombre de protéines, dans des conditions variées (pH, force ionique, etc.), pour lesquelles les protéines généralement s'agrègent sous l'effet de la température.

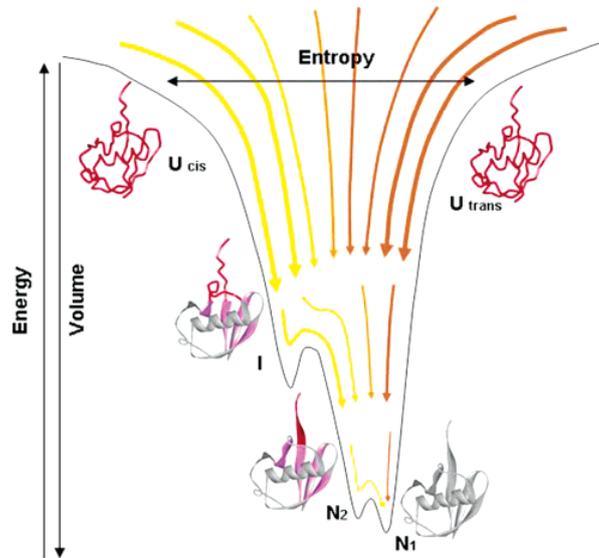


FIGURE 3.4 – Représentation schématique du paysage énergétique du repliement d'une petite protéine globulaire (d'après [62]). Les axes vertical et horizontal représentent, respectivement, le degré de conformation et l'entropie conformationnelle de la chaîne polypeptidique. Selon le « théorème » proposé par Akasaka [62], le volume molaire partiel de la protéine augmente avec son degré de structure. Les états de la protéine sont disposés par ordre décroissant de leur volume molaire partiel : N1 (états natifs, repliés) > N2 (états excités faiblement peuplés, $P \sim 1-3$ kbar) > I (états intermédiaires) > U (états dépliés, P de $\sim 2-3$ kbar à ~ 10 kbar).

De plus, le volume est plus intimement lié à la structure des macromolécules biologiques que l'entropie [61]. La pression permet de « lisser » l'entonnoir (voir Section 3.1) car, ne jouant que sur le volume, c'est la technique la plus « douce » pour déplier une protéine (Fig. 3.4). La pression peut ainsi révéler des états intermédiaires de repliement différents de ceux induits par la température. A pression moyenne ($\sim 1-3$ kbar, où 1 kbar = 100 MPa), on peut avoir accès aux états intermédiaires faiblement peuplés mais qui sont souvent les états actifs des protéines [62, 63] (Fig. 3.4, états N2).

La pression entraîne également la diminution des interactions électrostatiques et hydrophobes, le renforcement des liaisons hydrogène et l'augmentation de l'hydratation [64]. On peut ainsi par exemple utiliser la pression pour diminuer l'affinité d'un ligand pour une protéine pour accéder à sa mesure puis, en extrapolant à pression ambiante, évaluer son affinité réelle.

3.3.2 Développement d'un prototype de cellule haute pression pour le SANS

La pression est très délicate à appliquer techniquement et l'associer à des expériences de SANS ne facilite pas les choses. Ce travail pionnier a été réalisé en collaboration avec des collègues du

LLB : Annie Brûlet, physico-chimiste, et Burkhard Annighöfer, ingénieur expert pour la pression en diffusion de neutrons. Il a été soutenu par le programme européen NMI3¹ pour le développement d'environnements échantillons innovants, ce qui nous a permis de financer un an de post-doctorat (2014-2015) à Alexandre Colas de la Noue.

Les principales méthodes permettant de sonder la structure 3D de protéines sous HP *in situ* sont la RMN [65], la XRC [66] et le SAXS [67]. Cependant, les limitations techniques sont nombreuses : difficulté à fabriquer des cellules résistant à la HP et dont le signal peut être soustrait correctement, pression maximale de 250-300 MPa pour la RMN et la XRC : à ces pressions, on peut localiser les acides aminés impliqués dans la compressibilité au niveau des états intermédiaires.

Nous avons développé le prototype d'une nouvelle cellule HP (Fig. 3.5) en acier très résistant [29] pour faire des mesures SANS *in situ* en choisissant une géométrie plate, ce qui permet de soustraire correctement le signal SANS de la cellule [68]. Nous avons choisi d'utiliser des fenêtres amovibles en alliage métallique, résistantes à la HP et pouvant être changées et adaptées facilement selon l'expérience réalisée. D'autres centres de neutrons ont choisi de développer des cellules avec des fenêtres en saphir, qui ont l'avantage d'être transparentes optiquement et en diffusion de neutrons. Cependant, ces fenêtres ont l'énorme défaut d'être extrêmement fragiles et de fuir ou même de casser très fréquemment lors de la montée en pression [69]. Le prototype construit est transportable pour mener des expériences dans d'autres sources de neutrons et pourra être répliqué si besoin.

Ce travail technique spécifique a été mené pour étudier l'effet de la HP jusqu'à 500-600 MPa (5000-6000 bar) sur la structure 3D en solution de protéines, en particulier de protéines d'intérêt pour l'agro-alimentaire. Il y a un besoin de données structurales car la plupart des études dans ce domaine sont menées à l'échelle macroscopique, comme sur la viande [70]. J'ai pu bénéficier de la collaboration de Camille Loupiac (Agrosup, Dijon), spécialiste de ce domaine scientifique.

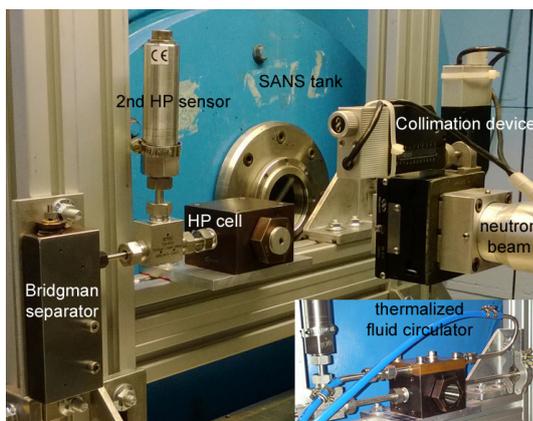


FIGURE 3.5 – Dispositif de la cellule HP installé devant un instrument SANS (PACE) au LLB. La fenêtre d'entrée des neutrons dans le bidon (bleu) se trouve en face du collimateur de neutrons (le faisceau vient de la droite et traverse la cellule quand elle est placée dans l'axe). **Encart** : le même dispositif avec une plaque métallique placée sur le dessus de la cellule permettant sa thermalisation grâce à une circulation de fluide.

Notre premier projet était de montrer la faisabilité de l'utilisation de cette nouvelle cellule HP en étudiant l'effet de ligands sur la stabilité de la myoglobine (Mb), une protéine « modèle » de la viande. Nous avons mesuré l'effet de la HP sur la metmyoglobine² liés à différents ligands : aquométmyoglobine (aquometMb, *i.e.* metMb avec H₂O lié à l'hème), azidométmyoglobine (MbN₃, *i.e.* metMb avec N₃ lié à l'hème) et apo-myoglobine (apoMb, *i.e.* Mb sans son hème).

Nous avons vérifié que nous retrouvons bien un signal identique pour la protéine mesurée dans la cellule HP et dans une cellule en quartz (Hellma), après soustraction des cellules vides (Fig. 3.6,

1. Integrated Infrastructure Initiative for Neutron Scattering and Muon Spectroscopy.
2. Forme oxydée de Mb, caractérisée par l'oxydation du cation de fer ferreux (Fe²⁺) de l'hème en fer ferrique (Fe³⁺) qui donne à la protéine (et à la viande vieillie) une couleur brune.

A). Nous avons observé un changement conformationnel significatif de l'aquometMb au cours de la montée en pression jusqu'à 600 MPa (Fig. 3.6, C), contrairement à MbN₃ qui reste stable jusqu'à 500 MPa (Fig. 3.6, B). C'est la première fois, à notre connaissance, qu'une telle pression a été atteinte dans une mesure SANS.

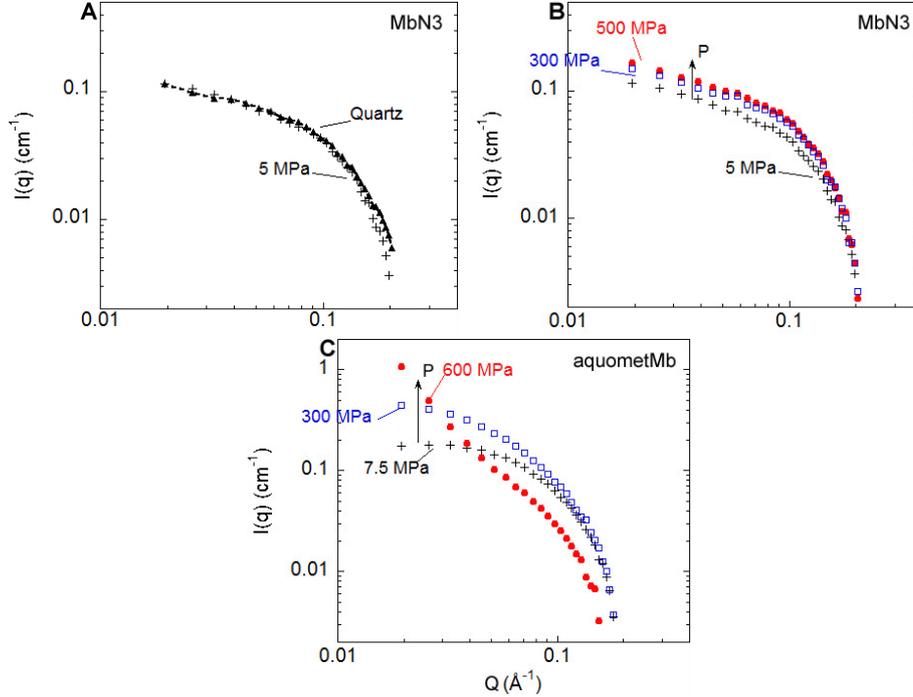


FIGURE 3.6 – Intensités SANS de Mb mesurées dans un tampon 100 mM Tris, pD 6. (A) MbN₃ mesurée à 5 g/L dans une cellule en quartz (Hellma) (triangles noirs) ou dans la cellule HP équipée de fenêtres TiAl6V4 ELI à 50 bars (croix). Les courbes se superposent, ce qui atteste de la bonne soustraction du signal dû à la cellule HP. (B) MbN₃ mesurée à 5 g/L dans la cellule HP à 5 MPa (croix), 300 MPa (carrés bleus) et 500 MPa (points rouges). (C) AquometMb mesurée à 7 g/L dans la cellule HP à 7,5 MPa (croix), 300 MPa (carrés bleus) et 600 MPa (points rouges).

La gamme en Q pour les mesures dans la cellule HP est réduite à 0.02-0.2 \AA^{-1} , à cause de la géométrie de la cellule et parce qu'avec les fenêtres métalliques³ les longueurs d'onde des neutrons doivent être comprises entre 6 et 10 \AA .

3.3.3 Effet de ligands sur la stabilité sous pression de la β -lactoglobuline

J'encadre le projet de post-doctorat de Simeon Minic, depuis septembre 2018, en collaboration avec ma collègue Annie Brûlet. L'objectif est d'étudier l'effet des ligands sur la stabilité sous pression de la β -lactoglobuline (BLG), une protéine globulaire majoritaire du lactosérum (ou petit-lait) et très utilisée dans l'industrie agro-alimentaire. Cette protéine est également très intéressante d'un point de vue plus fondamental car elle possède une cavité hydrophobe qui la rend très sensible au dépliement [71] et qui est capable de lier divers ligands. Nous avons d'abord testé l'effet de deux ligands (ratio molaire 1:1) : le rétinol, ou vitamine A, et le resvératrol, un polyphénol présent en grande quantité dans le raisin.

En solution, la BLG peut être sous forme monomérique ou dimérique. Dans nos conditions d'expérience (tampon 50 mM Tris, pH 7,2), c'est la forme dimérique qui domine (Fig. 3.7).

3. Pour $\lambda < 6 \text{\AA}$, on observe des pics de diffraction et pour $\lambda > 10 \text{\AA}$ apparaît de la diffusion multiple.

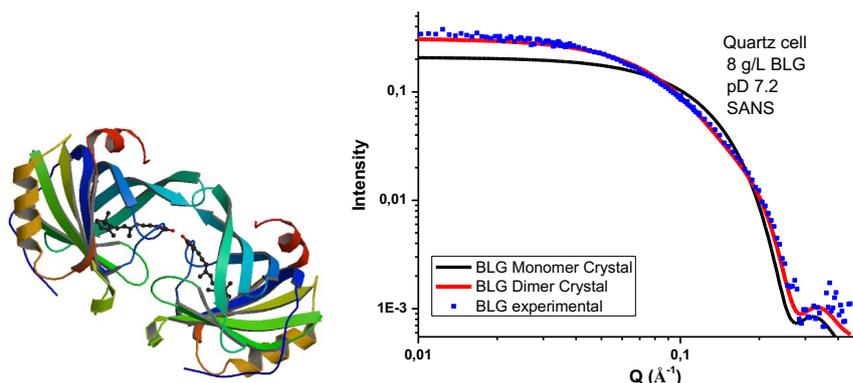


FIGURE 3.7 – *à gauche* Structure cristallographique (1GX8.pdb) du dimère de BLG, en présence de rétinol. *à droite* Courbe SANS expérimentale obtenue dans une cellule en quartz (Hellma) pour la BLG à 8 mg/mL, dans un tampon 50 mM Tris (en 100% D_2O), pD 7,2, et ajustée avec la courbe théorique (rouge) obtenue avec le logiciel CRYSON (ATSAS) pour le dimère. La courbe CRYSON du monomère est montrée en noir.

