

Base moléculaire de la production des protéines membranaires et de la formation des membranes intracellulaire dans *Escherichia coli*

Résumé: Le système d'expression le plus utilisé pour la production des protéines membranaires, est le système basé sur l'ARN polymérase T7 (ARNpol T7) (Hattab et al., 2015). L'inconvénient de ce système est néanmoins que la vitesse de transcription de l'ARNpol T7 est dix fois plus rapide que celle de l'enzyme bactérienne. Depuis l'isolement de mutants spontanés, notamment C41(DE3) et C43(DE3) (Miroux et Walker, 1996) et l'identification de leurs mutations dans le génome, il apparaît clairement que la toxicité provoquée par la surproduction des protéines membranaires est liée à la quantité trop élevée d'ARNpol T7 dans la cellule (Wagner et al., 2008; Kwon et al., 2015). Les protéines membranaires ont besoin d'une vitesse de transcription/traduction plus basse pour se replier correctement dans la membrane de la bactérie. Le premier objectif de ma thèse était d'étendre l'amplitude du promoteur du système T7 sur laquelle est basée l'expression des protéines. Pour cela, nous avons isolé et caractérisé de nouvelles souches bactériennes dans lesquelles le niveau d'ARNpol T7 était efficacement régulé par un mécanisme non transcriptionnel très favorable à l'expression des protéines membranaires (Angius et al., 2016). Le deuxième objectif était de comprendre la prolifération des membranes intracellulaires chez *E. coli* suite à la surexpression de la protéine AtpF, une sous unité membranaire du complexe de l'ATP synthétase (Arechaga et al., 2000). Pour mieux comprendre les voies métaboliques impliquées dans la biogenèse, la prolifération et l'organisation des membranes, nous avons utilisé une approche de séquençage d'ARN à haut débit à différents temps après induction de la surexpression de la sous-unité AtpF dans la souche C43(DE3). Ensuite, et en collaboration avec Gerardo Carranza and Ignacio Arechaga (Université de Cantabria, Espagne), nous avons construit et étudié des mutants de C43(DE3) déficients pour les trois gènes codants pour des enzymes de la biosynthèse des cardiolipides afin d'évaluer leur participation dans la biogénèse des membranes intracellulaires.

Mots clefs: *E. coli*, production des protéines membranaires, ARN T7 polymérase, membranes intracellulaires, cardiolipides, interactions protéine-lipide.

Molecular basis of membrane protein production and intracellular membranes proliferation in *Escherichia coli*

Abstract: The most successful expression system used to produce membrane proteins for structural studies is the one based on the T7 RNA polymerase (T7 RNAP) (Hattab et al., 2015). However, the major drawback of this system is the over-transcription of the target gene due to the T7 RNAP transcription activity that is over ten times faster than the *E. coli* enzyme. Since the isolation of spontaneous mutants, namely C41(DE3) and C43(DE3) (Miroux and Walker, 1996) and the identification of their mutation in the genome, it becomes clear that reducing the amount of the T7 RNAP level removes the toxicity associated with the expression of some membrane proteins (Wagner et al., 2008; Kwon et al., 2015). Also, some membrane proteins require a very low rate of transcription to be correctly folded at the *E. coli* membrane. The first objective of my PhD was to extend the promoter strength coverage of the T7 based expression system. We used genetic and genomic approaches to isolate and characterize new bacterial strains (Angius et al., 2016) in which the level of T7 RNAP is differently regulated than in existing hosts.

A second objective was to understand intracellular membrane proliferation in *E. coli*. Indeed it has been shown that over-expression of membrane proteins, like over-expression of AtpF of *E. coli* F₁F_o ATP synthase is accompanied by the proliferation of intracellular membranes enriched in cardiolipids (Arechaga et al., 2000). To understand metabolic pathways involved in membrane biogenesis, proliferation and organization, we used a RNA sequencing approach at several time point upon over-expression of the F-ATPase b subunit in C43(DE3) host. On the other hand, in collaboration with Gerardo Carranza and Ignacio Arechaga (University of Cantabria, Spain) we studied C43(DE3) *c/s* mutants, in which the cardiolipids genes A, B and C are deleted, to test how they participate to intracellular membranes structuration.

Keywords: *E. coli*, production of membrane proteins, T7 RNA polymerase, intracellular membranes, cardiolipin, protein-lipid interactions.