Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

CRB3 UMRS-773 Faculté de Médecine X Bichat

UMR 7203 CNRS - UPMC - ENS

Production et caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine membranaire recombinante TSPO

Par Soria Harbi Iatmanen

Thèse de doctorat de Biologie Moléculaire et Biochimie

Dirigée par Dr Jean-Jacques Lacapère

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Laura BACIOU	Chargée de Recherche CNRS	Rapporteur
Jean-Jacques LACAPERE	Directeur de Recherche CNRS	Examinateur
Claire LEMAIRE	Chargée de Recherche CNRS	Rapporteur
Olivier LEQUIN	Professeur UPMC	Examinateur
Mariano Anibal OSTUNI	Professeur Paris Diderot	Examinateur
Germain TRUGNAN	Professeur UPMC	Examinateur

REMERCIEMENTS

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne…

Mes premiers remerciements vont naturellement à mon directeur de thèse, Jean-Jacques Lacapère, qui m'a accordé sa confiance depuis bientôt sept ans !! Je le remercie de son aide et de ses conseils (scientifiques et autres) aussi précieux qu'indispensables. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Les nombreuses relectures et corrections de cette thèse ont été très appréciables. Pour tout cela merci.

Mes vifs remerciements vont également à Mme Laura Baciou et Mme Claire Lemaire qui ont accepté de relire cette thèse et en sont les rapporteurs. Je remercie également les autres membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail : M. Germain Trugnan, M. Olivier Lequin et M. Mariano Ostuni.

Je tiens à remercier également Mme France Uebersfeld et Mme Malika Necir de la formation continue de l'université Pierre et Marie CURIE de m'avoir aidé à constituer mon dossier VAE.

Un grand merci également à M. Germain Trugnan qui m'a donné l'opportunité d'effectuer ma thèse dans son école doctorale.

Les travaux de recherches ont été réalisé au sein du Centre de Recherche Biomédical Bichat-Beaujon (CRB) (actuellement Centre de Recherche pour l'Inflammation, CRI). Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire qui ont partagé mon quotidien : Victoire, Pascal, Valérie, Margot, Marie-Hélène, Dalila, Nassima, Jean Claude, Lucile, Alain, Thierry, Nicaise, Pascale, Jocelyn, Mathieu, je tiens à les remercier pour leur convivialité, leur bonne humeur et pour avoir rendu cette période agréable à vivre. Merci également à Leeyah qui a toujours été présente malgré la distance qui nous a éloignés.

J'aimerais également remercier les collaborateurs qui ont participé à ce travail. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à M. Olivier Lequin pour son intérêt qu'il a porté à ce travail, pour les essais de RMN en solution et les nombreuses discussions ainsi que les corrections du manuscrit. Je souhaite également remercier M. Gérard Bolbach pour les analyses par spectrométrie de masse et Mme Sandrine Sagan pour son initiation à l'ITC et la DSC.

Merci à tous mes amis Samia, Ismahan, Kahina, Belkacem, Karima et Djohra, pour leur soutien permanent.

Bien sur, je n'oublie pas mes parents, mes frères et mes soeurs, de leur soutien mais aussi mes deux hommes, Mehenna et Ilan, d'être toujours là et de m'avoir supporté

RESUME

La translocase 18kDa (TSPO), préalablement connue sous le nom de récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), est une protéine membranaire principalement impliquée dans le transport du cholestérol du cytosol vers la matrice des mitochondries, étape limitante dans la biosynthèse des stéroïdes et des sels biliaires.

Au départ de mon projet de thèse, il n'y avait pas de structure de la TSPO et les seules données disponibles étaient la présence cinq hélices transmembranaires. Mon objectif était de produire des quantités de protéine recombinante suffisamment pure pour réaliser des études structurales et fonctionnelles. Différentes approches structurales étaient possibles, la formation de cristaux étudiés par microscopie électronique (ME) ou diffraction des rayons X (RX) et l'étude de la protéine en solution par RMN. Chacune de ces approches nécessitaient non seulement la production de la TSPO stable dans différents environnements mimétiques membranaires, mais aussi le marquage de la protéine. En effet, la présence d'atome lourd comme le sélenium était important pour le phasage de données de la diffraction de RX, de même que la présence de marquage ^{15}N, ^{13}C et ^{2}H était indispensable pour les études RMN.

La production de la forme murine de la TSPO recombinante a été réalisée par un plasmide exprimé dans la bactérie *Escherichia coli*. La purification a été obtenue par colonne d'affinité grâce à l'étiquette polyhistidine codée dans le gène recombinant. Différents environnements mimétiques membranaires, détergents, lysodérivés, lipides ont été testés d'un point de vue structural et fonctionnel. Parmi les détergents étudiés, la dodécyl phosphocholine (DPC) s'est avérée le meilleur en terme de repliement de la protéine. L'ajout de lysodérivés (LMPE) ou de phospholipides (DMPC/DMPE) a permis d'accroître la stabilité. La liaison des ligands spécifiques de la TSPO (PK 11195, cholestérol, protoporphyrine IX) a été observée dans plusieurs conditions étudiées par différentes approches biophysiques et biochimiques. Les trois approches structurales (ME, RX et RMN) ont pu être réalisées grâce à l'optimisation des conditions de production et de stabilisation. Les résultats obtenus sont discutés en lien avec la structure de la TSPO publiée ces derniers mois.

En parallèle à l'étude structurale de la protéine, des mesures fonctionnelles par mutagenèse dirigée ont été réalisées afin d'obtenir des informations structurales et fonctionnelles sur la liaison du ligand PK 11195. La publication de la structure par un autre groupe a permis de confronter ces données et de proposer un rôle pour les résidus mutés. Le mécanisme de transport du cholestérol par la TSPO est discuté.

Mots clés : [TSPO, PBR, protéine membranaire]

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS 2

RESUME 3

TABLES DES MATIERES 4

LISTE DES ABREVIATIONS 9

INTRODUCTION 11

1. LA TSPO, UNE PROTEINE MEMBRANAIRE 11

1.1. Historique 11

1.2. Localisation cellulaire et la distribution tissulaire de la TSPO 11

1.3. Les différentes fonctions de la TSPO et ses partenaires protéiques 12
1.3.1. La fonction de transport du cholestérol 13
1.3.2. La régulation de la biosynthèse et la biodégradation des porphyrines 15
1.3.3. Le transport d'ions et de nucléotides 17
1.3.4. La régulation des radicaux libres 17
1.3.5. Autres fonctions 19

1.4. Les différents ligands de la TSPO 19
1.4.1. Les ligands endogènes 19
1.4.1.1. Le DBI (Diazepam Binding Inhibitor) 19
1.4.1.2. Le Cholestérol 21
1.4.1.3. Les porphyrines 24
1.4.2. Les ligands synthétiques 25
1.4.2.1. Les benzodiazépines 25
1.4.2.2. Le PK 11195, un dérivé des isoquinoléines carboxiamides 26

1.5. Hypothèse de mécanisme de transport par la TSPO 27

1.6. Données structurales acquises sur la TSPO 28

2. LES SYSTEMES D'EXPRESSION DES PROTEINES MEMBRANAIRES POUR LES ETUDES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES 31

2.1. Expression en système procaryote 33

2.2. Expression en système eucaryote 33
2.2.1. Les levures 33
2.2.2. Expression en cellules d'insectes et de mammifères 34

2.3. Système acellulaire 34

3. OBJECTIF DE LA THESE 35

II. MATERIELS ET METHODES 37

1. MATERIELS 37

1.1. Souches bactériennes Escherichia coli **37**

1.2. Vecteur plasmidique pET-15b **38**

1.3. Milieux de culture **39**

1.4. Détergents et lipides **40**

2. METHODES 42

2.1. Plasmides **42**
2.1.1. Préparation des bactéries compétentes (BL21 et XL1Blue) 42
2.1.2. Transformation des bactéries 42

2.2. Cultures des bactéries **43**
2.2.1. Milieu riche 43
2.2.2. Milieu minimum 43
2.2.2.1. Marquage total 44
2.2.2.2. Marquage sélectif 44

2.3. Mutagenèse dirigée **47**
2.3.1. Principe 47
2.3.2. Extraction du plasmide 47
2.3.3. Choix des oligonucléotides 47
2.3.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 48
2.3.5. Amplification du plasmide 49
2.3.6. Transformation des bactéries pour la production protéique 50

2.4. Purification de la protéine recombinante **50**
2.4.1. Extraction 50
2.4.2. Purification sur résine fonctionnalisée NTA-Ni 50
2.4.2.1. Minipurification 51
2.4.2.2. Purification 51
2.4.2.3. Echange de détergent 52
2.4.3. Concentration 52

2.5. Caractérisation de la TSPO recombinante **52**
2.5.1. Dosage protéique 52
2.5.2. Dosage des détergents 53
2.5.3. Analyse protéique 54
2.5.3.1. SDS-PAGE 54
2.5.3.2. Coloration au nitrate d'argent 55
2.5.3.3. Coloration au bleu de Coomassie 55
2.5.4. Spectrométrie de masse 56
2.5.5. Dichroïsme Circulaire (DC) 56
2.5.6. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) 59
2.5.7. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes 59
2.5.8. Mesure de liaison de ligand 61
2.5.8.1. En détergent 61
2.5.8.1.1. La microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC) 61
2.5.8.1.2. Séparation des ligands libres et liés sur résine NTA-Ni 63
2.5.8.2. En protéoliposomes 64
2.5.8.2.1. Reconstitution 64
2.5.8.2.2. Liaison de ligands radioactifs 65

2.6. RMN **68**
2.6.1. Principe 68

2.6.2. Préparation des échantillons RMN 68

III. RESULTATS ET DISCUSSION 70

1. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA MTSPO 70

1.1. Expression dans E. coli **70**

1.2. Purification **70**

2. CARACTERISATION DE LA TSPO RECOMBINANTE EN SDS (MTSPO/SDS) 73

2.1. Mesure de la quantité de détergent **73**

2.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) **74**

2.3. Digestion trypsique **74**

2.4. Dichroïsme circulaire (DC) **75**

2.5. Fluorescence intrinsèque **76**

2.6. Spectrométrie de masse **77**

2.7. Etude comparative du repliement de la mTSPO/SDS **77**

3. CHANGEMENT DE L'ENVIRONNEMENT DE LA MTSPO RECOMBINANTE 79

3.1. Echange de détergent lors de la purification **79**

3.2. Dosage du détergent **80**

3.3. Digestion trypsique **80**

3.4. Dichroïsme circulaire **81**

3.5. Etude comparative du repliement de la TSPO recombinante en DPC (mTSPO/DPC) **82**

3.6. Ligands **84**
3.6.1. Fluorescence intrinsèque 84
3.6.2. Calorimétrie à titrage isotherme (ITC) 85
3.6.3. Séparation des ligands libres et liés 87

3.7. Reconstitution de la mTSPO dans des liposomes **88**
3.7.1. Mesure de liaison du PK 11195 90
3.7.2. Mesure de liaison du Cholestérol 91
3.7.3. Mesure de liaison de la PPIX 92

3.8. Etude de stabilité de la mTSPO par fluorescence intrinsèque **92**

4. ETUDES STRUCTURALES DE LA MTSPO 96

4.1. Cristallographie bidimensionnelle (2D) **96**

4.2. Cristallographie tridimensionnelle (3D) **99**

4.3. Etudes en solution 100

4.4. Surexpression de la mTSPO marquée 100

4.5. Purification de la mTSPO marquée 102

4.6. Caractérisation du taux de marquage des différentes mTSPO marquées 104

4.7. RMN 105

5. RELATIONS STRUCTURE FONCTION DE LA MTSPO 109

5.1. Site de liaison du PK 11195 109

5.2. Apport du marquage sélectif 113

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 117

V. BIBLIOGRAPHIE 124

VI. LISTE DES FIGURES 140

VII. LISTE DES TABLEAUX 145

VIII. ANNEXES 147

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

ANT: Adénine Nucléotide Translocase

ADNc : ADN complémentaires des ARN messagers

CRAC : Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus

CMC : Concentration Micellaire Critique

DC: Dichroïsme Circulaire

DBI: Diazepam Binding Inhibitor

DDM: n-DoDécyl-β-D-Maltoside

DHPC: 1,2-DiHexanoyl-*sn*-glycéro-3-PhosphoCholine

DMPC: 1,2-DiMyristoyl-*sn*-glycéro-3-PhosphoCholine

DMPG: 1,2-DiMyristoyl-*sn*-glycéro-3-[Phospho-rac-(1-Glycérol)]

DPC: DodécylPhosphoCholine

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

IPTG: IsoPropyl-β-D-Thio-Galactoside

LMPE: 1-Myristoyl-2-hydroxy-sn-glycéro-3-PhosphoEthanolamine

MME: Membrane Mitochondriale Externe

MMI: Membrane Mitochondriale Interne

ME : Microscopie électronique

NTA : Acide NitriloTriAcétique

PBR: Peripheral Benzodiazepine Receptor - récepteur périphérique aux benzodiazépines

PC: PhosphatidylCholine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE: PhosphatidylEthanolamine

PK11195 : 1-(2-chlorophényl)-N-méthyl-N-(1-méthyl-propyl)-3-isoquinoléinecarboxamide

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Ro5-4864: 7-chloro-5-(4-chlorophényl)-1,3-dihydro-1-méthyl-2H-1,4-benzodiazépin-2-one

ROS: Reactive Oxygen Species

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate ou laurylsulfate de sodium

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS)

SNC : Système Nerveux Central

TSPO : TranSlocation PrOtein - protéine de translocation

VDAC: Voltage Dependent Anionic Channel - canal anionique voltage-dépendant

Introduction

INTRODUCTION

1. La TSPO, une protéine membranaire

1.1. Historique

Les benzodiazépines forment une classe de médicaments psychotropes utilisés pour traiter divers troubles du comportement tels que l'insomnie, l'anxiété, les convulsions, les spasmes, l'agitation psychomotrice ou dans le cadre d'un traitement du syndrome de sevrage alcoolique (Gavish et al., 1999). Ils agissent sur le système nerveux central comme des agonistes de neurotransmetteurs/neuromodulateurs tels que l'acide-γ-aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur du système nerveux central (SNC).

En 1977, l'utilisation de tissus du système nerveux périphérique de rat comme témoin négatif de la fixation du diazépam (Valium®), une benzodiazépine ciblant un récepteur du SNC appelé CBR (Central Benzodiazepine Receptor), a permis la découverte de nouveaux site de liaison ayant une affinité comparable à celle du SNC (Braestrup et al., 1977). Ces sites ont été localisés dans divers tissus périphériques tels que le rein, le foie et le poumon, ce qui a valu à la protéine impliquée le nom de récepteur périphérique aux benzodiazépines, ou **PBR** pour Peripheral-type Benzodiazepine Receptor (Gavish et al., 1999).

Par la suite, la distribution du PBR s'est révélée plus ubiquitaire avec une présence dans le SNC (Benavides et al., 1983) et de larges variations d'expression en fonction des tissus. De fortes différences pharmacologiques, physiologiques et structurales entre le PBR et le CBR ont été caractérisées (Gavish et al., 1999). La présence ubiquitaire du PBR et non uniquement périphérique, la mise au point de ligands pharmacologiques n'appartenant pas à la famille des benzodiazépines, la caractérisation d'une fonction de transport de molécules et non de récepteur ont conduit en 2006 (Papadopoulos et al., 2006) à une modification du nom de la protéine en TSPO (TranSlocase PrOtein), reflétant sa fonction principale de transport décrite en détail plus loin. Cette nouvelle appellation est aussi liée à l'orthologue bactérien de *Rhodobacter sphaeroides* nommé TspO pour « tryptophan-rich sensory protein » ne liant pas les benzodiazépines (Yeliseev et Kaplan, 2000).

1.2. Localisation cellulaire et la distribution tissulaire de la TSPO

La localisation subcellulaire de la TSPO a été caractérisée principalement au niveau de la mitochondrie lors des études de liaison par l'utilisation du ligand le plus spécifique [^{3}H]-PK 11195. Les premières caractérisations ont été réalisées sur des glandes surrénales de rat (Anholt et al., 1986), puis dans d'autres tissus tels que les testicules, le poumon, le rein, le

cœur, le foie et le muscle squelettique (Antkiewicz-Michaluk et al., 1988). Plus tard, sa localisation a été plus détaillée en montrant un enrichissement de la protéine dans la membrane externe au niveau des sites de contact entre cette dernière et la membrane interne (Culty et al., 1999).