Les mesures HP-SANS sur la BLG libre en solution montrent que la protéine commence à se déplier à partir de 150 MPa et qu'une pression de 300 MPa induit des changements de structure irréversibles de la protéine, avec une forte augmentation du R_g (qui passe de ~ 22 à ~ 45 \AA) et une agrégation importante (remontée à petits Q) (Fig. 3.8).

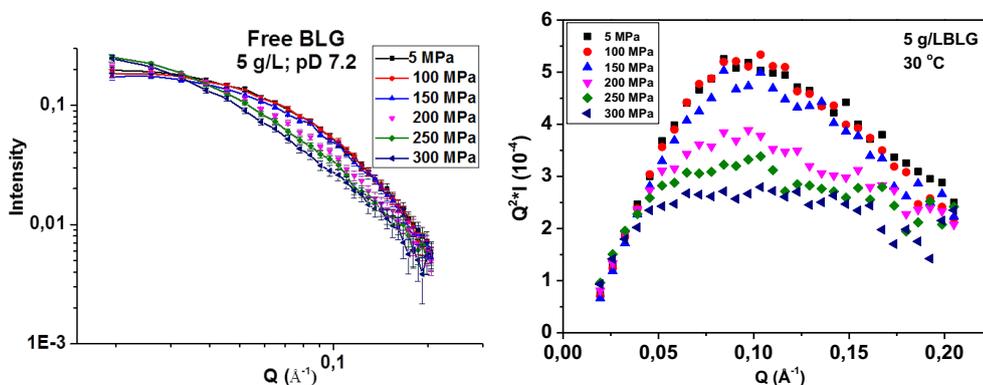


FIGURE 3.8 – *à gauche* Intensités SANS de la BLG libre (sans ligand), mesurée dans la cellule HP à 5 mg/mL, dans 50 mM Tris, pD 7,2, à 30 °C, en fonction de la pression jusqu'à 300 MPa. *à droite* Représentation de Kratky des mêmes courbes.

En présence de ligands, nous observons par HP-SANS que le rétinol stabilise la BLG (Fig. 3.9, gauche, le T_m est augmenté de ~ 25 MPa), alors que le resvératrol n'a pratiquement aucun effet (Fig. 3.9, droite).

Des mesures de la structure locale de la BLG par spectrophotométrie d'absorption ultra-violet (UV) en fonction de la pression ont été réalisées au LLB sur un appareil muni d'une cellule HP que nous a donnée Gaston Hui Bon Hoa (ancien chercheur INSERM).

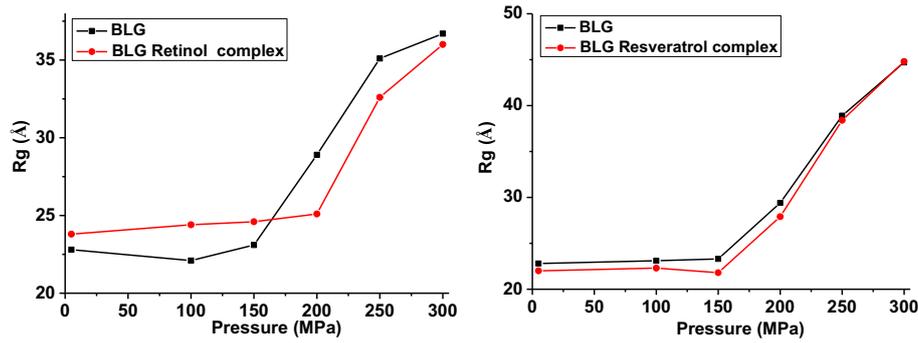


FIGURE 3.9 – Evolution de R_g , d'après les courbes SANS, pour la BLG libre (noir) ou liée au ligand (rouge) en fonction de la pression. *à gauche* Complexe BLG/rétinol (5 mg/mL de BLG, la faible solubilité du rétinol nécessitant de travailler à plus basse concentration protéique). *à droite* Complexe BLG/resvératrol (8 mg/mL de BLG).

Les mesures sont présentées sous la forme de leurs dérivées 4^{èmes} pour faire apparaître les pics correspondant aux changements de pente de l'absorbance des résidus aromatiques, en particulier du tryptophane à ~ 291 nm (Fig. 3.10, droite) [72]. Un fluorimètre équipé d'une cellule pression dédiée est actuellement en cours de remise en fonctionnement au LLB.

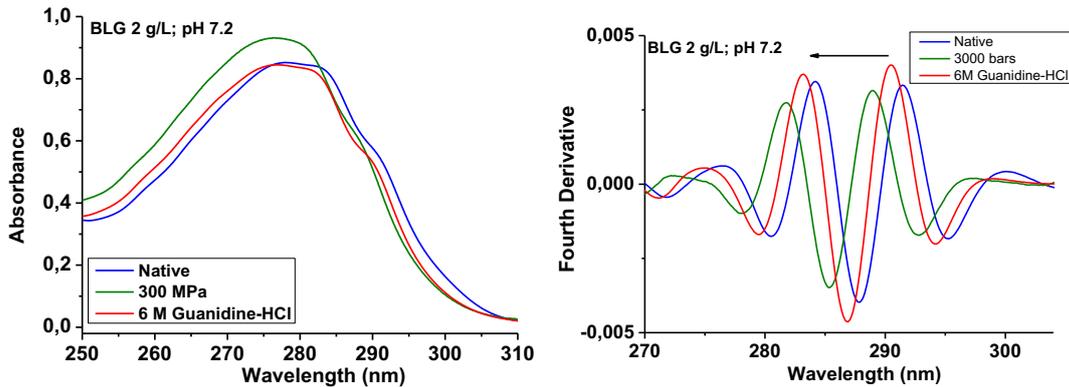


FIGURE 3.10 – *à gauche* Intensités de l'absorbance mesurée par spectrophotométrie UV pour la BLG à 2 mg/mL, en tampon 100 mM Tris, pH 7,2, en condition native (bleu) ou dépliée à 3000 bars (vert) ou en 6 M de chlorure de guanidinium (rouge). *à droite* Les mêmes données mais présentées sous la forme de leurs dérivées 4^{èmes} faisant apparaître plus clairement, notamment au niveau du pic à ~ 291 nm pour les tryptophanes, le changement de pente de l'absorbance des résidus aromatiques.

Par spectrophotométrie d'absorption UV sous HP, nous observons également une stabilisation de la structure locale de la BLG au cours du dépliement sous pression par le rétinol (Fig. 3.11, gauche, le T_m est augmenté de ~ 50 MPa), alors que le dépliement en présence de resvératrol est identique à celui de la protéine libre (Fig. 3.11, droite).

Récemment, nous avons testé un autre ligand, la biliverdine, un pigment de couleur verte issu de la dégradation de l'hème, et observé par SANS que ce ligand réduit fortement l'augmentation de R_g et de $I(0)$ (Fig. 3.12), ce qui peut s'expliquer par les liaisons covalentes de la biliverdine avec les résidus cystéines libres de la BLG [73]. Ce ligand ne se lie pas à la poche hydrophobe de la BLG contrairement aux ligands non covalents comme le rétinol et le resvératrol.

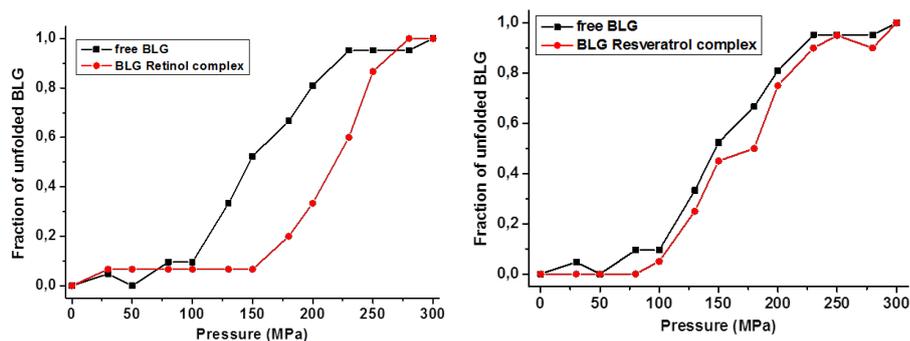


FIGURE 3.11 – Evolution du dépliement local de la BLG (à 2 mg/mL), en prenant la valeur du maximum à $\lambda \simeq 291$ nm des dérivées 4^{èmes} des intensités mesurées par spectrophotométrie d'absorption UV, pour la protéine libre (noir) ou liée au ligand (rouge) en fonction de la pression. Complexes BLG/rétinol (à gauche) et BLG/resvératrol (à droite).

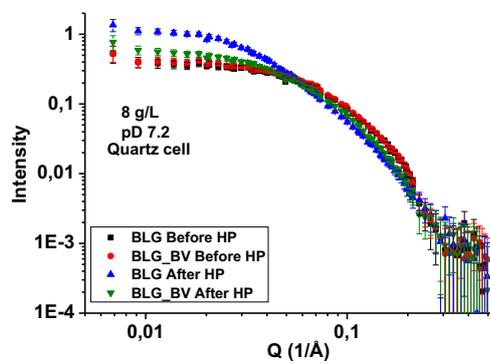


FIGURE 3.12 – Intensités SANS mesurées en cellule de quartz de la BLG libre ou liée à la biliverdine (BV), avant (noir et rouge, respectivement) et après HP (mesures *ex situ* après avoir appliqué 300 MPa) (bleu et vert, respectivement). On observe que la biliverdine réduit l'agrégation sous HP de la BLG, la courbe verte à petits Q étant plus proche de celles mesurées avant HP (rouge et noir) que pour la BLG libre (bleu).

Publication :

[29] Annighöfer B *et al.* *Rev Sci Instr* 90: 025106, 2019.

Publication en préparation :

Minic S, Annighöfer B, Héлары A, Loupiac C, Brûlet* A, Combet* S. Unfolding of β -lactoglobulin by high pressure: effects of ligand binding. En préparation pour *Biophys J*.

Communication orale :

[25] *HP SANS for structural studies of biological macromolecules. A new HP cell with metallic windows.* High pressure and Biology workshop, synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin, 8 octobre, 2019.

Collaboration : Annie Brûlet et Burkhard Annighöfer (LLB).

3.4 Perspectives

Plusieurs perspectives prolongent ce projet sur le dépliement sous pression de protéines. En particulier, nous allons produire d'ici quelques mois la BLG perdeutérée, à partir d'un protocole de BLG recombinante produite chez la levure [74], grâce à un partenariat avec le laboratoire de

deutération⁴ du NIST⁵. L'objectif est de faire des expériences de contraste moyen nul⁶ sur des mélanges de BLG hydrogénée et deutérée (à 84%)⁷ en HP-SANS pour masquer le facteur de structure dû aux interactions entre particules et obtenir uniquement le facteur de forme au cours du dépliement et de l'agrégation sous pression. Cela permettra de mieux comprendre les effets de la HP sur les changements d'hydratation de la BLG⁸.

L'effet de l'encombrement moléculaire sur le dépliement sous HP de protéines serait également une perspective particulièrement intéressante à mener en SANS [75, 76].

Assemblages de protéines végétales induits par la pression

Je décris ici brièvement le projet que j'ai soumis au dernier appel à propositions de l'ANR. Il s'agit d'un projet de recherche fondamental mais en lien avec de possibles applications pour l'industrie agro-alimentaire. La HP est en effet utilisée depuis des années comme procédé industriel de transformation des aliments, permettant de nouvelles applications (texturation, congélation, digestibilité, etc.) [77].

Nous nous intéressons plus particulièrement aux protéines végétales dont l'impact de la HP sur leur structure et leurs propriétés fonctionnelles reste largement méconnu. Parmi les protéines végétales, le cas de la patatine est doublement intéressant. D'une part, la production d'amidon à partir de la pomme de terre génère de grandes quantités de déchets contenant la patatine, qui pourraient être valorisés. D'autre part, la haute valeur nutritionnelle de cette protéine la rend potentiellement intéressante pour l'industrie agro-alimentaire [78].

La patatine est une protéine globulaire de 40 kDa dont la structure (4PK9.pdb) a été déterminée à ~ 2 Å de résolution par XRC [79]. Parmi les procédés de transformation de cette protéine, la HP représente une voie intéressante à explorer, comme le suggèrent des données obtenues *ex situ*, après traitement HP [80, 81]. C'est la raison pour laquelle, en collaboration avec plusieurs collègues, je m'intéresse aux effets de la pression sur la structure de la patatine.

