

Thèse : Alaa ABDINE

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

Le génome de différents organismes contient près de 30% de séquences codantes pour des protéines membranaires. Celles-ci sont impliquées dans des processus biologiques tels que la signalisation cellulaire, la transduction énergétique ou le transport des métabolites. Cependant, leur étude structurale se heurte souvent aux problèmes de surexpression, ainsi qu'aux différents inconvénients liés à leur extraction de leur environnement natif.

Le canal mécanosensible à large conductance MscL d'*Escherichia coli* est une protéine intrinsèque de la membrane interne de la bactérie. L'activité de cette protéine est fortement dépendante de la membrane ; en effet, le canal s'ouvre lorsque la pression au niveau de la membrane augmente, lors d'un choc hypoosmotique, relarguant de l'eau et différents substrats afin que la bactérie retrouve un état osmotique adéquat à sa survie. Il est donc essentiel de recueillir des données structurales de la protéine dans son environnement natif. Pour cela, nous proposons une étude structurale de la protéine par résonance magnétique nucléaire en phase solide.

La surexpression de la protéine et son marquage aux isotopes ^{13}C et ^{15}N sont deux étapes clés d'un tel projet. Une surexpression bactérienne et un marquage uniforme de la protéine ont été effectués. Les données spectrales obtenues montrent une bonne résolution, mais l'imbrication des corrélations ne permet pas d'en extraire des données structurales. Afin de réduire le nombre de résidus marqués, un marquage spécifique a été appliqué par la voie de la synthèse in vitro. Le premier test a montré que l'approche permettait de réduire le temps d'acquisition, tout en diminuant la quantité d'informations.

Différentes méthodes ont ensuite été appliquées pour trouver les meilleures combinaisons d'acides aminés à marquer spécifiquement en synthétisant la protéine in vitro. Ces approches utilisent les programmes de prédiction de déplacements chimiques ou l'analyse de la séquence à la recherche de paires d'acides aminés uniques. Une approche combinatoire a été également testée. Les différents échantillons synthétisés ont montré une bonne résolution, et ont permis l'identification de plusieurs corrélations.

Les méthodes développées au cours de ce travail pourront aider progressivement à déterminer la structure de la protéine MscL. Elles pourront également servir à d'autres protéines membranaires pour leur étude par résonance magnétique nucléaire.

New labeling strategies for a structural study of the mechanosensitive channel of large conductance using cell-free synthesis

Membrane proteins account for almost 30% of the proteome and play essential roles in many cellular mechanisms. The mechanosensitive channel of large conductance MscL is an intrinsic membrane protein of the inner membrane of *Escherichia coli*. This protein acts as a valve pressure, in a hypo-osmotic down-shock, to prevent the bacterial lysis. In this work, a study of the structural characteristics of MscL in its native environment, the lipid bilayer, by nuclear magnetic resonance in the solid-state is presented. A major problem in determining the three-dimensional structure of membrane proteins by this technique is their overexpression and the analysis of carbon-carbon correlations from uniformly labelled samples.

The analysis of MscL by solid-state NMR with a uniform labelling showed spectra with a good resolution, but the overlap of the correlations prevented any identification or assignment of the residues. We showed that selective labelling of the membrane protein MscL by using cell-free synthesis represents a crucial help in improving data sets obtained by NMR in the solid-state. Since the amino acids chemical shifts show a big overlap, different strategies to choose specific labelling patterns to get well-resolved spectra were developed. These strategies are based on chemical shifts prediction, or sequence analysis to isolate unique amino acid pairs. A combined approach was tested. These different approaches showed spectra with a good resolution, and facilitated the identification of amino acids in some cases.

The methods developed in this work may gradually help to determine the three-dimensional structure of the mechanosensitive channel MscL, as well as other lipid-dependent membrane proteins.