Bien que la TSPO soit principalement située dans les membranes des mitochondries, une étude a démontré son existence dans des membranes plasmiques, notamment des globules rouges connus pour être dépourvus de mitochondries et de noyaux (Olson et al., 1988). D'autres études ont suggéré par la suite une localisation au niveau de la membrane plasmique de certains organes périphériques tels que le foie (O'Beirne et al., 1990, Woods et al., 1996), mais aussi au niveau de la membrane nucléaire de plusieurs types de cellules: tumorales mammaires (Hardwick et al., 1999), gliales du SNC (Kuhlmann et Guilarte, 2000) et tumorales hépatiques (Corsi et al., 2005).

La TSPO est largement distribuée dans le corps, mais son expression varie considérablement d'un organe à un autre. Les tissus glandulaires et de sécrétion tels que les glandes surrénales, la glande pinéale, les glandes salivaires, l'épithélium olfactif et les gonades présentent une expression particulièrement forte de la TSPO (Papadopoulos et al., 2006, Ostuni et al., 2008), les tissus rénal et myocardique montrent des niveaux intermédiaires (Gavish et al., 1999). En revanche, le foie et le cerveau expriment des niveaux relativement faibles (Gavish et al., 1999).

Au caractère ubiquitaire de la protéine s'ajoute une hétérogénéité de son expression au sein même d'un organe : une localisation essentiellement au niveau des cellules de Leydig dans les testicules et au niveau de l'anse de Henlé dans le rein (De souza et al., 1985); une présence au niveau du cortex dans le cerveau mais une absence au niveau de la médullaire (Anhoult et al., 1986). La TSPO est également exprimée dans les cellules sanguines circulantes avec les concentrations les plus élevées dans les monocytes et les polynucléaires neutrophiles (Canat et al., 1993).

1.3. Les différentes fonctions de la TSPO et ses partenaires protéiques

L'expression variable de la TSPO selon les tissus ainsi que les différences observées dans les études de localisation membranaire (plasmique, mitochondriale, nucléaire) pose des questions sur la fonction et le rôle de la protéine selon le tissu considéré.

1.3.1. La fonction de transport du cholestérol

La fonction la mieux caractérisée est le transport du cholestérol à travers la membrane externe mitochondriale (Anholt et al., 1985). La TSPO possède une haute affinité pour le cholestérol de l'ordre du nanomolaire (Lacapere et al., 2001). Il a été décrit (Figure I. 01) que le transfert du cholestérol du cytosol vers la matrice de la mitochondrie se produit à travers plusieurs complexes protéiques impliquant la TSPO, appelés le « transduceosome » (Liu et al., 2006) et le « metabolon » (Rone et al., 2012). La régulation du flux de cholestérol vers la mitochondrie est initié par les différentes composantes cytosoliques du transduceosome qui apportent le cholestérol à la TSPO (Liu et al., 2006), l'ACBD3 (*acyl-coenzyme A binding domain containing 3 protein*), la PKA-R1α (*cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit Ialpha*) et STAR (*steroidogenic acute regulatory protein*). Le transport du cholestérol à travers les deux membranes mitochondriales et son transfert vers le cytochrome P450 (CYP11A1) responsable de la formation des précurseurs des stéroïdes ou des sels biliaires (Lacapère et Papdopoulos, 2003) est assuré par le metabolon (Rone et al, 2012). Les protéines membranaires TSPO et VDAC (Voltage Dependant Anionic Chanel) sont directement impliquées dans le passage du cholestérol à travers la membrane externe de la mitochondrie (Rone et al, 2012). Le transfert du cholestérol à travers la membrane interne mitochondriale est assuré par ATAD3A dont le N-terminal est ancré dans la membrane externe (Gilquin et al., 2010). L'implication des membranes interne et externe des mitochondries dans le processus de formation de stéroïdes a été mise en évidence il y a de nombreuses années puisqu'une localisation majoritaire de la TSPO a été observée au niveau des sites de contact entre la membrane externe et interne de la mitochondrie (Culty et al., 1999). Plus récemment il a été proposé que la TSPO formait des polymères régulant le transport de cholestérol (Delavoie et al., 2003) et la vitesse de formation des stéroïdes (Rone et al, 2012)

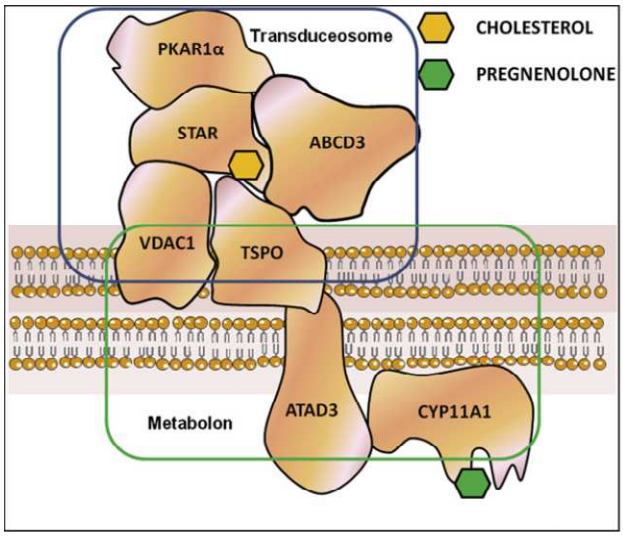


Figure I. 01 : Schéma des différentes protéines formant le transduceosome et le metabolon, complexes impliqués dans la régulation de la stéroïdogenèse (Issop et al., 2013).
Dans les tissus stéroïdogéniques, le « Transduceosome » est activé en réponse à une stimulation hormonale permettant d'activer une voie de signalisation AMPc-dépendante qui va activer la protéine kinase A (PKA-RIalpha: *cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit Ialpha*). Cette protéine interagit avec ABCD3 (*acyl-coenzyme A binding domain containing 3 protein*) et permet la phosphorylation de la protéine STAR (*steroidogenic acute regulatory protein*). Sous cette forme phosphorylée, la protéine STAR possédant un domaine C-terminal ancré dans la membrane externe de la mitochondrie est capable d'interagir avec les protéines du « Metabolon » telles que la TSPO et VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channe)*. Le cholestérol apporté par STAR peut être transporté à travers la membrane externe par la TSPO, puis à travers la membrane interne par l'ATAD3 (AAA+ATPaseDomain3) et dirigé vers CYP11A1 (CYtochrome P450, Cholesterol side-chain cleavage enzyme) qui va convertir le cholestérol en prégnénolone, précurseur des stéroïdes.

1.3.2. La régulation de la biosynthèse et la biodégradation des porphyrines

Des taux d'expression élevés de la TSPO ont été détectés par autoradiographie *in situ* dans la moelle osseuse de rats (Anholt et al., 1985), cet organe hématopoïétique est le lieu de fabrication majeur des cellules sanguines telles que les érythrocytes qui transportent l'oxygène via l'hémoglobine. Une localisation au niveau de plusieurs cellules du système sanguin a été également montrée (Canat et al., 1993). Ces données ont posé la question d'une implication possible de la TSPO dans la biosynthèse des hèmes, et plus particulièrement du rôle de la TSPO dans la translocation des porphyrines, intermédiaires de la biosynthèse des hèmes, à travers la membrane externe des mitochondries.

Des expériences *in vitro* (sur des cellules et avec la TSPO recombinante) ont montré que la TSPO pouvait lier plusieurs types de porphyrines telles que la coproporphyrine III (précurseur produit dans le cytosol), la protoporphyrine IX (PPIX) et l'hème (une porphyrine avec un ion Fer) (Verma et al., 1987 ;Taketani et al., 1995; Wendler et al., 2003). Récemment, une fixation *in vivo* de la PPIX sur la TSPO chez le rat a été observée par imagerie (Ozaki et al., 2010).

Bien que la liaison des porphyrines telles que l'hème, la coproporphyrine III et la PPIX sur la TSPO a bien été mise en évidence dans plusieurs espèces et plusieurs tissus, son implication dans la biosynthèse de l'hème et le mécanisme de translocation à travers les membranes des mitochondries n'est pas encore élucidé. A quel moment la TSPO pourrait-elle intervenir dans le métabolisme de l'hème (Figure I. 02) ? La TSPO intervient-elle seule ou en formant des complexes? Nous pouvons suggérer que la TSPO peut être impliquée dans :

(i) la translocation de l'acide aminolévulinique (ALA) de la matrice mitochondriale vers le cytosol où il est transformé après plusieurs réactions en coproporphyrinogène III

(ii) la translocation du coproporphyrinogène III du cytosol vers l'espace intermembranaire mitochondrial où il est transformé en protoporphyrinogène IX, qui à son tour est transformé en protoporphyrine IX et en hème après fixation d'un atome de fer;

(iii) la sortie de l'hème de la mitochondrie pour les protéines à hème non mitochondriales, comme l'hémoglobine, la myoglobine et les oxydases.

(iv) la sortie de la protoporphyrine IX de la mitochondrie en cas d'hyperproduction par exemple.

Toutes ces hypothèses restent à vérifier et en particulier si la TSPO agit seule ou sous forme de complexe.

La TSPO pourrait aussi participer à la dégradation des porphyrines. En effet, il a été montré que At-TSPO, orthologue chez les plantes, est un régulateur potentiel de différents stress

abiotiques (exercés par un changement d'environnement comme des carences). L'expression de l'At-TSPO est induite uniquement quand les conditions environnementales sont défavorables. Elle permet à la cellule d'éliminer les molécules d'hème libre dans le cytosol, via la formation d'un complexe protéine - ligand et sa dégradation par la voie de l'autophagie (Vanhee et al., 2011).

Il a été récemment montré également que la TSPO bactérienne est directement impliquée dans la biodégradation des hèmes (Ginter et al., 2013). Elle catalyse la dégradation des porphyrines d'une manière dépendante de l'oxygène et la lumière. Ceci est en accord avec des travaux précédents montrant que la TSPO bactérienne était impliquée dans la croissance bactérienne en régulant le taux de gènes photosynthétiques à travers le contrôle des pigments tetrapyroliques (Yeliseev et Kaplan, 1999). Cette régulation pourrait protéger les plantes et les bactéries de l'effet oxydatif de l'accumulation des porphyrines (Ginter et al., 2013, Vanhee et al., 2011). Dans les cellules de mammifères, la dégradation de l'excès de PPIX dépend non seulement de la TSPO, mais aussi des espèces réactives de l'oxygène, en effet, la présence seule de la TSPO ne suffit pas à cette dégradation (Zeno et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la régulation des porphyrines par la TSPO est une fonction conservée chez les bactéries et les plantes et qui aurait évolué chez les mammifères (Ginter et al., 2013).

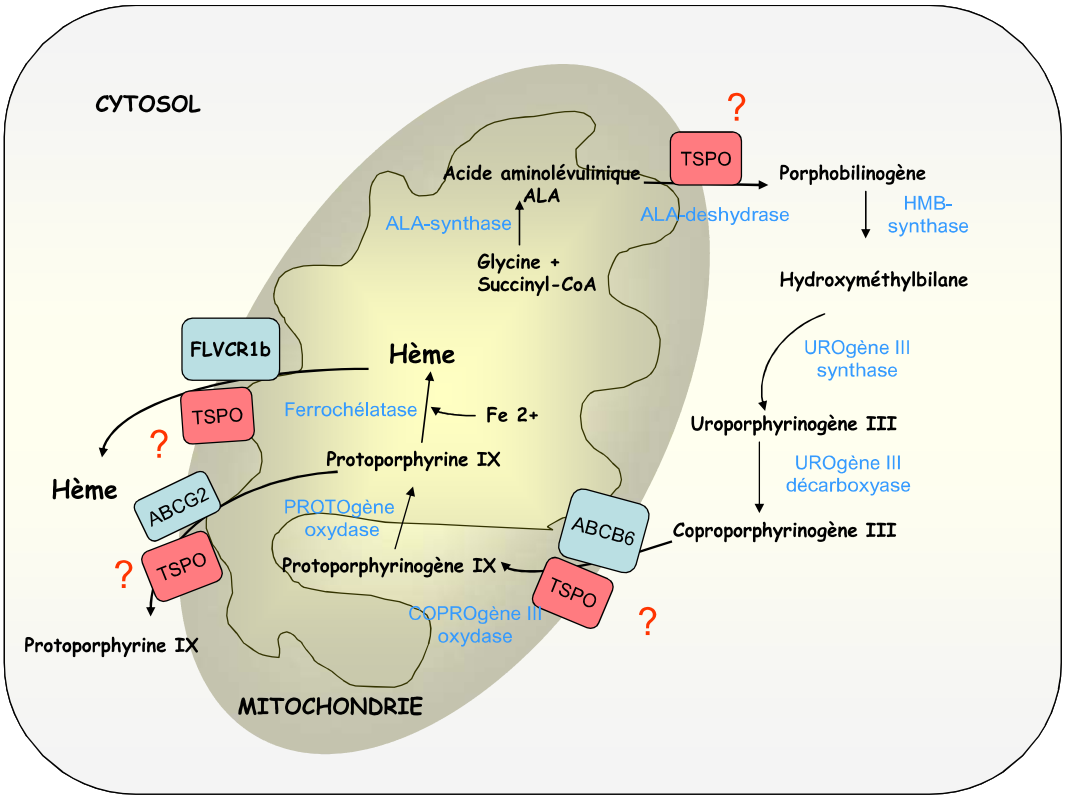


Figure I. 02 : Schéma illustrant l'implication hypothétique de la TSPO dans la biosynthèse de l'hème.

1.3.3. Le transport d'ions et de nucléotides

Des études de solubilisation et de co-immunoprécipitation de protéines mitochondriales de rein de rat ont suggéré une interaction de la TSPO avec le VDAC et ANT (Figure I. 03) au niveau des membranes mitochondriales (McEnery et al., 1992). Le VDAC et l'ANT sont des protéines intervenant dans les flux ioniques et les transports de nucléotides dépendants du potentiel de membrane (Veenman et al., 2008), suggérant l'implication de la TSPO dans la régulation de ces flux.

L'ANT, localisé dans la membrane interne des mitochondries, permet l'échange de l'ATP produit dans la matrice mitochondriale avec l'ADP du cytosol. Il a été suggéré que le passage de l'ADP à travers la membrane externe pourrait impliquer le VDAC (Shoshan-Barmatz & Ben Hail, 2012). Le rôle de la TSPO n'est pas clairement documenté, mais il pourrait réguler le fonctionnement du VDAC.

Il a été montré que la TSPO est impliquée dans le transport d'ions dans les astrocytes (Gandolfo et al., 2001), dans le rein (Basile et al., 1988) et dans la muqueuse gastrique (Ostuni et al., 2004). Dans ce dernier cas, le mécanisme proposé est que l'activation de la TSPO par ses ligands provoque une augmentation du calcium cytosolique (sortie de calcium de la mitochondrie), induisant une activation de canaux présents dans les membranes plasmiques et conduisant à la sécrétion du chlore par les cellules (Ostuni et al., 2004).

Il existe aussi des flux entrants de calcium dans la mitochondrie, une forte augmentation de la concentration est à l'origine de l'induction de l'apoptose (Veenman et al., 2008; Shoshan-Barmatz & Ben Hail, 2012). Il a été décrit depuis de nombreuses années que ce flux était dû à un pore de transition de perméabilité (PTP) dont la composition protéique reste à ce jour non élucidée (Bernardi 2013). L'implication de la TSPO a été de nombreuses fois évoquée par plusieurs équipes, mais on peut noter que la même groupe a donné 2 avis opposés sur son implication à quelques années d'intervalle (Sileikyte et al., 2011 et 2014).