Notre projet est d'étudier, par une approche multi-échelle (locale, conformationnelle 3D et supramoléculaire) et *in situ*, l'effet de la HP sur la structure de la patatine en combinant : (i) la spectrophotométrie d'absorption et la fluorescence pour obtenir des informations sur l'environnement local de la patatine ; (ii) la spectroscopie IR et le CD pour sonder ses structures secondaires ; (iii) le SANS, le SAXS et la RMN pour étudier les changements induits par la HP sur la conformation de cette protéine globulaire, à différentes résolutions.

La RMN permettra d'étudier à haute résolution les premiers effets de la HP, à une pression maximale de ~ 300 MPa. Le HP-SANS (et le HP-SAXS⁹) permettra d'obtenir des informations structurales complémentaires à basse résolution mais jusqu'à ~ 600 MPa. L'ensemble de ces données devrait donner une description complète du paysage de dépliement/repliement par HP de la patatine.

Par ailleurs, nous étudierons la formation contrôlée d'assemblages de la patatine par HP, obtenus par agrégation et/ou fibrillation. Les caractéristiques physiques, chimiques et fonctionnelles (taille, solubilité, propriétés nano-mécaniques, etc.) de ces assemblages seront évaluées (notamment par DLS, AFM, rhéologie, etc.) sur la protéine seule puis en y associant des ingrédients d'intérêt pour l'agro-alimentaire (anti-oxydants, polysaccharides).

Enfin, la cinétique de digestion de la protéine seule et de ces assemblages sera mesurée, en lien avec les effets de structure, par l'action d'enzymes gastriques et intestinales, comme cela a été réalisé de façon originale par SANS récemment au LLB [82]. Ces données structurales et ces propriétés fonctionnelles, y compris digestive, permettront de proposer des procédés HP innovants pour produire des aliments à haute valeur nutritionnelle issus de protéines végétales comme la patatine.

4. Bio-isotope Labelling Laboratory (BL2).

5. National Institute of Standards and Technology, situé près de Washington (USA).

6. « Zero Average Contrast » (ZAC) en anglais.

7. Les SLD de la BLG hydrogénée et deutérée à 84% sont de 2.37 et $6,33 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, respectivement.

8. En supposant que la condition de contraste moyen nul trouvée sur la BLG dépliée et donc davantage hydratée ne soit pas différente de celle de la BLG native.

9. Le HP-SAXS est utilisé notamment à l'ESRF et est en cours de développement sur la ligne SWING de SOLEIL.

Collaborations : Burkhard Annighöfer, Annie Brûlet et François Boué (LLB), Stéphanie Finet (IMPMC, Paris), Christian Roumestand et Nathalie Sibille (CBS, Montpellier), Laetitia Picart-Palmade et Dominique Chevalier-Lucia (IATE, Montpellier), Ali Assifaoui, Camille Loupiac et Adrien Lerbret (Agrosup, Dijon), Susana Teixeira (University of Delaware & NIST, USA), Aurélien Thureau (SOLEIL, Saint-Aubin).

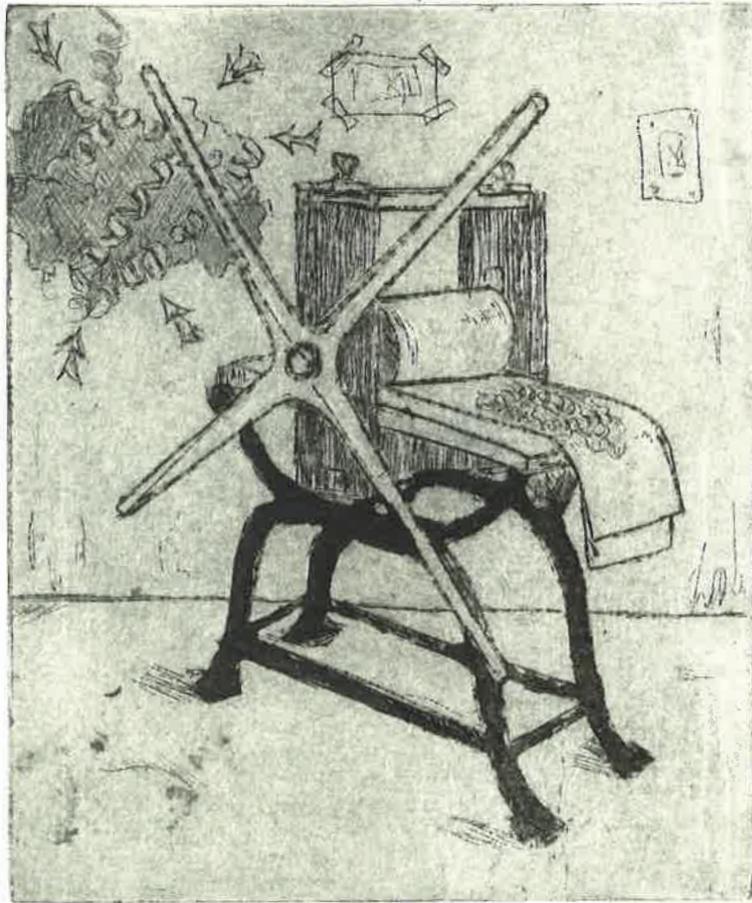
3.5 Résumé

Le SANS, associé aux méthodes de deutération sélective et de variation de contraste, est une technique unique pour masquer des concentrations très fortes d'objets, comme des molécules mimant l'encombrement cytoplasmique, et sonder des protéines d'intérêt peu concentrées. J'ai montré, en couplant CD et SANS, que le TMAO, un petit osmolyte, stabilise à forte concentration le dépliement des hélices α et de la structure tertiaire de la myoglobine au cours de la dénaturation thermique, en présence d'une concentration sous-dénaturante d'urée.

Après avoir développé un nouveau prototype de cellule HP permettant des mesures de SANS *in situ* de protéines sous pression, j'ai étudié l'effet de ligands sur la stabilité des structures de la myoglobine et de la β -lactoglobuline (BLG), deux protéines d'intérêt pour l'agro-alimentaire. Le rétinol stabilise la BLG au cours du dépliement sous pression, contrairement au resvératrol, à la fois au niveau des résidus aromatiques et de la conformation tridimensionnelle de la protéine.

Contrairement à ces ligands qui se lient à la poche hydrophobe de la BLG, la biliverdine se lie de façon covalente aux résidus cystéines accessibles de la protéine. J'ai le projet d'étudier le mécanisme d'action sur la structure de la BLG sous pression de ce ligand qui, d'après les premières mesures, limite fortement l'agrégation de la protéine.

J'ai également développé un projet de deutération de la BLG pour sonder les effets de la HP sur l'hydratation de la protéine. Enfin, j'ai déposé, en tant que porteur, un projet d'ANR pour étudier, par une approche multi-échelle et *in situ*, l'effet de la HP sur les propriétés structurales et fonctionnelles d'assemblages de la patatine, une protéine issue de la pomme de terre.



Protéines sous la presse à gravure.

Chapitre 4

Conclusion générale

Le SANS est une technique peu utilisée en biologie où, pourtant, associée aux méthodes de deutération sélective et de variation de contraste, elle peut se révéler incontournable pour répondre à certaines problématiques de détermination de la structure en solution de protéines. Il en est de même pour la réflectivité de neutrons qui permet d'obtenir, perpendiculairement à la surface, des informations clés sur des interactions protéines/lipides. J'espère avoir réussi à brosser ici quelques exemples de leur utilisation, en détaillant les projets que j'ai menés avec ces techniques ces dernières années, et que j'ai regroupés en deux thématiques principales : la structure de protéines en interaction avec un partenaire, au sein d'assemblages, et la structure de protéines dans des environnements complexes, car encombrés ou sous pression. J'ai conclu chacune de ces parties par les perspectives scientifiques que j'envisage.

Cette fin d'année 2019 a été particulière pour notre laboratoire puisqu'elle a vu l'arrêt d'Orphée, la source de neutrons nationale associée au LLB. La fédération française de diffusion neutronique (2FDN) a été créée pour faire face aux défis liés au bouleversement du paysage français et européen en science neutronique, avec notamment l'objectif d'offrir du temps de faisceau aux laboratoires français grâce à des instruments implantés dans d'autres sources de neutrons, sous la forme de CRG¹, en particulier concernant le SANS : (*i*) l'implantation d'un instrument récent du LLB (PA20) en 2020-2021 au PSI (la source nationale de neutrons en Suisse) ; (*ii*) le projet de construction d'un nouvel appareil de SANS à l'ILL à Grenoble. Je ferai partie d'une équipe « tournante » de chercheurs du LLB qui sera mise en place à partir de 2021 pour assurer l'accueil des utilisateurs des laboratoires français qui auront accès à ~50% du temps de faisceau sur ces instruments.

Je suis également utilisatrice de temps de faisceau dans deux sources de neutrons européennes, l'ILL et le MLZ à Munich. J'ai développé récemment une nouvelle collaboration avec le NIST (USA) pour la deutération protéique et des mesures de HP-SANS. En 2023, la nouvelle source européenne à spallation (ESS) devrait démarrer à Lund, en Suède, avec notamment SKADI, un appareil de SANS qui aura des performances inégalées.

Enfin, je me suis formée à la technique complémentaire de SAXS, grâce à l'appareil de SAXS de laboratoire acquis par le LLB il y a environ deux ans. Un article sur des résultats obtenus en collaboration sur cet appareil est en cours de publication [31]. J'utilise aussi le SEC-SAXS sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL.

J'ai écrit que je travaille à l'interface biologie-physique mais cette interface est très floue : je suis considérée comme une « biologiste » au LLB, alors que je collabore avec, de mon point de vue, des « biologistes » qui se nomment pourtant eux-mêmes « biophysiciens ». Dans ce domaine interdisciplinaire, chacun est le « biologiste » de quelqu'un et peut, même muni de neutrons, écrire quelques lignes du « discours de la vie ».

1. Collaborative Research Group instruments.



Rubans d'ADN ou d'hélice α ou d'autre chose!

Références

- [1] B. L. De Groot and H. Grubmüller. Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science (80-.)*, 294(5550):2353–2357, 2001.
- [2] K. Wood, M. Plazenet, F. Gabel, B. Kessler, D. Oesterhelt, D. J. Tobias, G. Zaccai, and M. Weik. Coupling of protein and hydration-water dynamics in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(46):18049–18054, 2007.
- [3] K. Wood, A. Paciaroni, M. Moulin, D. J. Tobias, and M. Weik. Coincidence of dynamical transitions in a soluble protein and its hydration-water: direct measurements by neutron scattering and MD simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:4586–4787, 2008.
- [4] K. Wood, D. J. Tobias, B. Kessler, F. Gabel, D. Oesterhelt, F. A. A. Mulder, G. Zaccai, and M. Weik. The low-temperature inflection observed in neutron scattering measurements of proteins is due to methyl rotation: Direct evidence using isotope labeling and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(14):4990–4991, 2010.
- [5] J.-M. Zanotti, G. Gibrat, and M.-C. Bellissent-Funel. Hydration water rotational motion as a source of configurational entropy driving protein dynamics. Crossovers at 150 and 220 K. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10(32):4865, 2008.
- [6] C. Soto. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4(1):49–60, 2003.
- [7] F. Gabel. Small-Angle Neutron Scattering for Structural Biology of Protein-RNA Complexes. *Methods Enzymol.*, 558:391–415, 2015.
- [8] J.-P. Cotton. Variations on contrast in SANS: Determination of self and distinct correlation functions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 69(1-3):1–29, 1996.
- [9] L. A. Clifton, C. Neylon, and J. H. Lakey. Examining protein-lipid complexes using neutron scattering Part II. In *Lipid-protein Interact. Methods Protoc.*, pages 119–150. 2013.
- [10] B. Jacrot. The study of biological structures by neutron scattering from solution. *Rep. Prog. Phys.*, 3(156):911–953, 1976.
- [11] D. Franke, M. V. Petoukhov, P. V. Konarev, A. Panjkovich, A. Tuukkanen, H. D.T. Mertens, A. G. Kikhney, N. R. Hajizadeh, J. M. Franklin, C. M. Jeffries, and D. I. Svergun. ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.*, 50:1212–1225, 2017.
- [12] J. Hennig, C. Militti, G. M. Popowicz, I. Wang, M. Sonntag, A. Geerlof, F. Gabel, F. Gebauer, and M. Sattler. Structural basis for the assembly of the sxlunr translation regulatory complex. *Nature*, 515:287–290, 2014.
- [13] C. M. Jeffries, M. A. Graewert, C. E. Blanchet, D. B. Langley, A. E. Whitten, and D. I. Svergun. Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. *Nat. Protoc.*, 11(11):2122–2153, 2016.
- [14] G. David and J. Pérez. Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *J. Appl. Crystallogr.*, 42(5):892–900, 2009.
- [15] A. Jordan, M. Jacques, C. Merrick, J. Devos, V. T. Forsyth, L. Porcar, and A. Martel. SEC-SANS: size exclusion chromatography combined in situ with small-angle neutron scattering. *J. Appl. Crystallogr.*, 49(6):2015–2020, 2016.

- [16] B. N. Manjula, A. Tsai, R. Upadhya, K. Perumalsamy, P. K. Smith, A. Malavalli, K. Vandegriff, R. M. Winslow, M. Intaglietta, M. Prabhakaran, J. M. Friedman, and A. S. Acharya. Site-specific PEGylation of hemoglobin at Cys-93(β): Correlation between the colligative properties of the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. *Bioconjug. Chem.*, 14(2):464–472, 2003.
- [17] J.-J. Lacapère. Membrane protein structure and function characterisation: methods and protocols. In *Methods Mol. Biol. vol. 1635*. Springer Science, Humana Press, 2017.
- [18] O. Delalande, A. E. Molza, R. Dos Santos Morais, A. Chéron, E. Pollet, C. Raguènes-Nicol, C. Tascon, E. Giudice, M. Guilbaud, A. Nicolas, A. Bondon, F. Leturcq, N. Férey, M. Baaden, J. Perez, P. Roblin, F. Piétri-Rouxel, J.-F. Hubert, M. Czjzek, and E. Le Rumeur. Dystrophin’s central domain forms a complex filament that becomes disorganized by in-frame deletions. *J. Biol. Chem.*, 293(18):6637–6646, 2018.
- [19] B. Legrand, E. Giudice, A. Nicolas, O. Delalande, and E. Le Rumeur. Computational study of the human dystrophin repeats: interaction properties and molecular dynamics. *PLoS One*, 6(8):e23819, 2011.
- [20] S. Legardinier, C. Raguènes-Nicol, C. Tascon, C. Rocher, S. Hardy, J.-F. Hubert, and E. Le Rumeur. Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J. Mol. Biol.*, 389(3):546–558, 2009.
- [21] J. Zhao, K. Kodippili, Y. Yue, C. H. Hakim, L. Wasala, X. Pan, K. Zhang, N. N. Yang, D. Duan, and Y. Lai. Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Hum. Mol. Genet.*, 25(17):3647–3653, 2016.
- [22] J. R. Chamberlain and J. S. Chamberlain. Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, 25(5):1125–1131, 2017.
- [23] J. Sarkis, V. Vié, S. J. Winder, A. Renault, E. Le Rumeur, and J.-F. Hubert. Resisting sarcolemmal rupture: dystrophin repeats increase membrane-actin stiffness. *FASEB J.*, 27(1):359–367, 2013.
- [24] S. Maric, N. Skar-Gislinge, S. Midtgaard, M. B. Thygesen, J. Schiller, H. Frielinghaus, M. Moulin, M. Haertlein, V. T. Forsyth, T. G. Pomorski, and L. Arleth. Stealth carriers for low-resolution structure determination of membrane proteins in solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 70(Pt 2):317–328, 2014.
- [25] O. Delalande, N. Férey, G. Grasseau, and M. Baaden. Complex molecular assemblies at hand via interactive simulations. *J. Comput. Chem.*, 30(15):2375–2387, 2009.
- [26] A. Nelson. Co-refinement of multiple-contrast neutron/X-ray reflectivity data using MOTO-FIT. *J. Appl. Crystallogr.*, 39(2):273–276, 2006.
- [27] V. Vié, S. Legardinier, L. Chieze, O. Le Bihan, Y. Qin, J. Sarkis, J.-F. Hubert, A. Renault, B. Desbat, and E. Le Rumeur. Specific anchoring modes of two distinct dystrophin rod subdomains interacting in phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1798(8):1503–1511, 2010.
- [28] J. Sarkis, J.-F. Hubert, B. Legrand, E. Robert, A. Chéron, J. Jardin, E. Hitti, E. Le Rumeur, and V. Vié. Spectrin-like repeats 11-15 of human dystrophin show adaptations to a lipidic environment. *J. Biol. Chem.*, 286(35):30481–30491, 2011.
- [29] R. A. Campbell, Y. Saaka, Y. Shao, Y. Gerelli, R. Cubitt, E. Nazaruk, D. Matyszewska, and M. J. Lawrence. Structure of surfactant and phospholipid monolayers at the air/water interface modeled from neutron reflectivity data. *J. Colloid Interface Sci.*, 531:98–108, 2018.
- [30] J. Collinge. Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases. *Nature*, 539(7628):217–226, 2016.
- [31] M. K. Sandberg, H. Al-Doujaily, B. Sharps, A. R. Clarke, and J. Collinge. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature*, 470(7335):540–542, 2011.

- [32] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, and C. G. Glabe. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science (80-.)*, 300(5618):486–489, 2003.
- [33] J. Luo, N. L. Solimini, and S. J. Elledge. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, 136(5):823–837, 2009.
- [34] V. Ropars, P. Drevet, P. Legrand, S. Bacconnais, J. Amram, G. Faure, J. A. Márquez, O. Piétrement, R. Guerois, I. Callebaut, E. Le Cam, P. Revy, J.-P. De Villartay, and J.-B. Charbonnier. Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(31):12663–12668, 2011.
- [35] C. Nemoz, V. Ropars, P. Frit, A. Gontier, P. Drevet, J. Yu, R. Guerois, A. Pitois, A. Comte, C. Delteil, N. Barboule, P. Legrand, S. Bacconnais, Y. Yin, S. Tadi, E. Barbet-Massin, I. Berger, E. Le Cam, M. Modesti, E. Rothenberg, P. Calsou, and J.-B. Charbonnier. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 25(10):971–980, 2018.
- [36] S. N. Andres, M. J. Schellenberg, B. D. Wallace, P. Tumbale, and R. S. Williams. Review Article. *Environ. Mol. Mutagen.*, 56:1:21, 2015.
- [37] L. Jaremko. Structure of the Mitochondrial. *Science (80-.)*, 343:1363–1367, 2014.
- [38] S. Murail, J.-C. Robert, Y. M. Coïc, J.-M. Neumann, M. A. Ostuni, Z. X. Yao, V. Papadopoulos, N. Jamin, and J.-J. Lacapère. Secondary and tertiary structures of the transmembrane domains of the translocator protein TSPO determined by NMR. Stabilization of the TSPO tertiary fold upon ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1778(6):1375–1381, 2008.
- [39] Y. Guo, R. C. Kalathur, Q. Liu, B. Kloss, R. Bruni, C. Ginter, E. Kloppmann, B. Rost, and W. A. Hendrickson. Structure and activity of tryptophan-rich TSPO proteins. *Science (80-.)*, 347(6221):551–555, 2015.
- [40] M. Marchi. A first principle particle mesh method for solution SAXS of large bio-molecular systems. *J. Chem. Phys.*, 145:045101, 2016.
- [41] E. Karakas, C. Taveneau, S. Bressanelli, M. Marchi, B. Robert, and S. Abel. Derivation of original RESP atomic partial charges for MD simulations of the LDAO surfactant with AMBER: applications to a model of micelle and a fragment of the lipid kinase PI4KA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 35(1):159–181, 2017.
- [42] E. S. Salnikov and B. Bechinger. Lipid-controlled peptide topology and interactions in bilayers: Structural insights into the synergistic enhancement of the antimicrobial activities of pglA and magainin 2. *Biophys. J.*, 100(6):1473–1480, 2011.
- [43] B. Bechinger and E. S. Salnikov. The membrane interactions of antimicrobial peptides revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*, 165(3):282–301, 2012.
- [44] B. Bechinger. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1462(1-2):157–183, 1999.
- [45] J. Zerweck, E. Strandberg, O. Kukhareno, J. Reichert, J. Bürck, P. Wadhwani, and A. S. Ulrich. Molecular mechanism of synergy between the antimicrobial peptides PGLA and magainin 2. *Sci. Rep.*, 7(1):1–21, 2017.
- [46] T. C. B. Vogt and B. Bechinger. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH. *J. Biol. Chem.*, 274(41):29115–29121, 1999.
- [47] K. Matsuzaki, M. Harada, S. Funakoshi, N. Fujii, and K. Miyajima. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *BBA - Biomembr.*, 1063(1):162–170, 1991.

- [48] D. Ciumac, R. A. Campbell, H. Xu, L. A. Clifton, A. V. Hughes, J. R. P. Webster, and J. R. Lu. Implications of lipid monolayer charge characteristics on their selective interactions with a short antimicrobial peptide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 150:308–316, 2017.
- [49] C. Levinthal. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.*, 65:44–45, 1968.
- [50] K. A. Dill. Polymer principles and protein folding. *Protein Sci.*, 8(6):1166–1180, 1999.
- [51] H.-X. Zhou, G. Rivas, and A. P. Minton. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.*, 37:375–397, 2008.
- [52] R. J. Ellis. Macromolecular crowding : obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.*, 26(10):597–604, 2001.
- [53] A. P. Minton. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J. Biol. Chem.*, 276(14):10577–10580, 2001.
- [54] H. S. Frank and F. Franks. Structural Approach to the Solvent Power of Water for Hydrocarbons; Urea as a Structure Breaker. *J. Chem. Phys.*, 48(10):4746–4757, 1968.
- [55] D. R. Canchi, D. Paschek, and A. E. Garcia. Equilibrium study of protein denaturation by urea. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(7):2338–2344, 2010.
- [56] S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, and D. Thirumalai. Entropic stabilization of proteins by TMAO. *J. Phys. Chem. B*, 115(45):13401–13407, 2011.
- [57] J. Ma, I. M. Pazos, and F. Gai. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(23):8476–81, 2014.
- [58] L. L. Lee and J. C. Lee. Thermal Stability of Proteins in the Presence of Poly (ethylene glycols). *Biochemistry*, 26(1981):7813–7819, 1987.
- [59] D. W. Bolen and I. V. Baskakov. The osmophobic effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.*, 310(5):955–963, 2001.
- [60] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, and K. P. Murphy. The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(7):1192–1202, 2002.
- [61] R. Fourme, E. Girard, and K. Akasaka. High-pressure macromolecular crystallography and NMR: Status, achievements and prospects. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 22(5):636–642, 2012.
- [62] K. Akasaka. Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation. *Chem. Rev.*, 106(5):1814–1835, may 2006.
- [63] K. Akasaka, R. Kitahara, and Y. O. Kamatari. Exploring the folding energy landscape with pressure. *Arch. Biochem. Biophys.*, 531(1-2):110–115, 2013.
- [64] T. Q. Luong, S. Kapoor, and R. Winter. Pressure - A Gateway to Fundamental Insights into Protein Solvation, Dynamics, and Function. *ChemPhysChem*, 16(17):3555–3571, 2015.
- [65] J. Roche, C. A. Royer, and C. Roumestand. Monitoring protein folding through high pressure NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 102-103:15–31, 2017.
- [66] N. Colloc'h, S. Sacquin-Mora, G. Avella, A.-C. Dhaussy, T. Prangé, B. Vallone, and E. Girard. Determinants of neuroglobin plasticity highlighted by joint coarse-grained simulations and high pressure crystallography. *Sci. Rep.*, 7(1):1–10, 2017.
- [67] E. Rosenbaum, F. Gabel, M. As. Durá, S. Finet, C. Cléry-Barraud, P. Masson, and B. Franzetti. Effects of hydrostatic pressure on the quaternary structure and enzymatic activity of a large peptidase complex from *Pyrococcus horikoshii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 517(2):104–110, 2012.
- [68] A. Brûlet, D. Lairez, A. Lapp, and J.-P. Cotton. Improvement of data treatment in small-angle neutron scattering. *J. Appl. Crystallogr.*, 40:165–177, 2007.
- [69] J. Kohlbrecher, A. Bollhalder, R. Vavrin, and G. Meier. A high pressure cell for small angle neutron scattering up to 500 MPa in combination with light scattering to investigate liquid samples. *Rev. Sci. Instrum.*, 78:125101–125106, 2007.

-
- [70] K. H. Bak, G. Lindahl, A. H. Karlsson, E. Lloret, G. Ferrini, J. Arnau, and V. Orlien. High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Sci.*, 90(3):690–696, 2012.
- [71] L. Domínguez-Ramírez, E. Del Moral-Ramírez, P. Cortes-Hernández, M. G. Garibay, and J. Jiménez-Guzmán. β -lactoglobulin’s conformational requirements for ligand binding at the calyx and the dimer interphase: A flexible docking study. *PLoS One*, 8(11):1–13, 2013.
- [72] R. Lange and C. Balny. UV-visible derivative spectroscopy under high pressure. *Biochem. Biophys. Acta*, 1595:80–93, 2002.
- [73] T. Lamparter, M. Carrascal, N. Michael, E. Martinez, G. Rottwinkel, and J. Abian. The Biliverdin Chromophore Binds Covalently to a Conserved Cysteine Residue in the N-Terminus of Agrobacterium Phytochrome Agp1. *Biochemistry*, 43(12):3659–3669, 2004.
- [74] K. K. Fox, V. H. Holsinger, L. P. Posati, and M. J. Pallansch. Separation of beta-lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloroacetic acid. *J. Dairy Sci.*, 50(9):1363–1367, 1967.
- [75] G. Hui-Bon-Hoa, S. G. Kruglik, and M.-C. Maurel. Impacts of the Extreme Conditions of Environments on RNA’s structure and function from the Avocado Sunblotch Viroid : Application of NIR-Raman Spectroscopy and ad hoc Baro-Bio-Reactor. *Acta Sci. Microbiol.*, 2(9):167–184, 2019.
- [76] M. Erlkamp, J. Marion, N. Martinez, C. Czeslik, J. Peters, and R. Winter. Influence of Pressure and Crowding on the Sub-Nanosecond Dynamics of Globular Proteins. *J. Phys. Chem. B*, 119(14):4842–4848, 2015.
- [77] L. Pottier, G. Villamonte, and M. de Lamballerie. Applications of high pressure for healthier foods. *Curr. Opin. Food Sci.*, 16:21–27, 2017.
- [78] M. Friedman. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 44(1):6–29, 1996.
- [79] S. J. Wijeyesakere, R. J. Richardson, and J. A. Stuckey. Crystal structure of Patatin-17 in complex with aged and non-aged organophosphorus compounds. *PLoS One*, 9(9):108245, 2014.
- [80] A. K. Baier and D. Knorr. Influence of high isostatic pressure on structural and functional characteristics of potato protein. *Food Res. Int.*, 77:753–761, 2015.
- [81] R. Elahi and T.-H. Mu. High hydrostatic pressure-induced structural modification of patatin and its antioxidant activities. *Molecules*, 22:438, 2017.
- [82] J. Pasquier, A. Brûlet, A. Boire, F. Jamme, J. Perez, T. Bizien, E. Lutton, and F. Boué. Monitoring food structure during digestion using small-angle scattering and imaging techniques. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 570:96–106, jun 2019.