1.3.4. La régulation des radicaux libres

Le stresse oxydatif accompagné de l'accumulation du calcium et la diminution de l'ATP induit la modification de la perméabilité mitochondriale par la formation des pores de transition de perméabilité (PTP). La présence de la TSPO dans les mitochondries a fait l'objet de nombreuses études sur les interactions de la TSPO avec la chaîne respiratoire, source de production de ROS (Figure I. 03), et son implication dans le PTP (Sileikyte et al., 2011; Bernardi 2013). Cependant le rôle exact de la TSPO n'est pas encore complètement élucidé. En effet, des études ont montré un effet inhibiteur des ligands de la TSPO sur la

consommation d'oxygène dans les mitochondries de rein, foie et glandes surrénales chez le rat (Hirsch et al. 1988) suggérant une possible interaction avec les enzymes de la chaîne respiratoire (Veenman et Gavish 2006). D'autre études ont montré, que dans les cellules hématopoïétiques, une surexpression de la TSPO dans les cellules résistantes au peroxyde d'hydrogène, suggérant un rôle possible de la protéine dans un mécanisme antioxydant qui pourrait impliquer les porphyrines (Carayon et al., 1996) ou la régulation de la superoxyde dismutase (Wright et al., 1999). Plus récemment, il a été montré que la TSPO et ses ligands étaient impliqués dans la réponse inflammatoire, par exemple dans l'ischémie de perfusion (Faure et al., 2002, Favreau et al., 2009) ou dans les maladies neurodégénératives (revue de Papadopoulos et al., 2006) dans lesquelles la production de ROS est importante. La TSPO pourrait agir en "absorbant" l'excès de ROS en formant des polymères covalents avant sa biodégradation (Delavoie et al., 2003). Une récente étude a montré l'effet inhibiteur d'un ligand exogène de la TSPO sur l'hypertrophie cardiaque induite par le stress oxydatif chez le rat, suggérant encore l'implication de la TSPO dans la régulation des radicaux libres (Jaiswal et al., 2010).

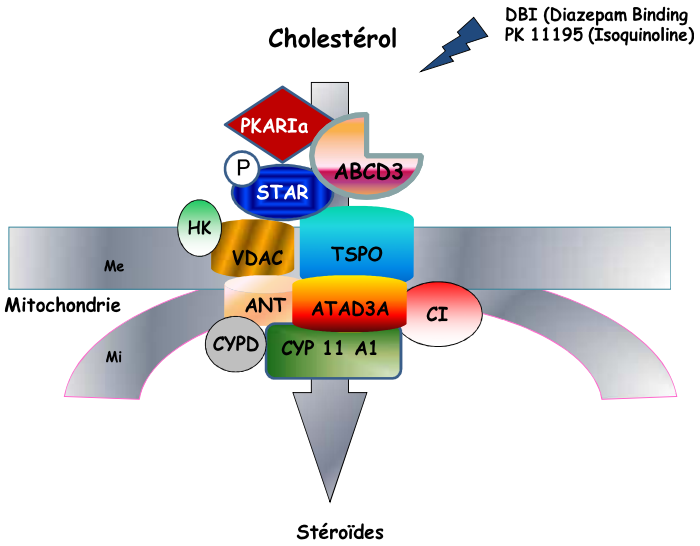


Figure I. 03 : Schéma des différentes protéines interagissant avec la TSPO. PKA-RIalpha (cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit Ialpha), ABCD3 (acyl-coenzyme A binding domain containing 3 protein), STAR (steroidogenic acute regulatory protein),VDAC (Voltage-Dependent Anion Channe, TSPO (TranSlcation PrOtein), ATAD3 (AAA+ATPaseDomain3, CYP11A1 (CYtochrome P450, Cholesterol side-chain cleavage enzyme), CI (complexe I de la chaîne respiratoire), CYPD (Cyclophiline D), ANT (adénine nucléotide translocase), HK (héxokinase), Me (Membrane externe), Mi (Membrane interne).

1.3.5. Autres fonctions

Développement embryonnaire

La séquence de la TSPO est très conservée au cours de l'évolution (Fan et al., 2012). Il a été décrit que l'invalidation du gène (KO) chez la souris donne un phénotype embryonnaire létal (Lacapere & Papdopoulos, 2003) suggérant un rôle "vital" de la TSPO. Toutefois, chez le poisson zèbre, l'invalidation génique transitoire n'empêche pas le développement de ces poissons, mais conduit au dysfonctionnement de l'érythropoïèse (Rampon et al., 2009). De récentes études (Morohaku et al., 2014) d'invalidation génique conditionnelle de la TSPO dans les cellules de Leydig chez la souris montrent une production normale de testostérone (hormone stéroïdienne) avec une gamétogenèse et une reproduction normale. Ces résultats remettant en question le rôle essentiel de la TSPO dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes ont été contestés pour le choix des exons ciblés (Papdopoulos, 2014). Cette "révolution" a été récemment corroborée par l'obtention d'un KO viable chez la souris (Tu et al., 2014) contredisant les résultats précédents. Ces souris vivent normalement sans anomalies phénotypiques apparentes.

Régulation du métabolisme cellulaire lors de la prolifération cellulaire en particulier dans les cancers

Il a été proposé que la TSPO joue un rôle dans le mouvement du cholestérol entre les membranes mitochondriales externes et internes lors de leur biogenèse. Ceci a été proposé pour les cellules à prolifération rapide, comme les cellules tumorales dans lesquelles la TSPO est surexprimée (Veenman et al., 2008 ; Masser et al., 2005). On peut noter qu'il existe une littérature importante sur les effets parfois contradictoires des ligands de la TSPO (Veenman et al., 2008) tant sur la prolifération que l'apoptose.

1.4. Les différents ligands de la TSPO

1.4.1. Les ligands endogènes

1.4.1.1. Le DBI (Diazepam Binding Inhibitor)

Le DBI, un polypeptide de 86 acides aminés, est le précurseur commun des endozépines qui sont des ligands endogènes des différents récepteurs aux benzodiazépines (Guidotti et al., 1983). Il a été découvert par ses propriétés d'inhibition des effets du diazepam et ainsi initialement nommé DBI (Diazepam Binding Inhibitor). Plus tard il été montré que ce peptide appartenait à la famille des ACBP (Acyl CoA Binding Protein). Le clivage protéolytique du DBI conduit à différents peptides biologiquement actifs tels que DBI 17-50,

le triacontatétraneuropeptide (TTN) ou DBI 33-50, l'octadécaneuropeptide (ODN) (Ferrero et al., 1986 ; Slobodyansky et al., 1989). Au niveau moléculaire, l'ODN agit sur le CBR (Bormann et al., 1985), tandis que TTN est un ligand sélectif de la TSPO (Berkovich et al., 1990 , Gavish et al., 1997). Le TTN stimule la sécrétion d'aldostérone et de corticostérone à partir de cellules corticosurrénales de grenouille (Lesouhaitier et al., 1998). Récemment, il a été montré que l'administration de TTN provoquait une augmentation dose dépendante de la sécrétion de la testostérone au niveau de fragments testiculaires humains perfusés, tandis que l'ODN n'avait pas d'effet (Duparc et al., 2003).

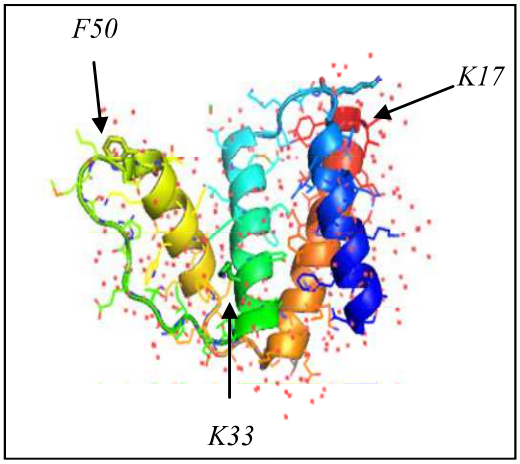


Figure I. 04 : DBI Humain. Image réalisée avec le programme PyMOL et le fichier PDB 2FJ9 ; les résidus indiqués correspondent aux sites de coupures donnant naissance aux fragments actifs ODN (33-50) et TTN (17-50).

La structure du DBI déterminée par RMN (Andersen et al., 1999) et par cristallographie (Taskinen et al., 2006) révèle le même assemblage de 4 hélices (voir figure I-4). Il est intéressant de noter que le TTN, peptide actif sur la TSPO correspond à une région contenant une seule hélice, mais que les acides aminés réellement impliqués dans l'interaction avec la TSPO ne sont pas caractérisés. Les études de modélisation et de dynamique moléculaires ont permis de suggérer la participation des résidus M46, L47 et F49 dans la partie C-terminale du peptide dans l'interaction avec la TSPO (Cinone et al., 2000).

1.4.1.2. Le Cholestérol

Le cholestérol est une molécule hydrophobe à l'exception de son groupe hydroxyle en position 3 β qui lui donne son caractère amphiphile. Il est formé d'un noyau tétracyclique stérol rigide, substitué par une chaîne iso-octyle flexible en position 17 et une fonction alcool en position 3 (Figure I. 05).

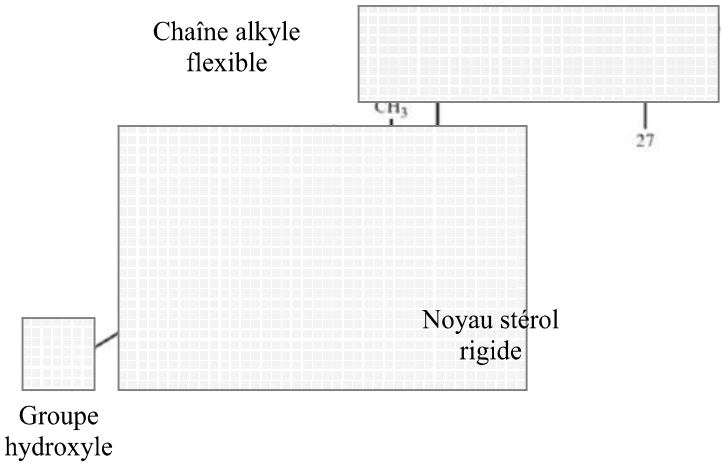


Figure I. 05 : **Eléments structuraux du cholestérol.**

Sa structure tridimensionnelle plane lui permet une interaction hydrophobe très favorable avec les phospholipides au sein de la bicouche lipidique de la membrane (Figure I. 06), en rendant cette dernière moins déformable (plus rigide) et en diminuant sa perméabilité aux petites molécules hydrosolubles.

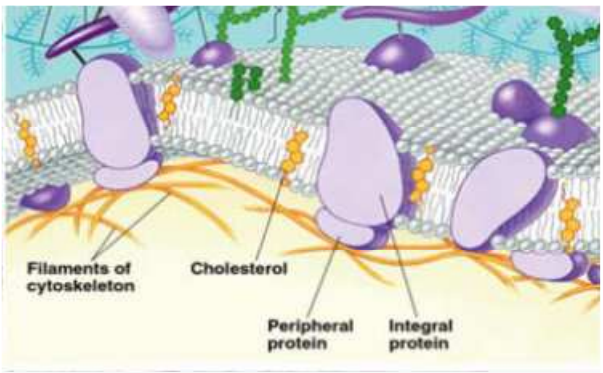


Figure I. 06 : Illustration du modèle de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson (1972).

Le cholestérol est le composant majeur des membranes cellulaires, il représente 20 a 25% des lipides totaux de la cellule. Il a par ailleurs une influence sur les nombreuses protéines présentes dans les membranes. Il module l'activité de ces protéines soit de manière non spécifique en influençant la dynamique membranaire (Lee et al., 2004), soit de manière spécifique en interagissant directement avec ces protéines en modifiant leur structure tridimensionnelle (Addona et al., 1998). Il a également été décrit, qu'il pouvait moduler l'oligomérisation fonctionnelle des protéines via sa dimérisation (Hanson et al., 2008).

Son interaction avec la TSPO se fait sur un site impliquant des résidus situés du côté C-terminal dans la séquence protéique, appelé CRAC pour Cholesterol-Recognition Amino Acid Consensus. (Li et Papadopoulos, 1998). Il se lie à la TSPO recombinante avec une affinité de l'ordre de 5 nM (Lacapere et al., 2001).

Le cholestérol est le précurseur de plusieurs molécules dans les cellules qui l'utilisent pour la formation de dérivés tels que les oxystérols et les hormones stéroïdiennes (cortisol, cortisone, et aldostérone dans les surrénales, mais aussi œstrogènes et testostérone dans les gonades). Dans le foie, le cholestérol provenant des tissus périphériques est métabolisé en acides biliaires et excrété vers l'intestin. Il est également le précurseur de la vitamine D3 qui intervient dans la calcification des os.

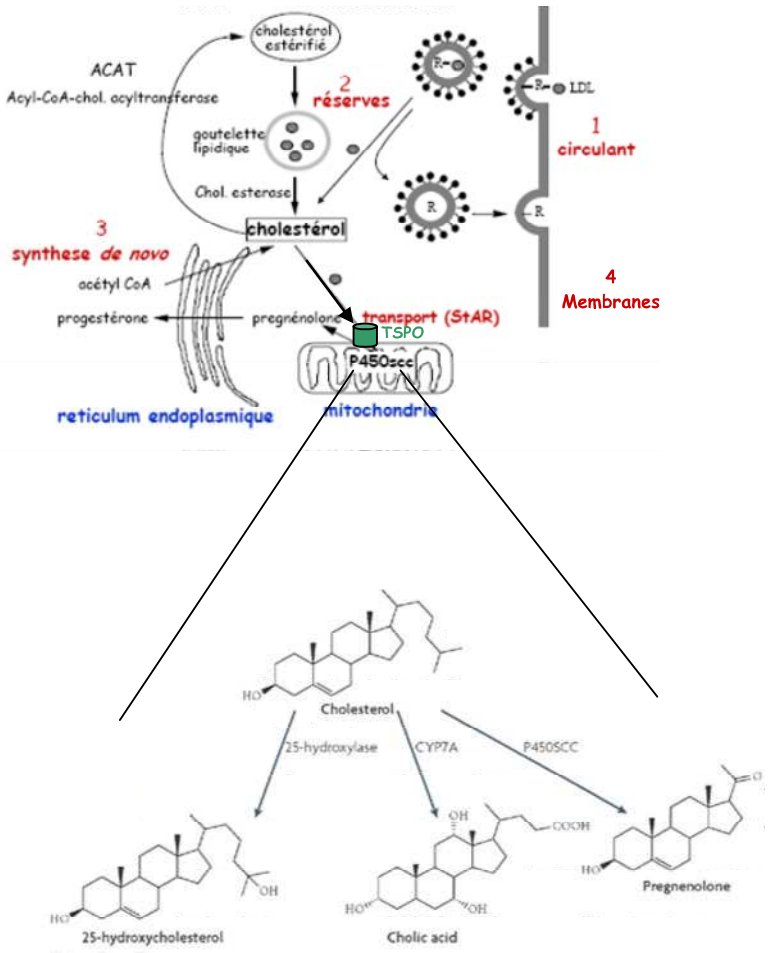


Figure I. 07 : Trafic et produits dérivés du cholestérol. Le cholestérol peut provenir de LDL (ou HDL) (1), des gouttelettes lipidiques (2), L'acétyl CoA permet la synthèse de cholestérol où l'HMG COA catalyse l'étape limitante de cette synthèse (3) et enfin des membranes (4). Le cholestérol sera utilisé comme précurseur de différentes voies métaboliques, la prégnénolone pour les stéroïdes, l'acide cholique pour les sels biliaires ou encore il peut subir une oxydation et former des dérivés appelés oxystérols (ici le 25 hydroxycholestérol).

Il existe quatre sources de cholestérol dans les cellules (Figure I. 07) (Miller et al., 2007) utilisables par la TSPO.

(1) Le cholestérol synthétisé *in cellulo* à partir de l'acétyl-CoA par l'intermédiaire de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique.

(2) Le cholestérol contenu dans les lipoprotéines circulantes (*High and Low Density Lipoprotein* : HDL et LDL) qui ont été absorbées par les cellules par endocytose.

(3) Le cholestérol contenu dans les gouttelettes lipidiques intracellulaires qui provient de cholestérol estérifié pour être mis en réserve dans ces gouttelettes.

(4) Le cholestérol constituant des membranes.

Le cholestérol issu des 3 premières sources est sans doute apporté à la TSPO par les composantes cytosoliques du "transdusosome" (Liu et al., 2006), alors que le cholestérol constituant des membranes interagit directement avec la TSPO, une source clairement démontrée (Krueger & Papadopoulos 1990).