Annexes

Sophie COMBET

Chercheuse à l'interface Biologie-Physique

Née le 1^{er} mai 1973 à Annecy, Haute-Savoie
Nationalité française
Mariée, trois enfants (nés en 2002, 2005 et 2009)

Laboratoire Léon-Brillouin UMR 12 CEA-CNRS
CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette CEDEX, France
01 69 08 67 20 - 06 77 81 10 08
sophie.combet@cea.fr
Facteur *h* : 14 (Scholar)
<http://iramis.cea.fr/Pisp/sophie.combet/>

Formation :

- 2001 : **Doctorat en Biophysique Moléculaire** de l'Université Paris 6. *Rôle des aquaporines et de l'oxyde nitrique dans la physiopathologie du rein et du péritoine. Doctorat en Sciences Biomédicales* de l'Université catholique de Louvain (UCL), Belgique. *Molecular mechanisms of peritoneal permeability: interaction between nitric oxide and the water channel aquaporin-1.*
- 1997 : **DEA de Biophysique Moléculaire** de l'Université Paris 6 et de l'Ecole Centrale de Paris. **Diplôme d'ingénieur civil des Mines** de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- 1994-1997 : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, troisième année (option bio-ingénierie) à l'Ecole Centrale de Paris.
- 1991-1994 : CPGE de Mathématiques Supérieures et Mathématiques Spéciales option P' (Physique-Chimie), Lycée Berthollet, Annecy.
- 1991 : Baccalauréat C, mention très bien, Lycée Berthollet, Annecy.

Expérience professionnelle :

- Depuis 2002 : Laboratoire Léon-Brillouin (UMR 12 CEA-CNRS), Saclay. **Chargée de Recherches** (CRCN) au CNRS.
- 2002 (5 mois) : Institut Curie, Service de Biologie Cellulaire de l'Immunité Anti-Tumorale (INSERM U520), Paris. **Post-doctorante**.
- 1997-2001 : Service de Biologie Cellulaire, CEA, Saclay, et Laboratoire de Néphrologie, Faculté de Médecine de l'UCL, Bruxelles, Belgique. **Doctorante**.
- 1997 (4 mois) : Service de Biologie Cellulaire, CEA, Saclay. **Stagiaire** de DEA et de troisième année d'école d'ingénieurs.
- 1996 (2 mois) : Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette. **Stagiaire** de deuxième année d'école d'ingénieurs.

Publications

Mes résultats scientifiques ont donné lieu à **33 publications** dont 29 dans des revues à comité de lecture.

Thèses

1. **Combet S.** Molecular mechanisms of peritoneal permeability: interaction between nitric oxide and the water channel aquaporin-1. *PhD thesis, Université catholique de Louvain, Belgique*, 20 avril 2001.
2. **Combet S.** Rôle des aquaporines et de l'oxyde nitrique dans la physiopathologie du rein et du péritoine. *PhD thesis, Université Paris 6*, 27 septembre 2001.

Articles dans des revues à comité de lecture

3. Goffin E, **Combet S**, Jamar F, Cosyns JP, Devuyst O. Expression of aquaporin-1 in a long-term peritoneal dialysis patient with impaired transcellular water transport. *Am J Kidney Dis*, 33: 383-398, 1999.
4. **Combet S**, van Landschoot M, Moulin P, Piech A, Verbavatz JM, Goffin E, Balligand JL, Lameire N, Devuyst O. Regulation of aquaporin-1 and nitric oxide synthase isoforms in a rat model of acute peritonitis. *J Am Soc Nephrol*, 10: 2185-2196, 1999.
5. **Combet S**, Balligand JL, Lameire N, Goffin E, Devuyst O. A specific method for measurement of nitric oxide synthase enzymatic activity in peritoneal biopsies. *Kidney Int* 57: 332-338, 2000.
6. **Combet S**, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 11: 717-728, 2000.
7. Devuyst O, **Combet S**, Cnops Y, Stoeniou M. Regulation of NO synthase isoforms in the peritoneum: implications for ultrafiltration failure in peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 16: 675-678, 2001.
8. **Combet S**, Ferrier ML, van Landschoot M, Moulin P, Stoeniou M, Moulin P, Miyata T, Lameire N, Devuyst O. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 12: 2146-2157, 2001.
9. **Combet S**, Teillet L, Geelen G, Pitrat B, Gobin R, Nielsen S, Trinh-Trang-Tan MM, Corman B, Verbavatz JM. Food restriction prevents age-related polyuria by vasopressin-dependent recruitment of aquaporin-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F1123-F1131, 2001.
10. Ferrier ML, **Combet S**, van Landschoot M, Stoeniou M, Cnops Y, Lameire N, Devuyst O. Inhibition of nitric oxide synthase reverses changes in peritoneal permeability in a rat model of acute peritonitis. *Kidney Int* 60: 2343-2350, 2001.
11. **Combet S**, Geffroy N, Berthonaud V, Dick B, Teillet L, Verbavatz JM, Corman B, Trinh-Trang-Tan MM. Correction of age-related polyuria by dDAVP: molecular analysis of aquaporins and urea transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F199-F208, 2003.
12. Köper I, **Combet S**, Petry W, Bellissent-Funel MC. Dynamics of C-phycoerythrin in various deuterated trehalose/water environments measured by quasielastic and elastic neutron scattering. *Eur Biophys J* 37: 739-748, 2008.
13. **Combet S**, Gouraud S, Gobin R, Berthonaud V, Geelen G, Corman B, Verbavatz JM. Aquaporin-2 downregulation in the medulla of aging rats is posttranscriptional and can be corrected by dehydration. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1408-F1414, 2008.
14. **Combet S**, Pieper J, Coneggo F, Ambroise JP, Bellissent-Funel MC, Zanotti JM. Coupling of laser excitation and inelastic neutron scattering: attempt to probe light-induced dynamics of C-phycoerythrin. *Eur Biophys J* 37: 693-700, 2008.

15. **Combet S**, Zanotti JM, Bellissent-Funel MC. Temperature- and hydration-dependent internal dynamics of stripped human erythrocyte vesicles studied by incoherent neutron scattering. *Biochim Biophys Acta-General Subjects* 1810: 202-210, 2011.
16. Cousin F, Gummel J, **Combet S**, Boué F. The model Lysozyme-PSSNa system for electrostatic complexation: similarities and differences with complex coacervation. *Advances in Colloid and Interface Science* 167: 71-84, 2011.
17. Zanotti JM, **Combet S**, Klimko S, Longeville S, Coneggo F. Present and future of the quasi-elastic neutron spectroscopy at LLB. More than simply samples: devices. *Neutron News* 22: 24-27, 2011.
18. **Combet S**, Zanotti JM. Further evidence that hydration water is the main « driving force » of protein dynamics: a neutron scattering study on perdeuterated C-phycoerythrin. *Phys Chem Chem Phys* 14: 4927-4934, 2012.
19. Koutsioubas A, Lairez D, **Combet S**, Fadda GC, Longeville S, Zalczer G. Crowding effects on helix-coil transition: beyond entropic stabilization. *J Chem Phys* 136, 215101-7, 2012.
20. Drappier C, Oliveira H, Sandre O, Ibarboure E, **Combet S**, Garanger E, Lecommandoux S. Self-assembled core-shell micelles from peptide-b-polymer molecular chimeras towards structure-activity relationships. *Faraday Disc* 166, 83-100, 2013.
21. Le Coeur C, **Combet S**, Carrot G, Busch P, Teixeira J, Longeville S. Conformation of the polyethylene glycol chains in diPEGylated hemoglobin specifically probed by SANS: correlation with PEG length and in vivo efficiency. *Langmuir* 31: 8402-8410, 2015.
22. Spinozzi F, Ceccone G, Moretti P, Campanella G, Ferrero C, **Combet S**, Ojea-Jimenez I, Ghigna P. Structural and thermodynamic properties of nanoparticle-protein complexes: a combined SAXS and SANS study. *Langmuir* 33: 2248-2256, 2017.
23. Golub M, **Combet S**, Wieland DCF, Soloviov D, Kuklin A, Lokstein H, Schmitt FJ, Olliges R, Hecht M, Eckert HJ, Pieper J. Solution structure and excitation energy transfer in phycobiliproteins of *Acaryochloris marina* investigated by small angle scattering. *Biochim Biophys Acta* 1858: 318-324, 2017.
24. Dos Santos Morais R, Delalande O, Pérez J, Mouret L, Bondon A, Martel A, Appavou MS, Le Rumeur E, Hubert JF, **Combet S**. Contrast-matched isotropic bicelles: a versatile tool to specifically probe the solution structure of peripheral membrane proteins using SANS. *Langmuir* 33: 6572-6580, 2017.
25. Chen J, Chevreuil M, **Combet S**, Lansac Y, Tresset G. Investigating the thermal dissociation of viral capsid by lattice model. *J Phys Condens Matter* 29 : 474001, 2017.
26. Chevreuil M, Law-Hine D, Chen J, Bressanelli S, **Combet S**, Constantin D, Degrouard J, Möller J, Zeghal M, Tresset G. Nonequilibrium self-assembly dynamics of icosahedral viral capsids packaging genome or polyelectrolyte. *Nature Comm* 9: 3071, 2018.
27. Dos Santos Morais R, Delalande O, Pérez J, Mias-Lucquin D, Lagarrigue M, Martel A, Molza AE, Chéron A, Raguénès-Nicol C, Chenuel T, Bondon A, Appavou MS, Le Rumeur E, **Combet S**, Hubert JF. Human dystrophin structural changes upon binding to anionic membrane lipid. *Biophys J* 115: 1231, 2018.
28. **Combet S**, Cousin F, Rezaei H, Noinville S. Membrane interaction of off-pathway prion oligomers and lipid-induced on-pathway intermediates during prion conversion: a clue for neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861: 514-523, 2019.
29. Annighöfer B, Hélyary A, Brûlet A, Colas de la Noue A, Loupiac C, **Combet S**. High pressure cell to investigate protein unfolding up to 600 MPa by small-angle neutron scattering. *Rev Sci Instr* 90: 025106, 2019.
30. Mias-Lucquin D, Dos Santos Morais R, Chéron A, Chenuel T, Pérez J, Lagarrigue M, Winder S, Alviset G, Le Rumeur E, Czjzek M, **Combet S**, Hubert JF, Delalande O. How the central domain of dystrophin bridges F-actin to sarcolemma lipids. *J Struct Biol* (sous presse).

31. Dzubak P, Gurska S, Bogdanova K, Uhrikova D, Kanjakova N, **Combet S**, Klunda T, Kolar M, Hajduch M, Polakova M. Antimicrobial and cytotoxic activity of (thio)alkyl hexopyranosides, nonionic glycolipid mimetics. *Carbohydrate Res* (en révision).

Chapitres d'ouvrages

32. **Combet S**, Geffroy N, Teillet L, Berthonaud V, Gobin R, Beckmann A, Corman B, Verbavatz JM. Renal aquaporin expression in aging rat: effect of food restriction. In: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*, Hohmann and Nielsen ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 63-68, 2000.
33. Devuyt O, **Combet S**, Balligand JL, Goffin E, Verbavatz JM. Expression and regulation of aquaporin-1 and endothelial nitric oxide synthase in relationship with water permeability across the peritoneum. In: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*, Hohmann and Nielsen ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 69-75, New York, 2000.

Communications orales

Mes résultats scientifiques ont été présentés dans environ 70 communications (orales ou sous forme de posters). J'ai listé ci-dessous les principales communications orales que j'ai données.