1.4.1.3. Les porphyrines

Les porphyrines sont des molécules à structure cyclique (Figure I. 08) jouant un rôle essentiel dans les milieux vivants et participent à de nombreuses fonctions comme le transport et le stockage de l'oxygène (hémoglobine, myoglobine, protéines à hème), l'oxydation de substrats (cytochromes, protéines à hème), la photosynthèse dans les plantes et les bactéries photosynthétiques (chlorophylle), la synthèse de neuromédiateurs (Vitamine B12), ou encore la méthanogenèse chez les bactéries (coenzyme F430).

Toutes les porphyrines sont des pigments qui présentent à l'état libre et en lumière UV une magnifique fluorescence rouge, nettement détectable même peu concentrées, ce qui est un caractère analytique avantageux.

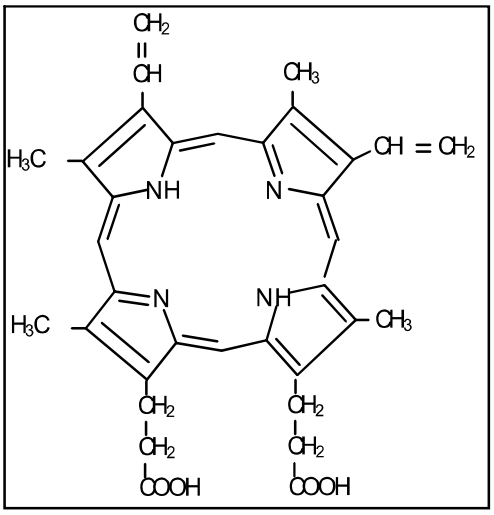


Figure I. 08 : **Formule chimique de la protoporphyrine IX et des produits biologiquement actifs**

La voie de biosynthèse des porphyrines est exclusivement endogène (Figure I. 02). Elle comporte une voie normale dont le produit final est la protoporphyrine IX, principale porphyrine chez les mammifères, et une voie accessoire où l'uroporphyrine III cosynthétase n'intervient pas et qui n'aboutit qu'à des composés éliminés dans les urines et les fèces. Les

dernières réactions de cette biosynthèse font intervenir une étape de traversée de la membrane mitochondriale (Krieg et al., 2000). Différentes porphyrines ont été identifiées comme ligands endogènes de la TSPO avec une affinité de liaison de l'ordre du nanomolaire (Verma et al., 1987 ; Verma et Snyder et al., 1988; Taketani et al., 1995; Wendler et al., 2003). Toutefois, le site de liaison de ces porphyrines sur la TSPO n'est pas clairement caractérisé. Des études de mutagenèse dirigée chez la bactérie suggèrent la participation de plusieurs résidus aromatiques positionnés dans des boucles mais aussi dans la partie membranaire (Yeliseev et Kaplan, 1999). D'autres travaux chez les plantes suggèrent un rôle important d'histidines (Vanhee et al., 2011). Ce type d'approche reste compliqué par le fait qu'il n'existe pas de mécanisme clair du transport de le la protoporphyrine IX par la TSPO qui pourrait orienter les mutations.

1.4.2. Les ligands synthétiques

La découverte de la TSPO, grâce à sa propriété de liaison du diazepam, a favorisé la synthèse de molécules spécifique de la TSPO, ayant une forte affinité (Anzini et al., 1996). Les différents ligands synthétisés regroupent plusieurs familles de molécules comportant toutes des assemblages polycycliques (voir par exemple Anzini et al., 1996; Cinone et al., 2000; Capelli et al., 2003; Capelli et al., 2008; Scarf et al., 2012).

1.4.2.1. Les benzodiazépines

Les benzodiazépines doivent leur nom à leur structure chimique commune : le noyau benzodiazépine. Parmi toutes les molécules synthétisées ayant des effets et des activités différentes, on peut en relever 3 (Figure I. 09): le diazépam, le chlorodiazépam et le flunitrazépam. L'addition d'un atome de chlore au diazepam pour former le 4-chloro-diazépam connu sous le nom de Ro5-4864 induit une meilleure affinité du composé pour la TSPO, par exemple sur les tissus digestifs (Ostuni et al., 2009). La présence de fluore et de nitro sur un noyau benzodiazépine pour former le Flunitrazépam, induit une baisse d'affinité par rapport au diazepam et au Ro5-4864 sur des cellules de côlon humain (HT-29) en culture (Ostuni et al., 2007). Le Flunitrazépam a été décrite comme un agoniste partiel de la TSPO, car il induit une faible stimulation de la synthèse basale des stéroïdes, et agit en revanche comme un inhibiteur de la stéroïdogenèse induite par l'AMPc (Papadopoulos et al., 1991).

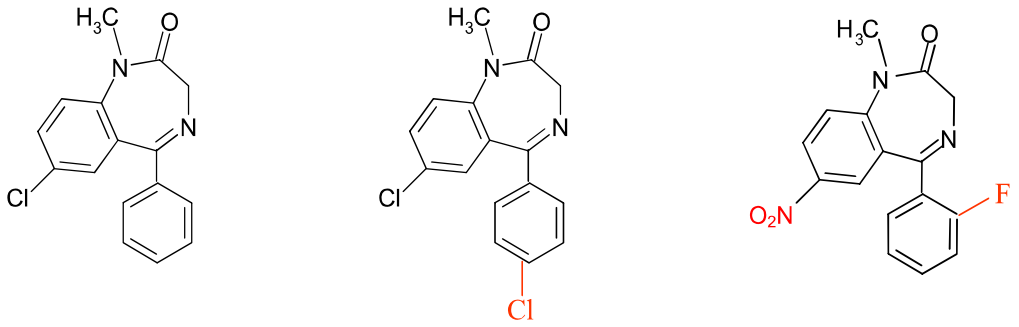


Figure I. 09 : **Structure moléculaire de 3 différentes benzodiazépines.** A gauche, le Diazépam (Valium), au centre, le 4-chloro-diazépam et à droite, le Flunitrazépam.

1.4.2.2. Le PK 11195, un dérivé des isoquinoléines carboxiamides

Le PK 11195 (1-(2-chlorophényl)-1,3-dihydro-1-methyl-propyl) isoquinoléine carboxamide) est le premier ligand non benzodiazépine développé capable de se lier à la TSPO avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Le Fur et al., 1983 (a,b,c)). Il est connu pour déplacer le Ro5-4864, une benzodiazépine spécifique de la TSPO, de son site de liaison (Le Fur et al., 1983). Il a été suggéré que leurs sites de liaison se chevauchent mais ne sont pas identiques (Farges et al., 1993). Il est par contre assez clair que les sites de liaison du cholestérol et du PK 111195 sont distincts (Wendler et al., 2003).

Du fait de la forte affinité du PK 11195 pour la TSPO, il a souvent été utilisé comme un outil pharmacologique de détection de la protéine ou de la validation de son expression, dans des cellules ou tissus, par l'analyse des propriétés de liaison (affinité, stoechiométrie) de la forme radiomarquée. On peut noter que ce composé existe sous différentes formes avec en particulier deux énantiomères (Figure I. 10) présentant des affinités très différentes (Dubroeucq et al., 1986). La structure atomique de la TSPO de souris a été résolue par RMN en solution grâce a la stabilisation la structure 3D par la fixation du *(R)*-PK 11195 (Jaremko et al., 2014), l'énantiomère possédant une affinité meilleure (Figure I. 10 (b)).

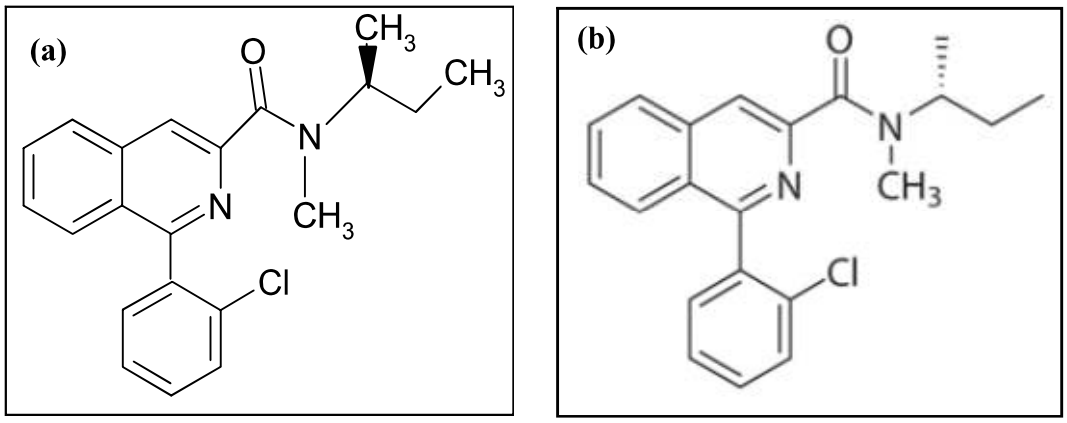


Figure I. 10 : Formule chimique représentant le PK 11195. (a) *(S)*-PK 11195 et (b) énantiomère *(R)*-PK 11195

On peut noter que ce même composé *(R)*-PK 11195 marqué au ^{11}C est utilisé en imagerie médicale (Kumar et al. 2010), mais les problèmes de spécificité et de solubilité ont conduit à développer de nouvelles molécules comme outils d'imagerie (Doorduin et al., 2008).

1.5. Hypothèse de mécanisme de transport par la TSPO

Les diverses études structurales et fonctionnelles conduites sur la TSPO suggèrent que le transport des molécules ne nécessite pas d'énergie (corroboré par l'absence de domaine de liaison des nucléotides sur la TSPO) et ne semble pas se faire en symport avec des ions (type transport de sucre couplé au Na ou K) mais qu'il se ferait plutôt par un échange du type transporteur de nucléotides qui échange l'ADP et ATP selon leur gradients respectifs. Cet échange pourrait être activée par un ligand. Notre hypothèse de fonctionnement propose dans un premier temps la liaison du cholestérol suivi par la liaison d'un ligand activateur (PK 11195 ou DBI, le ligand endogène). La liaison de ce dernier conduit à un changement de conformation de la TSPO permettant au cholestérol de traverser la membrane. Une fois le cholestérol libéré, une autre molécule située au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial (prégnénolone par exemple) se lierait à son tour à la TSPO. La dissociation du PK 11195 induirait un changement conformationnel qui permettrait la translocation de ce produit vers l'extérieur permettant de clore un cycle de transport (Figure I. 11) (Lacapere et Papadopoulos, 2003).

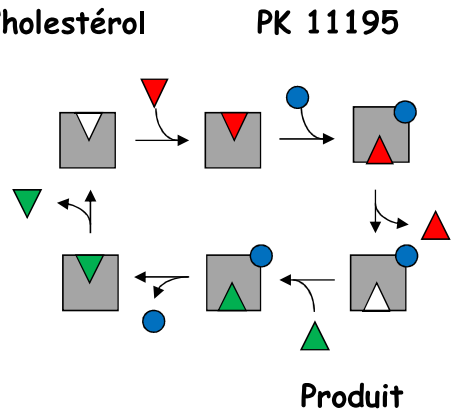


Figure I. 11 : Modèle hypothétique de transport du cholestérol par la TSPO. Dans ce modèle, la TSPO passerait par différents états conformationnels en fonction des ligands liés, le mécanisme impliquant une entrée de cholestérol dans la mitochondrie couplée à la sortie du produit final formé après transformation du cholestérol (par exemple la prégnénolone); cet échange se ferait par une stimulation induite par le PK 11195 (ligand exogène) ou le DBI (ligand endogène).

Les données de la littérature ne permettent pas actuellement de savoir si la TSPO transporte directement des porphyrines, il est cependant clair que le PK 11195 et la PPIX sont compétiteurs tant *in vivo* (Ostuni et al., 2009) que *in vitro* (Wendler et al., 2003) suggérant que s'il y a transport de PPIX, celui-ci ne serait pas activé par le PK 111195.

1.6. Données structurales acquises sur la TSPO

La séquence en acides aminés de la TSPO présente de fortes homologies à travers l'évolution de la bactérie à l'homme (Figure I. 12) et l'analyse de ces différentes séquences suggère la présence de 5 domaines hydrophobes (Fan et al., 2012). Les premiers travaux de topologie par marquage des épitopes ont caractérisé la nature transmembranaire de ces fragments (Joseph-Liauzin et al., 1998). Ensuite, des travaux de RMN sur des peptides synthétiques correspondants aux cinq domaines hydrophobes ont montré que leur repliement était en hélice α (Figure I. 13, Murail et al., 2008). L'analyse de la structure secondaire de la TSPO recombinante en solution par dichroïsme circulaire a montré que la protéine était composée majoritairement de cinq hélices transmembranaires (Jamin et Lacapère, 2007 ; Murail et al., 2008). On peut noter que cette structuration, comme pour beaucoup d'autres protéines membranaires, dépend de l'environnement comme la nature du détergent (Jamin et Lacapère 2007) et la présence du ligand (Montaville et al., 2010). L'analyse des spectres dichroïques en présence de différents détergents révèle des taux d'hélicité variables (Jamin et Lacapère 2007). Les spectres RMN 2D (^{1}H-^{15}N HSQC) montrent que la structure tertiaire de

TSPO est plutôt instable mais que l'introduction du ligand exogène PK11195 entraîne une stabilisation de la structure tertiaire (Murail et al., 2008).

En 2010, des cristaux bidimensionnels d'une forme bactérienne de la TSPO (*Rhodobacter sphaeroides*) ont été observés par cryomicroscopie électronique et ont permis d'obtenir un modèle tridimensionnel à faible résolution (10Å) (Korkhov et al., 2010). Dans ce modèle, la TSPO s'associe en dimère et on peut observer dans chacun des monomères un faisceau de cinq hélices α (Figure I. 14). En mars 2014, la première structure atomique de la TSPO de mammifères (souris) a été résolue par RMN en solution en micelle de détergent (DPC) et en présence de *(R)*- PK11195 (Jaremko et al., 2014).



Figure I. 12 : **Conservation de la séquence en acides aminés de TSPO chez différents mammifères.** Les séquences en acides aminés ont été obtenues par PSI Blast à partir de la séquence de TSPO humaine et alignées grâce à ClustalW. Les résidus présents dans les cinq domaines hydrophobes de TSPO sont indiqués en rouge, les Trp en vert et les Thr et Ser en bleu.

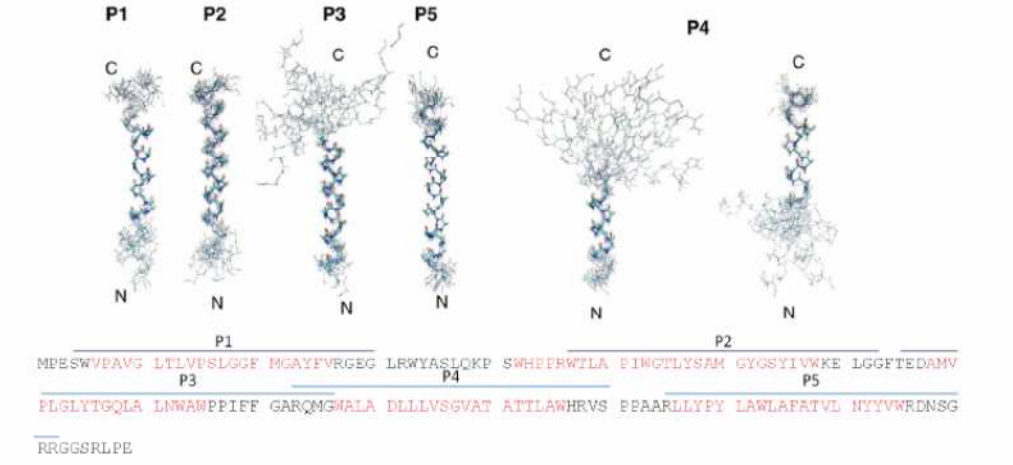


Figure I. 13 : **Structure des cinq peptides synthétiques recouvrant les cinq domaines hydrophobes de la mTSPO.** Les séquences en acides aminés des domaines P1, P2, P3, P4 et P5 correspondant aux cinq hélices sont indiquées sur la sequences en acides aminés de mTSPO (Murail et al., 2008).