1. *Variable expression of endothelial NO synthase in normal and pathological human peritoneum*. Société Belge de Néphrologie, congrès annuel, Bruxelles, Belgique, avril 1998.
2. *Regulation of aquaporin-1 and nitric oxide (NO) synthase isoforms in a rat model of peritonitis*. Société Belge de Néphrologie, congrès annuel, Bruxelles, Belgique, 24 avril 1999.
3. *Chronic uremia in rats induces permeability changes, structural modifications and increased nitric oxide synthase (NOS) expression in the peritoneum*. Société Belge de Néphrologie, congrès annuel, Alost, Belgique, 8 avril 2000.
4. *Renal aquaporin expression in aging rat: effect of food restriction*. Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport, congrès international, Göteborg, Suède, 1^{er}-5 juillet 2000.
5. *An introduction to the water channel aquaporins. Implication in aging kidney physiopathology*. Symposium Water in Cell Biology. 4th World Congress of Cellular and Molecular Biology, Poitiers, 7-12 octobre 2005 (conférence invitée).
6. *Etude par diffusion de neutrons de la dynamique d'une protéine photo-excitée*. Congrès national de la Société Française de Biophysique, Anglet, 14-19 octobre 2006.
7. *Les aquaporines : canaux à eau des membranes biologiques*. Ecole L'eau dans les milieux biologiques, Roscoff, 25-28 octobre 2006 (conférence invitée).
8. *Isotope effect of hydration solvent on C-phycoerythrin dynamics*. International workshop Proteins on Work, Perugia, Italie, 28-30 mai 2007.
9. *Tests on pressure cells for SANS. Measurements in soft matter and biophysics*. NMI3 WP20 Advances neutron tools for soft and bio-materials JRA meeting, Munich, Allemagne, 7 décembre 2012.
10. *Influence de l'encombrement macromoléculaire sur le dépliement et la stabilité de la myoglobine*. 21^{èmes} Journées de la Diffusion Neutronique, Sète, 25 juin 2013.
11. *Which metallic alloys can be used as pressure cell windows? The case of SANS*. NMI3 WP20 Advances neutron tools for soft and bio-materials JRA meeting, Munich, Allemagne, 27 novembre 2013.
12. *Which metallic alloys can be used as pressure cells? Case of SANS*. NMI3 WP20 Advances neutron tools for soft and bio-materials JRA meeting, Saclay, 29 janvier 2013.
13. *Structure de systèmes biologiques par diffusion de neutrons aux petits angles*. Réunion du CFCAM, Paris, 8-9 avril 2013 (conférence invitée).
14. *Influence of macromolecular crowding on myoglobin unfolding and stability*. Neutrons & Food 3rd International Conference, Paris, 10 juillet 2014 (conférence invitée).
15. *Pressure cell for SANS: an update. Removable pressure cell windows in metallic alloys*. NMI3 WP20 Advances neutron tools for soft and bio-materials JRA meeting, Saclay, 28 mai 2015.
16. *Conformation of the polyethylene glycol chains in diPEGylated hemoglobin specifically probed by SANS: correlation with PEG length and in vivo efficiency*. 23^{èmes} Journées de la Diffusion Neutronique, Evian-les-Bains, 7 octobre 2015.
17. *Membrane-interfacial protein interactions: SAXS, SANS, and molecular modeling analysis of dystrophin 3D structure in the presence of membrane lipids*. GDR 3696 ProMemMoCe, Protéines membranaires : aspects moléculaires et cellulaires, La Londe-les-Maures, 5 avril 2016.
18. *Analysis of dystrophin 3D structure in the presence of membrane lipids*. 24^{èmes} Journées de la Diffusion Neutronique, Carqueiranne, 3 mai 2016.

19. *Use of contrast matching in SANS to probe protein conformation in complex environments.* Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie (I2BC/LBSR), Saclay, 23 février 2017 (séminaire invité).
20. *Membrane-interfacial protein interactions: analysis of dystrophin 3D structure in the presence of membrane lipids.* GDR 3696 ProMemMoCe, Protéines membranaires : aspects moléculaires et cellulaires, Porquerolles, 15-18 mai 2017.
21. *Analysis of the 3D structure of dystrophin fragments in the presence of isotropic bicelles.* Neutrons in Structural Biology (NISB) International Conference, Grenoble, 6-9 juin 2017.
22. *Structural analysis reveals opening of a coiled-coil repeat of human dystrophin upon binding to anionic membrane lipids.* XVII International Small-Angle Scattering Conference (SAS 2018), Traverse City, USA, 7-12 octobre 2018.
23. *Dystrophin structural changes upon binding to membrane lipids: a small-angle neutron scattering (SANS) and specular neutron reflectivity (SNR) study.* Workshop franco-allemand, Garching, Allemagne, 14-16 mai 2019 (conférence invitée).
24. *Membrane interaction of off-pathway prion oligomers and lipid-induced on-pathway intermediates during prion conversion: a clue for neurotoxicity.* European Conference on Neutron Scattering (ECNS), Saint-Pétersbourg, Russie, 30 juin-5 juillet 2019.
25. *HP SANS for structural studies of biological macromolecules. A new HP cell with metallic windows.* High pressure and Biology workshop, synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin, 8 octobre 2019 (conférence invitée).

Encadrements

Etudiants stagiaires

- Alexia CHAUVEAU (2004-2005), stage de 2^{ème} année du BTS de Biochimie, ETSL Paris, *Purification de l'aquaporine-1, canal à eau des membranes biologiques.*
- Amélie TENG (2004-2005), stage en alternance de 2^{ème} année de l'IUT de Génie Biologique, Créteil-Vitry, Université Paris 12-Val de Marne, *Purification de l'aquaporine-1.*
- Kayathiri GANESHAMOORHY (2004-2005), stage de 3^{ème} année du BTS de Bio-analyses et contrôles, ETSL Paris *Purification d'une protéine membranaire, l'aquaporine-1.*
- Christelle CASSAN (2005-2006), stage de 2^{ème} année de l'IUT de Génie Biologique, Créteil-Vitry, Université Paris 12-Val de Marne, *Purification d'une protéine de la photosynthèse - dynamique par diffusion de neutrons.*
- Audrey LAMS (2006-2007) stage en alternance de 2^{ème} année de l'IUT de Génie Biologique, Créteil-Vitry, Université Paris 12-Val de Marne, *Purification des canaux à eau AQPZ et GlpF en vue de les étudier dans des liposomes unilamellaires.*
- Elise VERNIMMEN et Perrine MASSON (2006-2007), stage de projet de 3^{ème} année de l'Ecole Centrale de Paris, option Procédés et Environnement, *Purification de l'aquaporine AQPZ.*
- Josias ELISEE (2006-2007), stage de projet de 3^{ème} année de l'Ecole Centrale de Paris, option Physique et Applications, *Computational analysis of the isotope effect on the dynamical transition of C-phycoyanin. Crystallization of C-phycoyanin.*
- Lucie REVERSAT (2007-2008), stage en alternance de de 3^{ème} année de Licence professionnelle Biotechnologie: ADN et Protéines, Université Paris 6, *Diffusion de neutrons appliquée à deux projets de biophysique : perméabilité des aquaporines au glycérol - Influence de l'hydratation sur la dynamique de la C-phycoyanine.*
- Céline LABOUESSE (2009), stage de 2^{ème} année de l'Ecole Polytechnique, option Biologie, *Etude du repliement de la luciférase par translocation à travers des nanopores artificiels.* Co-encadrement avec Didier Lairez.
- Prélixia POSTROS (2009-2010), stage en alternance de 3^{ème} année de Licence professionnelle Biophotonique, Université Paris 7, *Etude des interactions Hfq: ADN par différentes méthodes spectroscopiques : diffusion de neutrons aux petits angles et spectroscopie de fluorescence.* Co-encadrement avec Véronique Arluison.
- Estelle CAMBAROT (2012), stage de 1^{ère} année de BTS Bio-analyses et contrôles, ETSL Paris, *Caractérisation du domaine C-terminal de la protéine bactérienne Hfq.* Co-encadrement avec Véronique Arluison.
- Abdulai JALLOH (2012-2013), stage en alternance de 3^{ème} année de Licence professionnelle Biophotonique, Université Paris 7, *Fabrication et caractérisation de liposomes unilamellaires pour des études d'interactions avec des peptides anti-microbiens.*
- Sumeyye BORUKCU (2013-2014), stage en alternance de 3^{ème} année de Licence professionnelle Analyse Chimique, Université Paris 7, *Etude de l'influence de l'encombrement cytoplasmique sur le repliement et la stabilité de la myoglobine.*
- Yann FERREZ (2014-2015), stage en alternance de 3^{ème} année de Licence professionnelle Analyse Chimique, Université Paris 7, *Etude de l'influence de l'encombrement cytoplasmique sur le repliement de la myoglobine.*
- Pamitha CHANDRABALAN (2016-2017), stage en alternance de 3^{ème} année de Licence professionnelle Analyse Chimique, Université Paris 7, *Etude de l'effet de l'encombrement cytoplasmique sur le repliement et la stabilité des protéines.*
- Zaynab ALSALMAN (2017-2018, responsable : F. Bonneté), stage de Master 2 de recherche Sciences et Technologie, Mention Bio-informatique, Biochimie structurale et Génomique (Université Aix-Marseille), *Molecular modelling of protein/surfactant interactions for the understanding of membrane protein stabilization and crystallization.*

Doctorants

- Raphael DOS SANTOS MORAIS (2014-2017), thèse de doctorat de l'Université de Rennes 1 : *Interaction dystrophine/membrane : structure 3D de fragments de la dystrophine en présence de phospholipides* (Dir. JF. Hubert). En 2018-2019, R. Dos Santos Morais a effectué un post-doctorat au Laboratoire IMoPA, UMR 7365, CNRS-Université de Lorraine. Il se trouve depuis avril 2019 en post-doctorat au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), EA 4367, Université de Lorraine.
Prix de Thèse 2019 du Groupe d'Etudes des Membrane (**GEM**) de la Société Française de Biophysique (SFB). **Prix de Thèse 2019** de la Société Française de la Neutronique (**SFN**).
- Sayma ZAHID (2018-2021), thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay : *Structure d'assemblages multi-protéiques de la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN* (Dir. JB. Charbonnier).

Post-doctorants

- Alexandre COLAS de la NOUE (11 mois, 2014-2015) : *Etude par SANS de l'influence des ligands sur la stabilité et le dépliement de la myoglobine sous pression*. A. Colas de la Noue a été recruté en octobre 2015 comme Maître de Conférences au Laboratoire CIRAD, UMR QualiSud, à Montpellier.
- Simeon MINIC (2 ans, 2018-2020) *Etude par SANS de l'influence des ligands sur le dépliement sous pression de la β -lactoglobuline*.

Enseignements

- 2018-2019 : Master 2 Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes, Agro-Sup, Dijon : cours *SANS: a tool for structural biophysics* (2h/an) sur l'étude de la conformation des protéines par diffusion de neutrons et TP (2 journées/an) sur un appareil de diffusion de neutrons aux petits angles au LLB.
- 2012-2019 : Higher European Research Courses for Users of Large Experimental Systems (HERCULES) et Formation à la diffusion Neutronique du LLB (FAN) : TP de diffusion de neutrons aux petits angles au LLB (2 à 4 journées/an).
- 2008-2014 : 3^{ème} année de Licence Biochimie, UFR de Biologie, Université de Cergy-Pontoise : cours magistraux en Biophysique des Macromolécules Biologiques, organisation de TDs et d'un examen (10h/an).
- 2009-2013 : 3^{ème} année de Licence professionnelle Biophotonique, UFR de Physique, Université Paris 7 Cours d'introduction à la diffusion de neutrons aux petits angles (2h/an).
- Vulgarisation scientifique : Lab'Star (2015) : visite de la source de neutrons Orphée à du personnel travaillant au CEA de Saclay ; manifestation scientifique auprès de jeunes à l'Université d'Orsay (2016). Participation à la Fête de la Science sur le stand proposé par le LLB. Formation auprès du Centre de Vulgarisation de la Connaissance à Orsay (2016).

Financements

- (2019) AAP2020 de l'ANR : pré-proposition PIPPA (porteuse : S. Combet) sur le projet *Pressure-Induced Plant Protein Assemblies: from multiscale characterization to functional food properties*.
- (2018-2021) Contrat de thèse (50% financé par un contrat LLB-Soleil, 50% par l'I2BC) obtenu avec JB. Charbonnier (LBSR, I2BC) et L. Chavas (Synchrotron Soleil) sur le projet *Interaction Ku/ADN*.
- (2018-2010, 2 ans) Contrat de post-doctorat sur un AAP interne au LLB, obtenu avec A. Brûlet sur le projet *Dépliection des protéines sous pression*.
- (2018) Projet d'Excellence de l'Université d'Avignon (porteuse : F. Bonneté) : 3 k€ sur le projet *Interaction protéines membranaires/tensio-actifs*.
- (2017) Fédération de Neutrons (porteuse : S. Combet) : 5 k€ sur le projet *Interaction protéines/lipides*.
- (2017) Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS (porteuse : S. Combet) en collaboration avec JF. Hubert (IGDR-Université Rennes 1) et JB. Charbonnier (LBSR/I2BC, CEA Saclay) : 30 k€ sur le projet *Interaction protéines/lipides et protéines/ADN*.
- (2014-2017) Contrat de thèse (50% financé par un contrat LLB-Soleil, 50% par la Région Bretagne) obtenu conjointement avec JF. Hubert (IGDR-Université Rennes 1) et J. Pérez (Synchrotron Soleil) sur le projet *Interaction protéines/lipides*.
- (2014-2015, 1 an) Contrat européen NMI3-II (<http://nmi3.eu/>) : financement, obtenu avec A. Brûlet (LLB), d'un an de post-doctorat dans le cadre du « work package » (WP20) « Advanced Neutron Tools for Soft and Bio-Materials » pour le développement de cellules haute pression pour la diffusion de neutrons, sur le projet *Dépliection des protéines sous pression*.
- (2008-2010) Participation à l'ANR TRANSFOLDPROT (porteur J. Pelta, Université de Cergy-Pontoise) sur le projet *Translocation, interactions et repliement de protéines en sortie de différents pores protéiques à l'échelle de la molécule unique*.
- (2006-2009) Participation à l'ANR BIOSTAB, (porteur A. Hédoux, Université Lille 1) sur le projet *Stabilisation sous pression de matériaux biologiques d'intérêt thérapeutique*.

Expertise et gestion de la recherche

- Participation à des jurys de thèse :
 - Thèse de doctorat (Université Paris 6) de Yasine SAKHAWOTH : *Floculation - Formation et structure des agrégats entre les chaînes de polyélectrolytes et colloïdes argileux*, 3 octobre 2017 (examinatrice).
 - Thèse de doctorat (Université de Rennes 1) de Raphael DOS SANTOS MORAIS : *Interaction dystrophine/membrane : structure 3D de fragments de la dystrophine en présence de phospholipides*, 27 octobre 2017 (co-directrice de thèse).
 - Thèse de doctorat (Sorbonne Université) de Sofia HOUSNI : *Floculation magnétiquement assistée appliquée au traitement des eaux : étude d'un système modèle argile/NP de maghémite*, 2 octobre 2018 (examinatrice).
- Co-organisatrice de l'atelier « Biologie et Hautes Pressions : quelles cellules haute pression pour la biologie dans les grands instruments et les laboratoires? », synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin, 8 octobre 2019.
- Co-organisatrice de l'école « Neutrons and Biology » associées aux Journées de la Neutronique (JDN), à Carqueiranne, les 16-19 septembre 2018 (<https://sites.google.com/view/bioneutrons2018>).
- Membre du comité local d'organisation de la conférence « XVIII International Conference on Horizons in Hydrogen Bond Research », à Paris, les 14-18 septembre 2009.
- Co-éditrice du livre « Neutrons and Biology » (à paraître en 2020) qui fait suite à l'école.
- « Referee » d'articles scientifiques pour : *The Protein Journal*, *European Physical Journal E*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *Journal of the Royal Society Interface*, *European Biophysics Journal*.
- Membre de la commission d'évaluation pour la Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS et le comité italien CNISM.
- Membre du comité de co-direction de la mission pour l'interdisciplinarité du CNRS pour le réseau national « Hautes Pressions » depuis 2018.
- Membre élu du comité des utilisateurs de la source de neutrons MLZ à Munich, Allemagne, depuis 2018.
- Membre nommé du Conseil de Laboratoire du LLB de 2014 à 2016.
- Organisatrice du prix de thèse annuel de la Société Française de la Neutronique (SFN) de 2012 à 2016 : constitution d'un jury *ad hoc*, organisation de la réunions de délibération, présentation du prix aux Journées de la Diffusion Neutronique (JDN).
- Secrétaire du comité scientifique du LLB (collège A : physico-chimie et biologie) de 2005 à 2008, chargé d'évaluer environ 70 propositions scientifiques tous les six mois : répartition des propositions et organisation des réunions de délibération.
- Responsable du diffractomètre de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) PACE au LLB de 2015 à l'arrêt d'Orphée en octobre 2019.
- Mise en place à mon arrivée fin 2002, et co-responsable depuis, de la « plateforme » de biologie du LLB.
- Membre extérieur dans la Commission de Spécialistes de l'Université de Cergy-Pontoise (sections 64-68) de 2004 à 2007.

Quelques publications

J'ai attaché ci-après les pages de garde de cinq articles « marquants » de ma recherche propre récente :

- Combet S, Zanotti JM. Further evidence that hydration water is the main « driving force » of protein dynamics: a neutron scattering study on perdeuterated C-phycoerythrin. *Phys Chem Chem Phys* 14: 4927-4934, 2012.
C'est la publication la plus marquante de mes débuts de recherche au LLB sur la dynamique des protéines par diffusion incohérente de neutrons. Elle participe au débat sur le rôle joué par la dynamique de l'eau d'hydratation sur celle de la protéine.
- Dos Santos Morais R, Delalande O, Pérez J, Mouret L, Bondon A, Martel A, Appavou MS, Le Rumeur E, Hubert JF, Combet S. Contrast-matched isotropic bicelles: a versatile tool to specifically probe the solution structure of peripheral membrane proteins using SANS. *Langmuir* 33: 6572-6580, 2017.
- Dos Santos Morais R, Delalande O, Pérez J, Mias-Lucquin D, Lagarrigue M, Martel A, Molza AE, Chéron A, Raguénès-Nicol C, Chenuel T, Bondon A, Appavou MS, Le Rumeur E, Combet S, Hubert JF. Human dystrophin structural changes upon binding to anionic membrane lipid. *Biophys J* 115: 1231, 2018.
Cette publication, et la précédente qui lui est associée, sont mes deux premières publications en tant que responsable de thèse. Elles apportent des résultats importants dans la compréhension de la relation structure/fonction de la dystrophine en interaction avec des lipides membranaires et proposent une méthode innovante : l'utilisation de bicelles deutérées « contrast matchées » en SANS pour sonder la structure en solution de protéines membranaires.
- Combet S, Cousin F, Rezaei H, Noinville S. Membrane interaction of off-pathway prion oligomers and lipid-induced on-pathway intermediates during prion conversion: a clue for neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861: 514-523, 2019.
Cette publication illustre mes travaux récents en réflectivité spéculaire de neutrons. En particulier, elle présente une étude sur l'interaction de différents oligomères de la protéine prion avec la membrane lipidique, montrant un rôle neurotoxique de ces espèces.
- Annighöfer B, Héлары A, Brûlet A, Colas de la Noue A, Loupiac C, Combet S. High pressure cell to investigate protein unfolding up to 600 MPa by small-angle neutron scattering. *Rev Sci Instr* 90: 025106, 2019.
Cette publication récente sur le développement d'un nouveau prototype de cellule haute pression pour le SANS ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude du repliement/dépliement de protéines sous pression, comme la β -lactoglobuline (projet en cours) ou la patatine (projet d'ANR).

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 4927–4934

www.rsc.org/pccp

PAPER

Further evidence that interfacial water is the main “driving force” of protein dynamics: a neutron scattering study on perdeuterated C-phycoerythrin

Sophie Combet* and Jean-Marc Zanotti

Received 24th November 2011, Accepted 14th February 2012

DOI: 10.1039/c2cp23725c

The fundamental role of hydration water (also called interfacial water) is widely recognized in protein flexibility, especially in the existence of the so-called protein “dynamical transition” at around 220 K. In the present study, we take advantage of perdeuterated C-phycoerythrin (CPC) and elastic incoherent neutron scattering (EINS) to distinguish between protein dynamics and interfacial water dynamics. Powders of hydrogenated (hCPC) and perdeuterated (dCPC) CPC protein have been hydrated, respectively, with D₂O or H₂O and measured by EINS to separately probe protein dynamics (hCPC/D₂O) and water dynamics (dCPC/H₂O) at different time- and length-scales. We find that “fast” (<20 ps) local mean-square displacements (MSD) of both protein and interfacial water coincide all along the temperature range, with the same dynamical transition temperature at ~220 K. On higher resolution (<400 ps), two different types of motions can be separated: (i) localized motions with the same amplitude for CPC and hydration water and two transitions at ~170 and ~240 K for both; (ii) large scale fluctuations exhibiting for both water molecules and CPC protein a single transition at ~240 K, with a significantly higher amplitude for the interfacial water than for CPC. Moreover, by comparing these motions with bulk water MSD measured under the same conditions, we show no coupling between bulk water dynamics and protein dynamics all along the temperature range. These results show that interfacial water is the main “driving force” governing both local and large scale motions in proteins.

Introduction

Surface hydration water, also known as interfacial water, is fundamental to the structural stability and flexibility of proteins, as well as to their biological functions.¹ One way to investigate its role in protein dynamics is to study the so-called “dynamical transition” the proteins undergo at around 220 K, evidenced as a break in the hydrogen (H) atomic mean-square displacements (MSD)—which correspond to the protein internal flexibility—as a function of temperature (see ref. 2–4 for reviews). This dynamical transition has been measured on the microscopic level by various methods including elastic incoherent neutron scattering (EINS) in both soluble^{5–7} and membrane protein systems.^{8–10} Below the dynamical transition, biomolecules exist in a “glassy” state—without any conformational flexibility and biological function—characterized by the linear increase of MSD with temperature due to purely harmonic motions.^{2,11,12} Above this transition, a sudden increase of the motional amplitudes is observed, attributed to proton collective motions

in the protein,^{2,12} and proteins become biologically active. The role of the solvent surrounding proteins has largely been recognized since, in the absence of hydration water, such onset vanishes.^{2,3,7,13,14}

However, few attempts have been made to elucidate, at the molecular level, the detailed mechanism by which water molecules drive, at least partly, the protein motions.^{2,3} A molecular coupling between interfacial water dynamics and protein dynamics has recently been shown, especially for the dynamical transition.^{14,15} We reported indeed a correlation between interfacial water rotational motions and lysozyme MSD for both transitions at ~150 K and ~220 K.¹⁴ In that previous study we used Vycor, a porous hydrophilic silica glass, to mimic the hydrophilic surface of a protein and be able to measure interfacial water motions.¹⁴ Protein dynamics had been measured in a lysozyme powder sample hydrated with D₂O.¹⁴ Since Vycor is a dynamically inert material, the question therefore arises as to whether these results could be confirmed by measuring interfacial water MSD in interaction with a protein. In the present study, we take advantage of perdeuterated C-phycoerythrin (CPC) protein and EINS to probe separately protein dynamics and interfacial water dynamics in a single protein–water system. Thanks to the large incoherent scattering

Laboratoire Léon-Brillouin, UMR 12 CEA/CNRS, bât. 563,
CEA-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.
E-mail: sophie.combet@cea.fr; Fax: +33 1 69 08 82 61;
Tel: +33 1 69 08 67 20

Contrast-Matched Isotropic Bicelles: A Versatile Tool to Specifically Probe the Solution Structure of Peripheral Membrane Proteins Using SANS

Raphael Dos Santos Morais,^{†,‡,§,||} Olivier Delalande,^{†,‡} Javier Pérez,^{||} Liza Mouret,[⊥] Arnaud Bondon,[⊥] Anne Martel,[#] Marie-Sousai Appavou,[∇] Elisabeth Le Rumeur,^{†,‡} Jean-François Hubert,^{†,‡} and Sophie Combet^{*,§}

[†]Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

[‡]CNRS UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, F-35043 Rennes, France

[§]Laboratoire Léon-Brillouin, UMR 12 CEA-CNRS, Université Paris-Saclay, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette F-91191, France

^{||}SWING Beamline, Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, BP48, Saint-Aubin, Gif-sur-Yvette F-91192, France

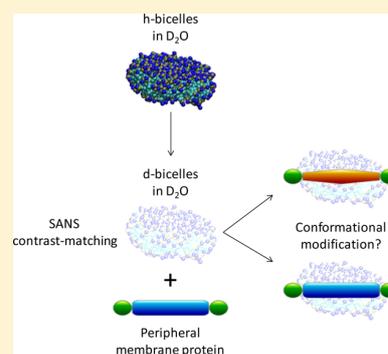
[⊥]CNRS 6226, Institut des Sciences Chimiques de Rennes, PRISM, F-350043 Rennes, France

[#]Institut Laue-Langevin, F-38042 Grenoble, France

[∇]Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) at Heinz Maier-Leibnitz Zentrum (MLZ), Forschungszentrum Jülich GmbH, Lichtenbergstr. 1, D-85748 Garching, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Obtaining structural information on integral or peripheral membrane proteins is currently arduous due to the difficulty of their solubilization, purification, and crystallization (for X-ray crystallography (XRC) application). To overcome this challenge, bicelles are known to be a versatile tool for high-resolution structure determination, especially when using solution and/or solid state nuclear magnetic resonance (NMR) and, to a lesser extent, XRC. For proteins not compatible with these high-resolution methods, small-angle X-ray and neutron scattering (SAXS and SANS, respectively) are powerful alternatives to obtain structural information directly in solution. In particular, the SANS-based approach is a unique technique to obtain low-resolution structures of proteins in interactions with partners by contrast-matching the signal coming from the latter. In the present study, isotropic bicelles are used as a membrane mimic model for SANS-based structural studies of bound peripheral membrane proteins. We emphasize that the SANS signal coming from the deuterated isotropic bicelles can be contrast-matched in 100% D₂O-based buffer, allowing us to separately and specifically focus on the signal coming from the protein in interaction with membrane lipids. We applied this method to the DYS-R11–15 protein, a fragment of the central domain of human dystrophin known to interact with lipids, and we were able to recover the signal from the protein alone. This approach gives rise to new perspectives to determine the solution structure of peripheral membrane proteins interacting with lipid membranes and might be extended to integral membrane proteins.