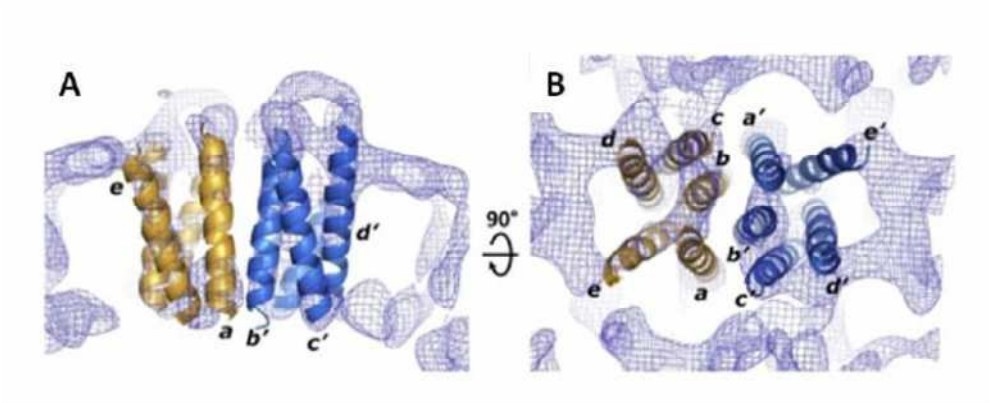


Figure I. 14 : **Modèle de TspO de** Rhodobacter sphaerosis **obtenu par l'analyse des données de cryomicroscopie électronique** (Korkhov et al., 2010). (A) Vue perpendiculaire au plan de la membrane du dimère de TSPO. Les hélices colorées en jaune et en bleu représentent chacune un monomère de TSPO et elle sont désignées de a-e et a'-e', de façon arbitraire. (B) Vue parallèle au plan de la membrane du dimère de TSPO.

Au niveau des sites de liaison, les premières données de la littérature disponibles ont été obtenues par mutagenèse dirigée et sont centrées sur les ligands activateurs (PK 11195 et Ro5-4864) (Farges et al., 1993; 1994), le cholestérol (Li et al., 1998; Jamin et al., 2005) et les porphyrines (Yeliseev & Kaplan, 2000; Vanhee et al., 2011). Les mutations réalisées pour étudier le site de liaison des ligands visaient à comprendre les différences entre espèces et entre PK 11195 et Ro5-4864. Elles impliquaient à la fois des résidus des boucles et de domaines transmembranaires. Il est intéressant de noter que la structure récemment publiée de la TSPO avec le PK 11195 lié (Jaremko et al., 2014) met en évidence un site de liaison du ligand au milieu des 5 hélices transmembranaires partiellement recouvert par la boucle reliant les TM1 et TM2 (Figure I. 15). Le site de liaison du cholestérol a été proposé d'être localisé le long de la TM5 (CRAC, Li & Papadopoulos, 1998), au sein d'une crevasse formée par des résidus aromatiques qui enserrent le noyau stérol alors que le groupe hydroxyl est chapeauté par une arginine et que la chaîne alkyle ferait face à des résidus hydrophobes comme la valine (Jamin et al., 2005).

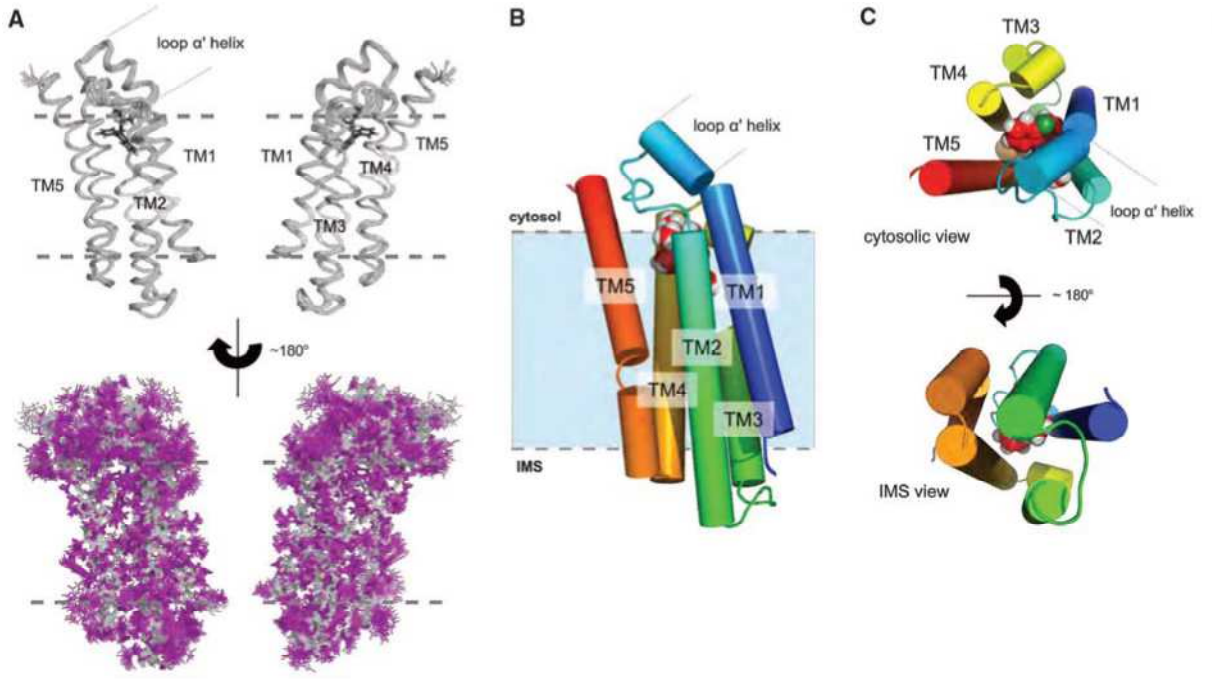


Figure I. 15 : Structure haute résolution de la TSPO de souris en complexe avec le PK 11195. (A) Vue de la chaîne des carbones alpha (partie supérieure) et de tous les atomes des 20 meilleurs modèles superposés avec les chaînes latérales couleur magenta alors que les carbones alpha sont en gris (partie inférieure). (B) Représentation en cylindre du modèle de plus basse énergie (les TM1 à 5 sont indiquées), le ligand est représenté sous forme de sphères. (C) Vues supérieure (cytosolique) et inférieure (espace mitochondrial intermembranaire, IMM) de la TSPO en complexe avec le PK 11195 (Figure issue de l'article de Jaremko et al. 2014).

2. Les systèmes d'expression des protéines membranaires pour les études structurales et fonctionnelles

Les études structurales et fonctionnelles des protéines membranaires sont contraintes par plusieurs facteurs: (i) l'abondance naturelle de la protéine d'intérêt pour pouvoir étudier sa fonction "au milieu" des autres, (ii) sa stabilité s'il faut la purifier, en particulier pour les études structurales. Les protéines membranaires nécessitent des précautions particulières par rapport aux protéines solubles, en raison de leur caractère mixte hydrophile - hydrophobe. L'utilisation de molécules tensioactives telles que les détergents permet d'extraire les protéines membranaires de la bicouche lipidique et de les maintenir solubles en solution aqueuse. Les détergents sont des molécules amphiphiles contenant une partie hydrophobe qui interagit avec les régions hydrophobes des protéines, déplaçant ou s'associant aux lipides, et une tête polaire qui se met en contact avec le milieux aqueux. La protéine est ainsi maintenue en solution sous forme d'un complexe détergent - protéine (avec ou sans lipides).

Pour les études fonctionnelles, il faut alors réincorporer les protéines membranaires purifiées en détergent dans des membranes en substituant le détergent par des lipides. De nombreuses

méthodes ont été décrites (pour une revue voir Rigaud et al., 1995) ainsi que de nombreux systèmes allant des protéoliposomes aux membranes séparant des compartiments (Koper, 2007).

Différentes méthodes expérimentales sont actuellement disponibles pour déterminer la structure atomique des protéines membranaires (pour une revue voir Lacapère et al., 2007): les approches cristallographiques couplées à la microscopie électronique ou à la diffraction de rayons X (RX) et l'approche non cristallographique par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

La cristallographie requiert l'obtention de cristaux stables présentant un pouvoir diffractant élevé. La formation de cristaux est souvent l'étape limitante. L'analyse par microscopie électronique ne peut se faire que sur des cristaux bidimensionnels plans ou tubulaires, et la difficulté majeure et incontournable est la formation d'empilement de cristaux (Lacapère et al., 2007). L'analyse par diffraction de RX sur des cristaux tridimensionnels peut être difficile en particulier pour obtenir l'origine des phases des données de diffraction du cristal car elle nécessite l'obtention de cristaux susceptibles de fixer les atomes lourds. Cette étape très délicate à cause de la fragilité du cristal peut être maintenant résolue par l'utilisation de cristaux de protéines recombinantes dont les méthionines sont substituées par des sélénométhionines (dans lesquelles un atome de sélénium remplace l'atome de soufre des méthionines) (Hendrickson et al., 1990).

La résolution de la structure des protéines par RMN est obtenue à partir de la mesure des distances entre les atomes au sein d'une molécule qui est majoritairement composée d'hydrogène, carbone et azote et pour cela il faut pouvoir les détecter. Les isotopes naturels ne sont pas tous observables par RMN, seuls les ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C le sont facilement. L'abondance naturelle des isotopes ^{15}N et ^{13}C n'est pas suffisante pour obtenir de bonne sensibilité, il faut donc enrichir les protéines d'intérêt. Par contre, l'abondance naturelle du ^{1}H, proche de 100%, donne des spectres d'autant plus complexes que la molécule contient beaucoup de résidus et il peut être utile de réduire ce signal en travaillant avec des échantillons marqués ^{2}H. Ces enrichissements peuvent être obtenus lors de la production de protéines recombinantes en utilisant des sources isotopiquement enrichies. Dans les protéines de grande taille, la deuteration permet également de diminuer les vitesse de relaxation des noyaux observés, conduisant à une meilleure sensibilité et une meilleure sésolution.

Quelleque soit l'approche, les études structurales requièrent en général non seulement des quantités importantes d'échantillons, car il faut souvent réaliser de nombreux essais, mais aussi des concentrations élevées. En raison de sa faible abondance naturelle et son association

avec différents complexes protéiques (Papadopoulos et al., 2006 ; Rone et al., 2012 ; Issop et al., 2013), la purification de grandes quantités de TSPO pure à partir de tissus est une tâche très difficile. Ainsi, la surexpression de TSPO recombinante dans des cellules hétérologues a été très tôt développée mais essentiellement pour des études fonctionnelles (Sprengel et al., 1989 ; Parola et al., 1991; Riond et al., 1991; Garnier et al., 1994; Joseph – Liauzin et al., 1995; Li et Papadopouls, 1998). Les approches structurales (RX et RMN) nécessitent des protéines marquées qui sont facilement obtenues par certains systèmes d'expression. Les principaux modes de production utilisés pour les protéines membranaires sont détaillés ci-dessous (pour une revue Kim et al., 2009).

2.1. Expression en système procaryote

Dans les systèmes procaryotes, la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est la plus utilisée pour l'expression des protéines recombinantes membranaires en vue de leurs études structurales (Kim et al., 2009 ;Wang et al., 2003). En effet, le recours à la surexpression dans ce système permet également le développement de stratégies de marquages. C'est un système simple puisqu'il suffit d'introduire dans la bactérie le gène à exprimer à l'aide d'un des nombreux vecteurs plasmidiques disponibles dans le commerce. Ce système peut être facilement utilisé pour la culture de masse en bioréacteur et permet d'obtenir des grandes quantités de protéines (jusqu'à plusieurs mg par litre de culture) et de répondre aux exigences des études structurales. Il est également rapide en raison du temps de dédoublement très court de la bactérie. Enfin, il est peu coûteux du fait de la simplicité du milieu de culture. Un grand nombre de protéines dont la structure a été résolue ont été exprimées dans ce système.

On peut noter que ce système présente plusieurs inconvénients : (i) la surexpression de certaines protéines de mammifères dans *E. coli* entraîne souvent le stockage des protéines en corps d'inclusion, ce qui peut conduire à la production de protéines non fonctionnelles; (ii) ce système n'est pas capable de réaliser les modifications post-traductionnelles des protéines qui en ont besoin pour être actives.

2.2. Expression en système eucaryote

2.2.1. Les levures

Les deux principaux organismes utilisés sont *Sacharomyses cerevisiae* et *Pichia pastoris*. Ces systèmes d'expression possèdent la machinerie nécessaire à la production de protéines fonctionnelles comme celles contenant des ponts disulfure nécessaires à leur structuration, ou celles ayant besoin de modifications post-traductionnelles (glycosylation,

phosphorylation, carboxylation...). Ils présentent les mêmes avantages que les procaryotes, car leur matériel génétique est simple et ils ne présentent aucune toxicité. Les taux d'expression des protéines sont relativement bons. L'incorporation des isotopes ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H est possible, cependant le marquage spécifique via ces systèmes d'expression semble plus complexe qu'en bactéries, notamment pour les levures methylotrophes comme *Pichia pastoris* (Kim et al., 2009).

2.2.2. Expression en cellules d'insectes et de mammifères

Ces systèmes comprennent des cellules d'insectes infectées par le baculovirus et des cellules de mammifère dont les plus couramment utilisées sont les lignées CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) et d'une façon moindre les lignées BHK (*Baby Hamster Kidney cells*). Ils sont particulièrement intéressants car ces cellules permettent de produire des protéines actives. En effet, ces cellules renferment tout le matériel nécessaire pour permettre le bon repliement des protéines membranaires et assurer les modifications post-traductionnelles nécessaires à certaines protéines membranaire eucaryotes (Kim et al., 2009).

Le marquage aux isotopes ^{15}N et ^{13}C est possible via ces systèmes d'expression, notamment grâce à l'utilisation de milieux marqués disponibles dans le commerce. Cependant, le faible rendement et le coût élevé de l'obtention de protéines recombinantes marquées principalement pour le marquage ^{2}H reste une limite de leur utilisation (Kim et al., 2009). Alors que le marquage à la sélénométhionine des protéines recombinantes peut souvent atteindre 100% avec le système *E. coli*, il est très variable avec les cellules d'insectes (Nettleship et al., 2010).

2.3. Système acellulaire

Le système acellulaire (cell-free) est une alternative aux systèmes d'expression bactérienne et eucaryote particulièrement intéressante pour la production des protéines membranaires marquées isotopiquement, pour des protéines toxiques pour les systèmes d'expression, pour l'insertion directe dans un milieu lipidique (Klammt et al., 2004; 2007). Il a pour principe l'utilisation d'extrait de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la bactérie *E. coli* pour produire une protéine spécifique à partir d'un plasmide. Les acides aminés marqués, les lipides sont ajoutés directement dans le milieu réactionnel. Le marquage spécifique de certain acides aminés a été développé avec succès évitant les problèmes de dilution observés dans les bactéries (Kim et al., 2009). Ce système est très prometteur mais il reste relativement onéreux.

En conclusion, on peut noter que le choix d'un système d'expression n'est pas simple, un grand nombre d'études sont menées pour une optimisation de ces systèmes, notamment l'utilisation de vecteurs contenant des promoteurs d'expression non seulement pour *E. coli*, mais aussi pour les cellules d'insectes infectées par les baculovirus et les cellules de mammifères permettant ainsi de tester plusieurs systèmes avec la même construction (Nettleship et al., 2010).

3. Objectif de la thèse

Au départ de mon projet de thèse, il n'y avait aucune structure de la TSPO et les seules données disponibles étaient la présence cinq domaines transmembranaires. Les données fonctionnelles étaient majoritairement issues de travaux *in vivo* et *in cellulo* montrant que la TSPO est impliquée dans divers processus physiologiques tels que le transport du cholestérol dans la stéroïdogenèse, le transport des porphyrines dans la régulation de l'hème, l'homéostasie du calcium, la régulation des ROS, la régulation des fonction immunitaires ainsi que dans la croissance et la différenciation cellulaire. Cependant, son mécanisme de fonction moléculaire n'était pas clairement déterminé.

Mon objectif était de produire des quantités de protéine recombinante suffisamment pure pour réaliser des études structurales et fonctionnelles.

La mise au point du système de production chez la bactérie a permis d'obtenir des quantités de protéines (marquées ou non) qui ont pu être utilisées pour les différentes approches structurales. Différentes stratégies ont été développées pour obtenir une stabilisation de la TSPO dans un environnement adéquat pour les études structurales et fonctionnelles. Les interactions de la TSPO avec différents ligands ont été étudiées d'un point de vue structural et fonctionnel.

Les résultats obtenus ont été analysés en regard de la publication récente publiée en mars 2014 de la structure atomique de la TSPO de souris en interaction avec le PK 11195 dans des conditions expérimentales extrêmement proches des nôtres (Jaremeko et al., 2014).
La caractérisation de sa structure tridimensionnelle ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre son mécanisme de fonctionnement.

Matériels et Méthodes

II. MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Souches bactériennes Escherichia coli

XL1-Blue

La XL1-Blue d'*E. coli* est utilisée pour l'amplification de plasmide car elle a été construite pour produire des ADN de haute qualité, quelle que soit leurs longueurs. En effet, elle ne possède pas d'endonucléase (endA), ni de recombinase (recA) ce qui améliore considérablement la qualité de la préparation d'ADN et la stabilité de l'insert. De plus, la mutation hsdR empêche le clivage de l'ADN cloné par le système d'endonucléase EcoK. Le gène lacIqZΔM15 sur l'épisome F' a permis initialement la sélection des bactéries transformées par leur couleur bleue, alors que celles qui ne le sont pas restent blanches, donnant ainsi le nom à cette souche.

Cette souche possède un très fort taux de transformation permettant de l'utiliser pour produire des stocks de plasmide.

DH5-alpha

La souche *E. coli* DH5-α est également utilisée pour la préparation de plasmide recombinant. Ces bactéries possèdent le gène recA1 muté, ce qui augmente la stabilité des plasmides. De plus, cette souche est efficacement transformée avec de grands plasmides parce qu'elle est défectueuse en endonucléase I (Inoué H et al. 1990).

Cette souche a été utilisée pour l'amplification du plasmide pET 15-mTSPO contenant la mutation au niveau de la phénylalanine 100.

BL21 (DE3)

La souche BL21 (DE3) *E. coli* constitue un système de choix pour la surexpression de gènes et la production de protéines recombinantes. Elle porte une mutation dans les gènes des protéases lon et ompT (BL21), ce qui permet une stabilité des protéines recombinantes en limitant leur dégradation.

L'insert chromosomique DE3 (Moffatt et al., 1984) est issu du phage T7 qui code pour l'ARN polymérase T7, ce qui permet la surproduction de protéines dont les gènes sont sous le contrôle de promoteurs du phage T7 (Studier et al., 1986). Ce dernier est lui-même sous le contrôle du promoteur lacUV5, ce qui permet une expression inductible par l'IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranoside).

1.2. Vecteur plasmidique pET-15b

Ce vecteur d'expression possède une origine de réplication compatible avec la souche *E. coli* (BL21-DE3) et le gène de résistance à l'ampicilline (Figure II. 01). Il permet, sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7, l'expression d'une protéine d'intérêt avec une étiquette poly-histidine (His6-Tag) à son extrémité N-terminale (N-ter). L'étiquette poly-histidine sert à la purification des protéines par chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC). La présence d'un site de clivage protéolytique entre la protéine et l'étiquette poly-histidine permet de supprimer cette dernière. L'emplacement de cette étiquette à l'extrémité C-terminal permet en général la purification de la protéine ayant sa taille complète, mais dans le cas de la TSPO, l'extrémité C-ter est impliquée dans la liaison du cholestérol et sa modification conduit à une perte de fonction (Li et Papdopoulos., 1998).

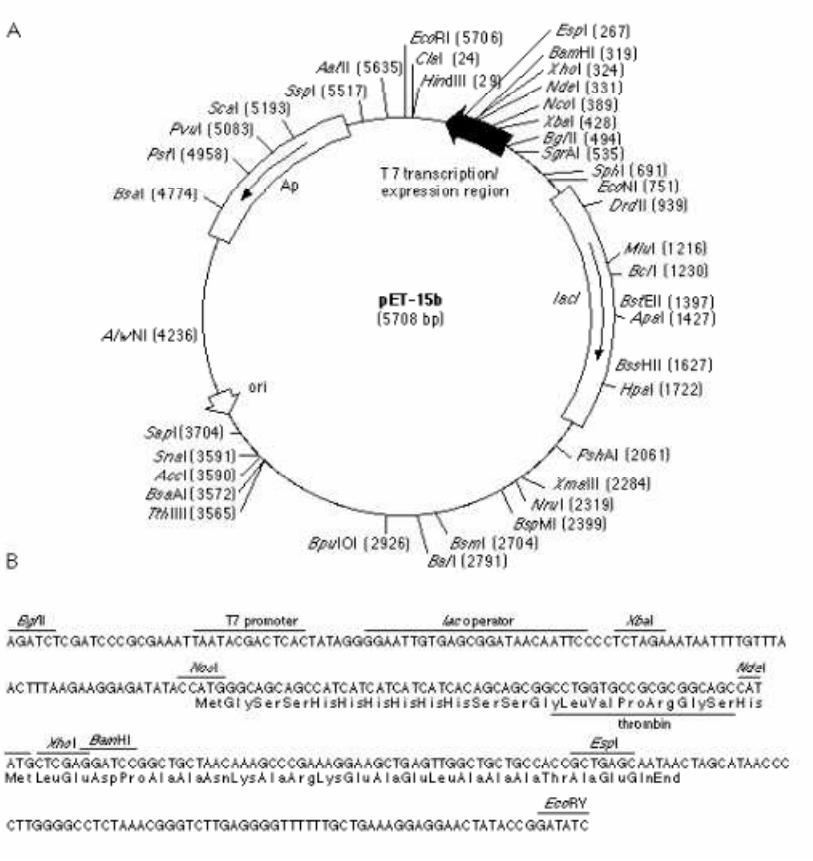


Figure II. 01 : Représentation du plasmide pET15b.

1.3. Milieux de culture

LB

Le milieu LB (*Lysogeny Broth*, Bertani, G.) a été utilisé pour cultiver la souche BL21 (DE3) d'*E. coli*. Il est composé de10 g de Tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl pour 1 L d'eau distillée.

2xYT

Le milieu 2xYT (2x Yeast extract and Tryptone) a été utilisé pour cultiver les souches XL1-Blue et DH5-α après leur transformation avec le plasmide d'intérêt. Il est composé de 16 g/L de peptone, 10 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl (deux fois plus riche que le milieu LB d'où son nom). Il permet d'obtenir une densité cellulaire plus élevée et de cultiver les *E. coli* sur une période plus longue.

M9

La surexpression d'une protéine marquée sélectivement est obtenue en ajoutant directement dans le milieu de culture minimum (M9) une source nutritionnelle isotopique (ammonium [^{15}N] NH_4Cl, glucose [^{13}C] et [^{2}H]). Le glucose sert de source de carbone et le chlorure d'ammonium de source d'azote nécessaire à la synthèse des acides aminés pour les protéines. Les bactéries ont aussi besoin d'éléments nutritifs de base tels que le potassium, le sodium, le magnésium, le chlore, le calcium et le phosphore. La composition du milieu minimum (Maniatis et al., 1982) est décrite dans le tableau ci-dessous. Ce milieu contient aussi des vitamines telles que la thiamine et la biotine favorisant la croissance des bactéries (Jansson et al., 1996).

Eléments		Quantité pour un L de culture
KH_2PO_4 Na_2HPO_4 NaCl	Stériliser à l'autoclave (121°C, 15 min)	2 g 8 g 0.5 g
$MgCl_2$		0.5 g
$CaCl_2$		50 mg
Biotine		1 mg
Thiamine		1 mg
EDTA		0.05 g
$FeCl_3$		8.3 mg
$ZnCl_2$		0.83 mg
$CuCl_2$ $2H_2O$		0.13 mg
$CoCl_2$ $6H_2O$		0.1 mg
$H3BO_3$		0.1 mg
Glucose		4 g
Chlorure d'ammonium		1 g

Tableau II. 01 : Composition du milieu M9.

La TSPO marquée à la sélénométhionine (SeMet) a été également obtenue on utilisant le milieu M9 supplémenté en sélénométhionine à100 mg dans un litre de M9.

1.4. Détergents et lipides

Plusieurs types de détergent ont été utilisés pour réaliser cette étude. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau II. 02.

Il existe plusieurs types de lipides naturels avec des chaînes aliphatiques plus ou moins insaturées et différents types de têtes polaires. Nous n'avons utilisé que deux types de lipides commerciaux (Avanti Polar™) ayant deux chaînes aliphatiques saturées et deux têtes polaires différentes : la DMPC (14:0 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) et la DMPE (14:0 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine) présentés dans le tableau II. 02.

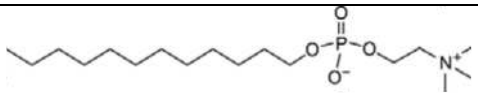
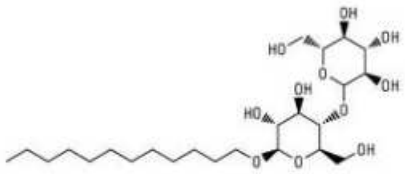
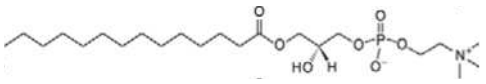
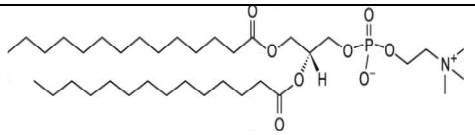
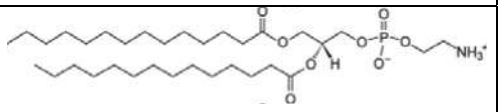
Détergents	Longueur De chaine	Nature de la tête	P_M g/mol	cmc mM à 25°C dans H_2O pure	Formule chimique
Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)	12 : 0	Anionique	288.4	7-10	
Dodécyl Phospho Choline (DPC)	12 : 0	Zwitterionique	351.4	1.1	
n-Dodécyl β-D-maltoside (DDM)	12 : 0	Non ionique	510.6	0.17	
14:0 1-myristoyl-2-hydroxy-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (LMPE)	14 : 0	Zwitterionique	425.4		
Lipides					
14:0 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC)	14 : 0	Zwitterionique	678		
14:0 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DMPE)	14 : 0	Zwitterionique	635.8		

Tableau II. 02 : Structure et caractéristiques des détergents (Sigma-Aldrich) et des lipides (Avanti Polar™) utilisés pour l'étude de la mTSPO.

2. Méthodes

2.1. Plasmides

2.1.1. Préparation des bactéries compétentes (BL21 et XL1Blue)

Afin de permettre l'entrée du plasmide dans la bactérie, celle-ci est rendue perméable, on dit qu'elle est rendue compétente, c'est à dire que l'on s'assure que son état physiologique garantira une efficacité maximale de transformation. Pour cela, on prend des bactéries qui viennent de se diviser plusieurs fois (en phase exponentielle de croissance) où les membranes sont étirées au maximum, la paroi cellulaire plus perméable (une vieille paroi est plus réticulée) et la bactérie dans un état énergétique lui permettant de résister au mieux aux traitements traumatisants de la transformation.
La méthode utilisée est la méthode avec le tampon TSS (Transformation and Storage Solution) décrite par Chung et al. 1989.

Des bactéries XL1-Blue et BL21 (DE3) sont mises en culture pendant une nuit à 37°C sous agitation à 200 rpm (rotations par minute) dans 5 mL de LB. Le lendemain, un mL de cette culture est transféré dans un erlen de 500 mL stérile contenant 100 mL de milieu LB sans antibiotique. La solution est incubée à 37°C sous agitation à 200 rpm jusqu'à obtenir une DO_{600} comprise entre 0,4 et 0,6. La culture est alors mise dans la glace pendant 30 min pour arrêter la prolifération bactérienne. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 1200 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans 10 mL de TSS froid (85% milieu LB, 10% PEG : polyethylene glycol (Mr 3350), 5% DMSO : dimethylsulfoxyde (agent fragilisant la membrane bactérienne), 50 mM $MgCl_2$, pH 6,5). Ensuite le mélange est réparti dans des tubes à raison de 100 µl par tube, congelé immédiatement en plongeant les tubes dans l'azote liquide et conservé à - 80°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

2.1.2. Transformation des bactéries

Un µl du plasmide (10 ng) est mélangé à 100 µl de suspension de bactéries XL1Blue compétentes préparées préalablement (voir ci dessus) et incubé 15 min sur la glace, puis on perméabilise les bactéries pendant 45 secondes par choc thermique à 42°C pour incorporer le plasmide. Les bactéries sont ensuite remises sur la glace pendant 2 min.
Quatre cents µl de milieu de culture riche 2XYT autoclavé sont ajoutés pour laisser croître les bactéries une heure à 37°C sous une agitation de 200 rpm.

2.2. Cultures des bactéries

Deux cultures différentes ont été utilisées pour cette étude : (i) une culture dans un milieu riche (LB) pour une large production (dans le but de caractériser biochimiquement la TSPO) et (ii) une culture dans un milieu minimum (M9) pour une production de protéine marquée (pour les études RMN et cristallographiques).

Toutes les cultures ont été réalisées à 37°C dans l'incubateur Innova 44 Incubator Shaker, sous agitation à 200 rpm.

2.2.1. Milieu riche

Les bactéries *E. coli* (souche BL21-DE3) transformées par le plasmide d'expression pET15 contenant l'insert codant pour la TSPO murine sont mises en pré-culture dans 100 mL de milieu riche LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline, pendant une nuit. Cette pré-culture permet de relancer la croissance des bactéries conservées en présence de glycérol (40%) à -80°C. Le changement d'absorbance (600 nm, spectromètre UNICAM UV300) permet de vérifier la croissance bactérienne.

Après une nuit, les 100 mL de pré-culture sont dilués dans 2 L de LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline de manière à obtenir une culture dont l'absorbance initiale est d'environ 0,2. Les deux litres de culture sont répartis dans 4 Erlenmeyers de 5 litres pour une meilleure oxygénation sous agitation. Le suivi de la croissance est fait par mesure d'absorbance à 600 nm toutes les 30 minutes.

L'induction de la synthèse de la TSPO recombinante est effectuée par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM, lorsque l'absorbance atteint une valeur de 0,6, c'est-à-dire au début de la phase de croissance exponentielle de la bactérie (*i.e.* à une vitesse de multiplication maximale). Après quatre à cinq heures d'induction, la suspension bactérienne (des 4 Erlenmeyers) est centrifugée (Beckman, rotor JLA 10-500, 6700g pendant 20 min à 4°C). Les 4 culots de bactéries peuvent être conservés à -20°C ou repris chacun par 30 mL de tampon Hepes 50 mM pH 7.8, NaCl 150 mM. Les suspensions obtenues peuvent être utilisées directement pour la purification ou conservées à -20°C pour un traitement ultérieur.

2.2.2. Milieu minimum

Une préculture (100 mL) et une culture (2 L) dans 4 Erlenmeyers de 5 litres en milieu LB sont réalisées comme décrit ci-dessus jusqu'à atteindre une absorbance d'environ 3. Les suspensions bactériennes sont centrifugées (Beckman, rotor JLA 10-500, 6700 g pendant 20 min à température ambiante).

Les culots sont lavés par 30 mL de milieu minimum (M9) et repris dans 2 litres de M9 complémentés (voir ci dessous pour les différents types de marquage). Les 2 L, dont l'absorbance de la solution (à 600 nm) est ajustée à 2,8 par ajout de milieu M9 si nécessaire, sont répartis dans 4 Erlenmeyers de 5 litres. La production de la TSPO est induite par ajout de 1 mM d'IPTG lorsque l'absorbance a commencé à réaugmenter (en général 30 min après la remise en culture). Après 4 h d'induction, les suspensions bactériennes sont centrifugées pendant 20 min à 6700 g à 4°C et les culots obtenus sont repris et lavés dans 30 mL de tampon 50 mM Hepes à pH 7,7 et 150 mM NaCl. Ces suspensions sont ensuite centrifugées (Beckman, rotor JA20) à 13776 g pendant 20 min et les culots sont repris dans 20 mL de tampon. Ces derniers sont utilisé immédiatement ou conservés secs à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.2.1. Marquage total

Le marquage des azotes de la TSPO a été obtenu en ajoutant 1 g/L de chlorure d'ammonium marqué au ^{15}N comme source d'azote, celui des carbones a été obtenu par ajout de 4 g/L de glucose marqué au ^{13}C. Enfin, le marquage des hydrogènes non échangeables de la TSPO a été obtenu en ajoutant 4 g/L de glucose marqué au ^{2}H (et ^{13}C) dans un milieu contenant 90% de D_2O.