INTRODUCTION

While approximately 26% of the human proteome is predicted to be composed of membrane proteins,¹ the structures of only 685 unique membrane proteins are available.² This highlights the difficulty in handling membrane proteins during their solubilization, purification, and crystallization.³ For even more recalcitrant membrane proteins incompatible with high-resolution methods (nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography (XRC)), small-angle X-ray and neutron scattering (SAXS and SANS, respectively) are good alternative approaches to obtain the structural information on a protein not only alone in solution but also in interaction with its partner(s).^{4,5} In the SANS-based approach, the contrast

matching (CM) technique allows the signal coming from one component to be specifically probed by hiding the signal coming from other partners in a multicomponent system. This is achieved by adjusting the deuteration level of the components in an appropriate H₂O/D₂O ratio. The CM technique has been successfully applied to the determination of the structure of one component in protein–protein and protein–DNA complexes.⁶ Protein–lipid complexes have also been successfully investigated in the same way with different

Received: April 21, 2017

Revised: June 2, 2017

Published: June 5, 2017

Human Dystrophin Structural Changes upon Binding to Anionic Membrane Lipids

Raphael Dos Santos Morais,^{1,2,3,4} Olivier Delalande,^{1,2} Javier Pérez,⁴ Dominique Mias-Lucquin,^{1,2} Mélanie Lagarrigue,^{1,5} Anne Martel,⁶ Anne-Elisabeth Molza,^{1,2} Angélique Chéron,^{1,2} Céline Raguénès-Nicol,^{1,2} Thomas Chenuel,^{1,2} Arnaud Bondon,⁷ Marie-Sousai Appavou,⁸ Elisabeth Le Rumeur,^{1,2} Sophie Combet,^{3,*} and Jean-François Hubert^{1,2,*}

¹Université de Rennes, Rennes, France; ²Institut de Génétique et Développement de Rennes, CNRS UMR 6290, Rennes, France; ³Laboratoire Léon-Brillouin, UMR 12 CEA-CNRS, Université Paris-Saclay, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, France; ⁴SWING Beamline, Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint-Aubin, Gif-sur-Yvette, France; ⁵Inserm U1085, Protim-Plate-forme Protéomique, Rennes, France; ⁶Institut Laue-Langevin, Grenoble, France; ⁷CNRS 6226, Institut des Sciences Chimiques de Rennes, PRISM, Rennes, France; and ⁸Jülich Centre for Neutron Science at Heinz Maier-Leibnitz Zentrum, Forschungszentrum Jülich GmbH, Garching, Germany

ABSTRACT Scaffolding proteins play important roles in supporting the plasma membrane (sarcolemma) of muscle cells. Among them, dystrophin strengthens the sarcolemma through protein-lipid interactions, and its absence due to gene mutations leads to the severe Duchenne muscular dystrophy. Most of the dystrophin protein consists of a central domain made of 24 spectrin-like coiled-coil repeats (R). Using small angle neutron scattering (SANS) and the contrast variation technique, we specifically probed the structure of the three first consecutive repeats 1–3 (R1–3), a part of dystrophin known to physiologically interact with membrane lipids. R1–3 free in solution was compared to its structure adopted in the presence of phospholipid-based bicelles. SANS data for the protein/lipid complexes were obtained with contrast-matched bicelles under various phospholipid compositions to probe the role of electrostatic interactions. When bound to anionic bicelles, large modifications of the protein three-dimensional structure were detected, as revealed by a significant increase of the protein gyration radius from 42 ± 1 to 60 ± 4 Å. R1–3/anionic bicelle complexes were further analyzed by coarse-grained molecular dynamics simulations. From these studies, we report an all-atom model of R1–3 that highlights the opening of the R1 coiled-coil repeat when bound to the membrane lipids. This model is totally in agreement with SANS and click chemistry/mass spectrometry data. We conclude that the sarcolemma membrane anchoring that occurs during the contraction/elongation process of muscles could be ensured by this coiled-coil opening. Therefore, understanding these structural changes may help in the design of rationalized shortened dystrophins for gene therapy. Finally, our strategy opens up new possibilities for structure determination of peripheral and integral membrane proteins not compatible with different high-resolution structural methods.

INTRODUCTION

Obtaining the structural information of membrane proteins is very challenging because of the difficulties associated with their handling (1). Only ~770 membrane protein structures have been made available (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>), and this number is considerably less than the numerous structures obtained for soluble proteins (2). Furthermore, for membrane proteins not compatible with x-ray crys-

tallography, NMR, and/or the increasingly used cryo-electron microscopy (3), the challenge could be even trickier. To overcome this, small angle x-ray or neutron scattering (SAXS or SANS, respectively) are alternative techniques to obtain structural information on biological macromolecules either free in solution or bound to various partners (4) such as membrane proteins (5,6). The SANS-based contrast variation technique (7) allows us to specifically obtain low-resolution structures of proteins involved in macromolecular complexes and has been successfully applied to protein-polymer (8), protein-protein (7), protein-DNA/RNA (9,10), and protein-lipid/detergent complexes (11–13). We highlighted recently that phospholipid-based bicelles can be contrast-matched to be used in SANS experiments as a relevant membrane mimic to probe conformational modifications of peripheral membrane proteins in interaction with phospholipids (14). In our

Submitted April 20, 2018, and accepted for publication July 31, 2018.

*Correspondence: sophie.combet@cea.fr or jfhubert@univ-rennes1.fr

Raphael Dos Santos Morais's present address is UMR 7365 CNRS-UL IM-
oPA, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Anne-Elisabeth Molza's present address is CNRS UPR 9080, Université
Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75005 Paris, France.

Editor: Georg Pabst.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.07.039>

© 2018 Biophysical Society.





Membrane interaction of off-pathway prion oligomers and lipid-induced on-pathway intermediates during prion conversion: A clue for neurotoxicity



Sophie Combet^a, Fabrice Cousin^a, Human Rezaei^b, Sylvie Noinville^{c,*}

^a Laboratoire Léon-Brillouin, UMR 12 CEA-CNRS, Université Paris-Saclay, CEA-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette CEDEX, France

^b Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires, UR892, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), F-78352 Jouy-en-Josas, France

^c Laboratoire MONARIS, UMR 8233, Sorbonne Université, CNRS, F-75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Prion protein
Lipid membrane
Oligomer
Leakage
Conformational change

ABSTRACT

Soluble oligomers of prion proteins (PrP), produced during amyloid aggregation, have emerged as the primary neurotoxic species, instead of the fibrillar end-products, in transmissible spongiform encephalopathies. However, whether the membrane is among their direct targets, that mediate the downstream adverse effects, remains a question of debate. Recently, questions arise from the formation of membrane-active oligomeric species generated during the β -aggregation pathway, either in solution, or in lipid environment. In the present study, we characterized membrane interaction of off-pathway oligomers from recombinant prion protein generated along the amyloid aggregation and compared to lipid-induced intermediates produced during lipid-accelerated fibrillation. Using calcein-leakage assay, we show that the soluble prion oligomers are the most potent in producing leakage with negatively charged vesicles. Binding affinities, conformational states, mode of action of the different PrP assemblies were determined by thioflavin T binding-static light scattering experiments on DOPC/DOPS vesicles, as well as by FTIR-ATR spectroscopy and specular neutron reflectivity onto the corresponding supported lipid bilayers. Our results indicate that the off-pathway PrP oligomers interact with lipid membrane via a distinct mechanism, compared to the inserted lipid-induced intermediates. Thus, separate neurotoxic mechanisms could exist following the puzzling intermediates generated in the different cell compartments. These results not only reveal an important regulation of lipid membrane on PrP behavior but may also provide clues for designing stage-specific and prion-targeted therapy.

1. Introduction

Prion protein (PrP) misfolding is associated with a range of deadly neuropathological diseases, including bovine spongiform encephalopathy in cattle, scrapie in sheep, and Creutzfeldt-Jacob in human, characterized by the accumulation of insoluble proteinaceous aggregates inside the infected tissues [1]. The mechanisms that trigger the structural transition from mainly α -helical cellular PrP (PrP^C) to its β -sheeted enriched pathological “scrapie” conformer (PrP^{Sc}) are still unclear. As proposed by Collinge et al. [2], the prion propagation and toxicity *in vivo* would be kinetically controlled by the interaction of the prion strain type and the host environment. Furthermore, neurotoxicity would be mediated by toxic PrP species, distinct from the pathological PrP^{Sc} [3]. For example, there is a compelling evidence suggesting that PrP aggregates of low molecular weight or soluble oligomers interact

with cell membranes altering the cellular homeostasis [4–6]. It has been shown that the prion proteins induce ion channel current with defined conductance states in planar lipid bilayers [5]. More recently, neurotoxic mutants of PrP induce spontaneous ionic current in cultured cells [6].

PrP/membrane interactions are believed to be essential to the function of PrP in the cell since the protein is localized in close proximity to plasmatic membranes [7,8]. Several converging lines of evidence suggest that this interaction promotes various precursors to aggregation-prone states involved in the amyloid fibrils [9]. Although the exact sites of prion conversion and the cellular events responsible for prion infection are still unknown, the conformational change associated to the conversion of normal PrP^C into PrP^{Sc} seems to take place at the cell surface and/or in the endocytic pathway. Recently, it has been shown that prion strains are differentially sensitive to changes in

Abbreviations: PrP, prion protein; DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPS, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine; SLB, supported lipid bilayer; ThT, thioflavin T; FTIR-ATR, Fourier transform infrared spectroscopy-attenuated total reflection; SNR, specular neutron reflectometry; SLS, static light scattering; DLS, dynamic light scattering

* Corresponding author at: Laboratoire MONARIS, UMR 8233, Sorbonne Université, CNRS, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.

E-mail address: sylvie.noinville@sorbonne-universite.fr (S. Noinville).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.001>

Received 19 September 2018; Received in revised form 21 November 2018; Accepted 4 December 2018

Available online 05 December 2018

0005-2736/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

A high pressure cell using metallic windows to investigate the structure of molecular solutions up to 600 MPa by small-angle neutron scattering

Cite as: Rev. Sci. Instrum. 90, 025106 (2019); doi: 10.1063/1.5051765

Submitted: 12 August 2018 • Accepted: 17 January 2019 •

Published Online: 13 February 2019



Burkhard Annighöfer,¹ Arnaud Hélyary,¹ Annie Brûlet,^{1,a)} Alexandre Colas de la Noue,^{1,2} Camille Loupiac,^{1,3} and Sophie Combet^{1,a)}

AFFILIATIONS

¹Laboratoire Léon-Brillouin (LLB), UMR 12 CEA-CNRS, Université Paris-Saclay, CEA-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette CEDEX, France

²Laboratoire CIRAD, UMR QualiSud, F-34398 Montpellier CEDEX 5, France

³Equipe PCAV, UMR PAM, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France

^{a)} Authors to whom correspondence should be addressed: sophie.combet@cea.fr and annie.brulet@cea.fr

ABSTRACT

We report on a high pressure (HP) cell designed for the determination of the structure of molecular solutions by small-angle neutron scattering (SANS). The HP cell is fitted up with two thick metallic windows that make the device very resistant under hydrostatic pressures up to 600 MPa (or 6 kbar). The metallic windows are removable, offering the possibility to adapt the HP cell to a given study with the pressure desired on an appropriate spatial range to study the structure of various molecular solutions by SANS. In this context, we report the absorption, transmission, and scattering properties of different metallic windows. Finally, we describe, as a proof of principle, the solution structure changes of myoglobin, a small globular protein.

Published under license by AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/1.5051765>

I. INTRODUCTION

Pressure is an important thermodynamic variable not only for physics and chemistry but also for biology. Depending on the thermodynamic environment, the solution structure of proteins can fluctuate in multiple conformational substates, which differ in their partial molar volumes, ranging from folded to unfolded states.^{1,2} This equilibrium between different substates contributes to the protein intrinsic flexibility. While a number of studies on protein unfolding have been focused on thermal and/or chemical effects, much less has been performed under high pressure (HP), which is however a unique tool.^{3,4} The first observation that high hydrostatic pressure is able to unfold proteins was the coagulation of albumin, as shown by Bridgman in 1914.⁵

Thanks to an appropriate spatial range, small-angle neutron scattering (SANS) upon HP is an invaluable technique to provide direct information on the three-dimensional conformation of various molecular solutions, especially in

biology. Many studies have been published using SANS and HP on different proteins. For instance, measurements performed on various concentrations of azidometmyoglobin (myoglobin being a small and globular protein, whose function is to stock dioxygen in muscles) showed that the compactness of the protein is not altered by HP up to 300 MPa (or 3 kbar),⁶ but some changes have however been observed on the specific volume of this protein as a function of pressure.⁷ Ortore *et al.* reported that pressure induces dissociation of β -lactoglobulin in both D₂O and a 50% mixture of water and ethylene-glycol, even if the protein shows a higher stability in 50% ethylene-glycol.⁸ Osaka *et al.* compared the heat- and pressure-induced gelation of β -lactoglobulin aqueous solutions by both SANS and dynamic light scattering.⁹ The denaturation of calmodulin, in contrast to heat denaturation, has been shown to be reversible up to pressures of 300 MPa.¹⁰ Structural studies by SANS have also been associated with dynamics studies by quasielastic neutron scattering on the bovine pancreatic trypsin inhibitor^{11,12} and the human acetylcholinesterase.¹³