2.2.2.2. Marquage sélectif

Plutôt que de fournir des sources de carbone et d'azote qui doivent être métabolisées par les bactéries pour qu'elles fabriquent elles-mêmes les acides aminés (AA), on peut leur fournir des AA dans le milieu de culture M9 (Markley et al., 1968) et développer la même méthode de production que décrit ci-dessus. En ajoutant ces AA à une concentration suffisamment élevée (Tableau II. 03), il est possible d'inhiber leur biosynthèse par la bactérie, qui incorpore donc l'AA fourni (exogène) au détriment de l'AA biosynthetisé. C'est une régulation par inhibition (Lu et al., 1976, Lee et al., 1995).

Si l'on ajoute au milieu de culture un AA marqué avec un mélange de glucose et d'ammonium, on obtiendra une protéine maquée sélectivement sur cet AA. On peut parler alors de marquage sélectif "positif". Ce type de marquage a été réalisé avec succès avec la Met et la Lys dans notre étude. Dans un premier cas, la mTSPO marquée avec la SeMet a été obtenue en ajoutant 100 mg/L. Nous avons obtenu les mTSPO marquées avec la Met ou la Lys (^{15}N). Toutefois, le coût d'un échantillon marqué sélectivement dépend du prix de cet AA et vu le prix des AA marqués, ce peut être un facteur limitant. Une alternative peut être

l'utilisation du marquage sélectif "négatif" qui est obtenu en ajoutant l'AA que l'on ne veut pas voir marqué avec les sources de carbone et d'azote marquées. En réalisant ce marquage les pics correspondants à cet AA n'apparaissent pas sur les spectres de RMN, ces derniers sont donc simplifiés. Ce type de marquage a été réalisé sur le Trp dans notre étude (Figure II. 02). Il est également possible de supprimer plusieurs pics à la fois correspondant à plusieurs résidus en utilisant des précurseurs communs à la biosynthèse d'un groupe de résidus tels que le α-cétoisovalérate pour les résidus Val et Leu (Goto & Kay, 2000). Ceci est également vrai pour le marquage sélectif positif en utilisant ces précurseurs marqués.

Ce type de marquage n'est pas applicable à tous les AA car certains d'entre eux sont des intermédiaires dans la synthèse d'autres AA (comme l'acide aspartique, la sérine, la thréonine ou l'acide glutamique, Figure II. 03). Dans ce cas, non seulement le marquage n'est plus spécifique, mais il y a en plus une dilution isotopique. Seuls les résidus : His, Cys, Gly, Trp, Phe, Tyr, Pro, Arg, Met, Lys, Ile, Val, Leu peuvent être marqués spécifiquement en raison de leur biosynthèse en fin de voies métaboliques (Figure II. 03). Une autre difficulté vient de l'interconversion existante entre 2 AA (par exemple Ser-Gly, Asp-Asn et Gln-Glu) qui crée aussi une dilution isotopique. Une des autres difficultés rencontrées est la biodégradation des AA par la bactérie; une manière de la diminuer est l'ajout dans le milieu de culture M9 des dix neufs AA non marqués, à leur concentration d'inhibition, en complément de l'AA marqué désiré.

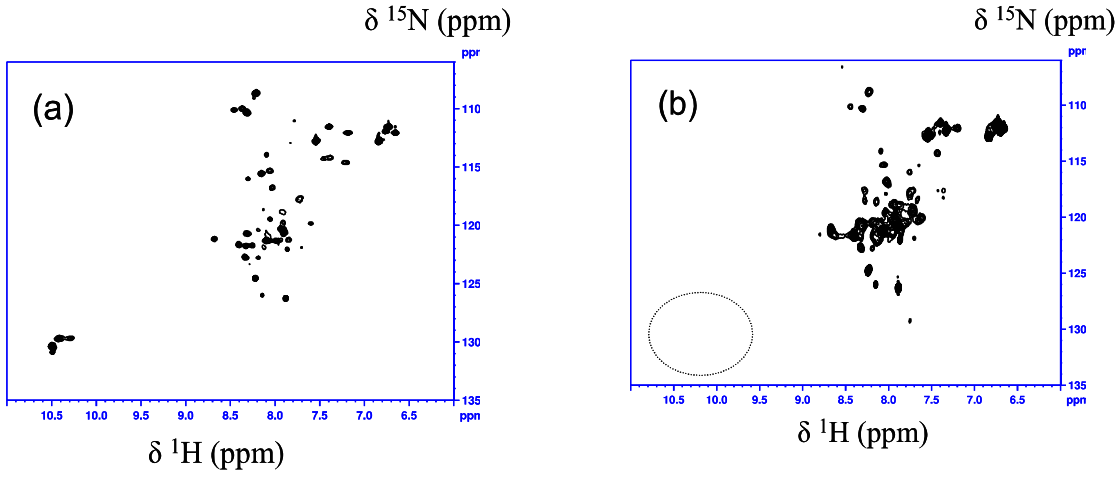


Figure II. 02 : Spectres HSQC ^{1}H-^{15}N de la TSPO obtenue par culture des bactéries avec une source d'azote ^{15}N mais en présence de tryptophane non marqué (marquage spécifique « néganif »); (a) spectre control montrant un massif dans la région des N-H indoles (^{1}H vers 10.5ppm et ^{15}N vers 130ppm), (b) spectre obtenu en présence de Trp non marqué révélant la disparition du massif des N-H indoles (cercle pointillé).

Une stratégie alternative décrite dans la littérature, mais que nous n'avons pas testée, consiste à utiliser des souches bactériennes auxotrophes qui ne peuvent croître sans la présence d'un AA donné. Ce phénotype d'auxotrophie pour un acide aminé est obtenu par modification (mutation) d'un ou plusieurs gènes de la bactérie responsable (s) de la synthèse de cet AA.

Nous avons été confrontés, dans le cas de marquage spécifique (^{15}N), à une dilution isotopique avec la Phe. Les spectres HSQC (^{15}N-^{1}H) font apparaître plus de pics que de Phe. Ces dispersion et dilution sont probablement dues aux transaminases qui sont des enzymes responsables du transfert d'un groupement $–NH_2$ d'un acide aminé vers un autre.

Acide aminé	Inhibition (mg/L)	Acide aminé	Inhibition (mg/L)
Alanine (Ala)	400	Leucine (Leu)	100
Arginine (Arg)	400	Lysine (Lys)	100
Asparagine (Asn)	100	Méthionine (Met)	250
Acide Aspartique (Asp)	250	Phénylalanine (Phe)	50
Cystéine (Cys)	50	Proline (Pro)	100
Glutamate (Glu)	400	Sérine (Ser)	1600
Glutamine (Gln)	400	Thréonine (Thr)	100
Glycine (Gly)	400	Tryptophane (Try)	50
Histidine (His)	100	Tyrosine (Tyr)	100
Isoleucine (Ile)	100	Valine (Val)	100

Tableau II. 03 : Concentration en acides aminés pour le marquage sélectif par inhibition dans le milieu de culture. D'après (Griffey et al., 1985)

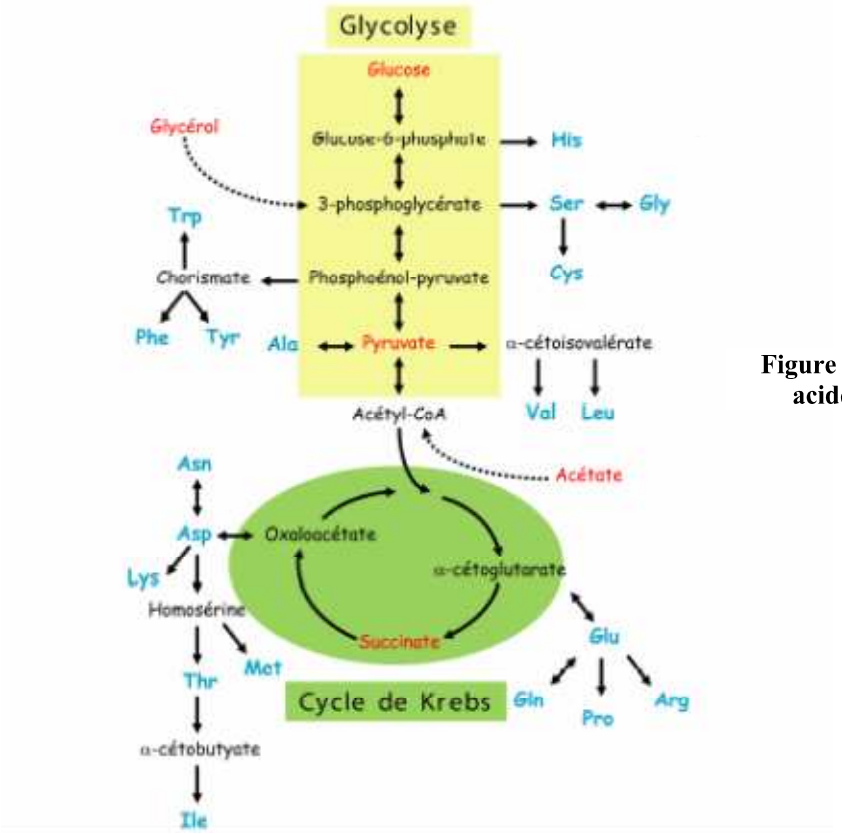


Figure II. 03 : La biosythese des acides aminés dans E. coli.

2.3. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une technique qui permet de modifier la séquence en acides aminés d'une protéine pour mesurer l'importance de certains acides aminés dans la fonction et la structure de cette protéine. L'ensemble de la procédure de mutagenèse dirigée est schématisé sur la figure II. 04.

2.3.1. Principe

La mutagenèse dirigée a été conduite en utilisant le kit « QuickChange Site-Directed Mutagenesis » de Stratagene. Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation de deux oligonucléotides complémentaires contenant la séquence mutée, qui vont s'hybrider à chacun des deux brins du plasmide d'intérêt (pET15-mTSPO), qui leur servent de matrice. Une digestion par l'enzyme DpnI permet ensuite l'élimination du brin parental, méthylé au profit du plasmide portant la mutation qui n'est pas méthylé.

2.3.2. Extraction du plasmide

Afin d'obtenir la quantité de plasmide nécessaire pour réaliser la mutagenèse dirigée, nous somme partis de 60 mL de culture bactérienne BL21 contenant le plasmide pET15-mTSPO. La purification a été faite en utilisant le kit Nucleobond® Xtra Midi de chez Macherey-Nagel. Cette technique est basée sur la lyse alcaline des bactéries, suivie de la fixation de l'ADN sur résine échangeuse d'anions, et de l'élution du plasmide par des sels à pH basique. La quantité et la pureté d'ADN obtenu ont été caractérisées par le rapport des longueurs d'onde 260 nm (acides nucléiques) / 280 nm (protéines contaminantes) mesuré au spectrophotomètre (Pharmacia Biotech Gene Quant RNA/DNA Calculator). Une préparation d'ADN est dite pure si elle présente un rapport le plus près possible de 2. Une partie de la solution est envoyée à séquencer (ACGT INC, Molecular Diagnostics) et l'autre partie est stockée pour une utilisation ultérieure.

2.3.3. Choix des oligonucléotides

Pour la réussite de la mutagenèse dirigée par PCR, le choix des oligonucléotides doit prendre en compte différents critères importants pour l'optimisation du rendement de la réaction d'amplification par l'endonucléase. Les oligonucléotides doivent être longs d'au moins 12 à 15 bases avant et après la zone de mésappariement (zone de mutation) afin d'avoir un bon appariement. Ils doivent contenir un minimum de 40 % de bases G et C. En effet, la liaison entre G et C est assurée par trois liaisons hydrogène au lieu de deux entre les A et les

T, ce qui se traduit par une meilleure stabilité de la liaison au moment de l'hybridation des amorces. Leur température de fusion doit être le plus proche possible. Cette dernière est estimée par la formule suivante :

Tm (°C) = 2 x (A+T) + 4 x (C+G)

Les oligonucléotides sens et antisens utilisés sont présentés dans le tableau II. 04.

Mutation	Oligonucléotides contenant les mutations
W33A	GC GAG GGC CTC CGG GCG TAT GCT AGC TTG C G CAA GCT AGC ATA CGC CCG GAG GCC CTC GC
L37A	C CGG TGG TAT GCT AGC GCG CAG AAA CCC TCT TGG CCA AGA GGG TTT CTG CGC GCT AGC ATA CCA CCG G
W42A	GCT AGC TTG CAG AAA CCC TCT GCG CAT CCG CCT C G AGG CGG ATG CGC AGA GGG TTT CTG CAA GCT AGC
W42F	C TTG CAG AAA CCC TCT TTT CAT CCG CCT CGC TGG AC GT CCA GCG AGG CGG ATG AAA AGA GGG TTT CTG CAA G
H43A	CAG AAA CCC TCT TGG GCT CCG CCT CGC TGG AC GT CCA GCG AGG CGG AGC CCA AGA GGG TTT CTG
I98A	G GCG TGG CCC CCC GCC TTC TTT GGT GCC GGC ACC AAA GAA GGC GGG GGG CCA CGC C
F99A	G TGG CCC CCC ATC GCC TTT GGT GCC CGG CCG GGC ACC AAA CGG GAT GGG GGG CCA C
F100A	GG CCC CCC ATC TTC GCT GGT GCC CGG CAG CTG CCG GGC ACC AGC GAA GAT GGG GGG CC

Tableau II. 04 : Les oligonucléotides utilisés pour la mutation de la mTSPO

2.3.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Une PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 50 µl en utilisant 10 ng du plasmide pET15-TSPO, 125 ng des amorces sens et anti-sens comprenant les mutations choisies, 10 mM de chaque dNTP, 2,5 unités de Pfu polymérase, 10 % (v/v) de tampon Pfu polymérase 10X. Le programme de PCR était composé de 18 cycles identiques comprenant chacun une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 55°C (cette température est variable selon les amorces) et une étape d'élongation de 30 secondes à 1 min selon la longueur du fragment à amplifier à 68°C (Tableau II. 05).

Cycles	Température	Durée
1	95°C	30 secondes
1 2-18	95°C	30 secondes
	55°C	1 minute
	68°C	1 + 1 minutes/kb de plasmide (7min/pet15)
1	68°C	7min

Tableau II. 05 : Caractéristiques des Cycles de PCR.

Les produits PCR sont traités par l'enzyme DpnI (10 Unités) (1h à 37°C sous agitation à 200 rpm) pour obtenir le plasmide de la mTSPO mutée.

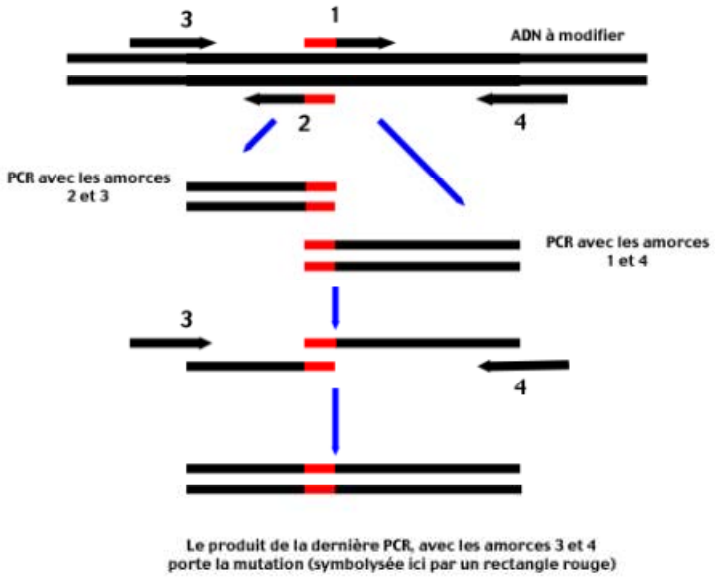


Figure II. 04 : Mutagenèse dirigée par PCR.

2.3.5. Amplification du plasmide

Le plasmide muté est amplifié dans des bactéries *E. coli* souche XL1Blue. Un µl du produit PCR traité a été inséré dans des bactéries XL1Blue compétentes (voir ci dessus). Pour la sélection des clones recombinants contenant le plasmide, les bactéries transformées sont étalées sur des boites de LB/Agar (1,5%) contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, un clone est sélectionné afin d'en extraire le plasmide pour le séquençage. Apres vérification de la séquence, le clone sélectionné et vérifié est mis en culture dans 60 mL de LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline à 37°C et sous agitation 200

rpm/min. Après une nuit d'incubation, le plasmide est purifié à l'aide du kit Nucleobond® Xtra Midi comme décrit précédemment.

2.3.6. Transformation des bactéries pour la production protéique

L'introduction de l'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt de la mTSPO dans les bactéries BL21 (DE3) compétentes ainsi que la sélection des clones recombinants contenant le vecteur pET15-mTSPO, ont été réalisés selon le même protocole que pour les bactéries XL1-Blue. Plusieurs clones peuvent être sélectionnés, mis en culture en milieu LB riche et leur production respective de protéine recombinante comparée pour garder le meilleur clone.

2.4. Purification de la protéine recombinante

Plusieurs étapes essentielles doivent être mises en œuvre afin d'obtenir une protéine pure et concentrée à partir des bactéries.

2.4.1. Extraction

La TSPO a été extraite des corps d'inclusion bactériens d'*E.coli* où elle est en majeure partie localisée. Les bactéries ont été lysées par ultrasons à 0-4°C pendant 1 min et les corps d'inclusion récupérés par centrifugation (10000 rpm, 20 min à température ambiante). La TSPO a ensuite été extraite des culots par ajout de tampon de lyse (50 mM Hepes, 150 mM NaCl contenant 1% de SDS p/v, i.e. poids/volume). Une centrifugation de 30 min à 48400g (Beckman, rotor JA 20) a permis d'éliminer les éléments insolubles et de récupérer dans le surnageant le contenu des corps d'inclusion solubilisés par le SDS. L'ajout de benzonase (1µl à 250 Unités/µl) a permis de rendre la solution plus fluide en clivant les ADN et les ARN présents dans le surnageant.

2.4.2. Purification sur résine fonctionnalisée NTA-Ni

La protéine surexprimée a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine Ni-NTA (Qiagen) en utilisant la présence des 6 histidines à l'extrémité N-terminale de la TSPO (Figure II. 05). Une première étape (charge) permet de fixer la protéine, une seconde étape (lavage) permet d'éliminer les contaminants (acides nucléiques, protéines) et une troisième étape permet d'éluer la TSPO par ajout d'imidazole qui entre en compétition avec l'histidine car c'est un analogue structural.

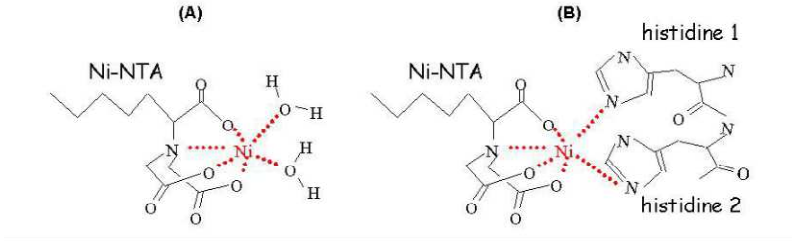


Figure II. 05 : L'acide nitrilotriacétique (NTA) est un complexant quadridentate, c'est-à-dire qu'il forme 4 liaisons. Il complexe fortement le cuivre et le nickel qui sont de valence 6. Ces ions, une fois complexés, gardent 2 sites accessibles qui peuvent être occupés soit par des molécules d'eau (A) soit par deux molécules d'histidines (B). Chargées avec du Ni2+, les résines Ni-NTA lient de manière très spécifique les protéines ou polypeptides présentant plusieurs histidines consécutives en surface.

2.4.2.1. Minipurification

Pour estimer la quantité de TSPO présente dans la solution à purifier et ajuster le volume de résine à utiliser, une purification d'une petite quantité a été réalisée avant de procéder à la purification totale. Un mL de la solution des corps d'inclusion solubilisés a été incubé avec 100 µl de résine Ni-NTA préalablement lavée et équilibrée avec le tampon de lyse pendant 15 min à température ambiante sous agitation. La résine a été récupérée par centrifugation et lavée 3 fois avec 1 mL de tampon de lavage (50 mM Hepes, 5 mM Imidazole, 150 mM NaCl contenant 1% de SDS p/v). La TSPO fixée sur la résine a été éluée dans 3 fois 1 mL de tampon d'élution (50 mM Hepes, 250 mM Imidazole, 150 mM NaCl contenant 1% de SDS p/v). La concentration de la TSPO présente dans les fractions a été estimée par la spectroscopie UV (spectres d'Absorbance 240-320 nm et maximum à 280 nm). On peut noter que cette estimation est reproductible mais seulement informative car elle donne en général des valeurs protéiques surestimées, probablement par une fixation plus importante de contaminants.

2.4.2.2. Purification

La quantité de résine à utiliser pour la purification doit être ajustée en fonction de la quantité de protéine surexprimée estimée par une mini purification. En effet, 1 mL de résine peut fixer théoriquement entre 20 et 40 mg de protéines.

Les corps d'inclusion solubilisés dans 1% SDS contenant la benzonase ont été déposés sur la résine préalablement lavée et équilibrée avec le tampon de lyse. Pour éliminer les protéines fixées de manière aspécifique, la matrice a été lavée par 4 volumes de la résine avec

le tampon de lyse, puis avec 8 volumes de tampon de lavage (contenant 5 mM imidazole). Au cours de cette étape, on peut effectuer l'échange de détergents si nécessaire. L'élution de la protéine recombinante se fait par compétition avec de l'imidazole qui est un analogue structural de l'histidine. L'élution de la protéine est réalisée avec le tampon d'élution qui contient 250 mM d'imidazole et du détergent.

Toutes les étapes (charge, lavages et élution) sont analysées en enregistrant les spectres d'absorption (240-320 nm) et en mesurant les valeurs à 280 nm de toutes les fractions collectées.

2.4.2.3. Echange de détergent

L'échange de détergent a été réalisé au cours de l'étape de lavage lors de la purification sur la colonne NTA-Ni. Une fois la mTSPO en SDS (SDS qui nous a servi à solubiliser les corps d'inclusion) fixée sur la résine NTA-Ni, la substitution du détergent a été réalisée par lavage avec 2 volumes de colonne contenant une concentration du nouveau détergent 2 fois plus concentré que celle du SDS. Cette étape a été suivie par une autre étape de lavage (4 volumes de colonne) qui permet l'ajustement de la concentration du détergent de substitution à la concentration finale désirée. Enfin la mTSPO a été éluée avec le tampon d'élution contenant de l'imidazole et le détergent de substitution.

2.4.3. Concentration

La concentration des échantillons de mTSPO collectés dépend de plusieurs facteurs : (i) la quantité de protéine déposée sur la colonne, (ii) la géométrie de la colonne (les paliers théoriques), (iii) le volume d'élution. Dans nos conditions 1,4 mL de résine dans une colonne (BioRad) adaptée (environ 3 cm de haut sur 1 cm de large) permet de collecter des fractions de 0,3 mL jusqu'à des concentrations de 20-25 mg/mL de mTSPO pour 25 mg total de mTSPO contenu dans 40 mL de corps d'inclusion solubilisés. Il est cependant possible de concentrer les échantillons collectés par centrifugation sous vide partiel ("speed-vac"). Un mL de solution peut être concentré en réduisant le volume de 0,1 mL par heure.

2.5. Caractérisation de la TSPO recombinante

2.5.1. Dosage protéique

Les protéines présentent des spectres d'absorption caractéristiques (dus à la présence d'acides aminés aromatiques) avec un maximum à 280 nm (Tyrosines) et un épaulement à 290 nm (Tryptophanes) alors que les acides nucléiques ont un maximum d'absorption à 260 nm.

La concentration en TSPO présente en solution a été déterminée par spectroscopie UV en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 3,88 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 280 nm. Ce coefficient a été calculé en utilisant la séquence complète d'acides aminés et le programme « ProtParamTools » de ExPASy (Gasteiger et al., 2003, Robert et al., 2010).

2.5.2. Dosage des détergents

La méthode développée au laboratoire détourne une propriété du dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Bradford. Celle-ci est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 sur les protéines qui provoque un changement d'absorbance (réactifs de dosage Bio-Rad). Elle est fortement faussée par la présence de détergent allant jusqu'à une impossibilité de doser des protéines membranaires isolées en présence de fortes concentrations de détergent. Nous avons profité de cette interférence du détergent pour mesurer directement la quantité de ce dernier présent dans les solutions protéiques ou non.

Des gammes étalons de détergent ont été réalisées par l'ajout de concentration croissante de 0 à 600 µg de SDS et/ou de DPC dans 1 mL de réactif (Bio-Rad) dilué au 5ème dans de l'eau distillée. L'enregistrement des spectres d'absorption de 250 à 800 nm pour chaque concentration de détergent nous a indiqué que la variation maximale de l'absorbance induite par le SDS et/ou DPC a été observée respectivement à 650 et 600 nm. Les mesures de la DO au niveau de ces deux maxima correspondant aux différentes concentrations de SDS et DPC nous ont permis de tracer les deux courbes d'étalonnage. Ces courbes ont un aspect "sigmoïde" avec une partie linéaire (de 150 à 350 µg pour le SDS et de 100 à 250 µg pour le DPC) que nous avons utilisé pour mesurer la concentration de détergent présente dans des solutions inconnues (Figure II. 06 et 07 pour SDS et DPC, respectivement).

Avant le dosage de détergent présent dans les solutions protéiques, et pour éviter la réaction de la protéine avec le réactif, on a procédé à l'élimination de la protéine par précipitation dans le méthanol (un volume de solution protéique pour 4 volumes de méthanol). La mTSPO précipite immédiatement en présence de méthanol et par simple centrifugation à 2000 g pendant 5 min, on a éliminé le précipité permettant ensuite le dosage du détergent présent dans le surnageant grâce a la partie linéaire des courbes d'étalonnage réalisée en présence de méthanol (Figure II. 06 et 07 pour SDS et DPC, respectivement). On peut noter que le méthanol réagit avec le réactif de Bio-rad et déplace les courbes d'étalonnage de SDS et de DPC.

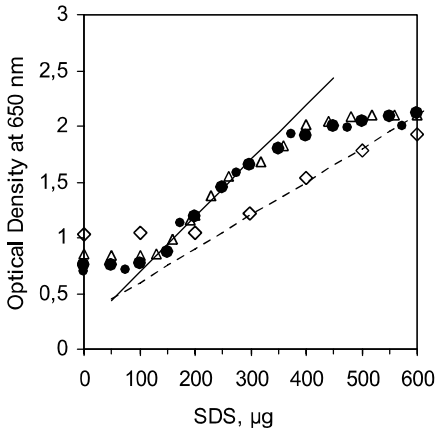


Figure II. 06 : Courbe d'étalonnage du SDS. Mesure de la densite optique à 650 nm des quantites croiossantes de SDS (0-600 µg) ajoutés dans 1 ml de réactif (Bio-rad) dilué au 5ème dans de l'eau distillée. Cercles pleins et triangles vides en absence de méthanol. Losanges vides en présence de 7.5 % de méthanol. Les lignes pleine et pointillée représentent la partie linéaire de la courbe de titrage en absence et en présence de méthanol, respectivement.

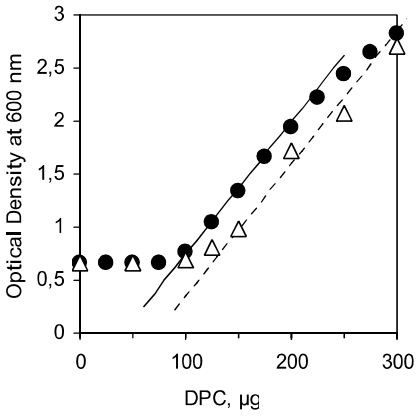


Figure II. 07 : Courbe d'étalonnage du DPC. Mesure de la densite optique à 600 nm des quantites croiossantes de DPC (0-300 µg) ajoutés dans 1 ml de réactif (Bio-rad) dilué au 5ème dans de l'eau distillée. Cercles pleins en absence de méthanol. Triangles vides en présence de 7.5 % de méthanol. Les lignes pleine et pointillée représentent la partie linéaire de la courbe de titrage en absence et en présence de méthanol, respectivement.

2.5.3. Analyse protéique

2.5.3.1. SDS-PAGE

Une fois la protéine purifiée, il est possible d'évaluer son degré de pureté en faisant un gel d'éléctrophorèse (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). On a utilisé un appareil BioRad (mini protean II) avec des gels (7,2 cm x 8,6 cm, 1 mm d'épaisseur, et 15 puits). Les solutions protéiques (0,05 µg/µl) à analyser ont été mélangées dans un rapport 3/1 (v/v) avec du tampon de dissociation (4X) composé de Tris-HCl 250mM pH 6,8 - glycérol 40% - SDS 8% - β-mercaptoéthanol 1% - Bleu de Bromophénol 0,1% (p/v). Environ 12 µl de ce mélange ont été déposés dans les puits du gel polyacrylamide composé de deux parties. La première partie supérieure (stacking gel) composée d'un mélange d'acrylamide et bis-acrylamide avec un rapport respectivement 4% (p/v) et 0.1% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1% (p/v), persulfate d'ammonium (APS) 0, 1% (p/v), N,N,N'N'-tétraméthyl-ethylène-diamine (TEMED) 0, 1% (v/v), permet la concentration des protéines. La deuxième partie du gel, destinée à séparer les protéines selon leur masse moléculaire, est composée d'un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide respectivement à 12% (p/v) et à 0,3% (p/v), Tris-HCl 0,5 M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), APS 0,1% (p/v), TEMED 0,1% (v/v). Les gels ont été placés dans une cuve entre 2 réservoirs

contenant un tampon composé de glycine 750 mM, SDS 0,1% (p/v) et Tris 50 mM pH 8,4. Les protéines ont été soumises à un courant électrique (entre les 2 réservoirs) voltage constante (150 V, courant variable maximum) pendant une heure environ permettant leur migration dans le gel.

2.5.3.2. Coloration au nitrate d'argent

La coloration des gels au nitrate d'argent est une méthode très sensible qui permet de détecter des protéinés à partir de 0,2 ng.

Après migration, les protéines présentes dans le gel de polyacrylamide ont été fixées pendant 30 min au minimum à l'aide d'une solution de fixation contenant 50% d'éthanol, 5% acide acétique et 45% eau distillée. Les gels ont été ensuite placés pendant 15 min dans la solution de fixation diluée au 10ème. Ensuite, les gels ont été lavés dans 3 bains d'eau distillée pendant 5 min chacun et placés pendant une minute dans un bain de thiosulfate de sodium 0,02% (w/v). Cette étape correspond à la sensibilisation et est arrêtée par 3 lavages de 30 secondes chacun dans de l'eau distillée (pour réduire le bruit de fond). Les gels ont été alors immergés dans une solution contenant 0,2% (w/v) de nitrate d'argent pendant 20 min. Avant de passer à l'étape de révélation, les gels ont été d'abord lavés à l'eau pendant quelques secondes et placés dans la solution de développement (pour 50 mL de solution : 3 g de carbonate de sodium, 37 µl de formaldéhyde 37% et 1 mL de thiosulfate de sodium 2%) pendant une durée qui varie de quelques secondes à 20 min selon la vitesse d'apparition des bandes. Cette révélation a été arrêtée par une solution d'acide acétique 5 % pendant environ 5 min. Après coloration, tous les gels ont été scannés pour avoir une image, mais aussi conservés sous forme déshydratée.

2.5.3.3. Coloration au bleu de Coomassie

Les protéines séparées sur le gel de polyacrylamide peuvent être aussi révélées par coloration au bleu de Coomassie. Pour cela, les gels ont été immergés dans une solution contenant du bleu de Coomassie (Brilliant Blue G250) à 0,25% (p/v), éthanol 40% (v/v) et acide acétique 10% (v/v) pendant une nuit (Diezel et al., 1972). Ce temps peut être réduit en chauffant le gel et sa solution au micro-onde pendant 1 min à 450W, puis en les laissant 30 min à température ambiante avant leur lavage avec une solution contenant 5% (v/v) d'éthanol et 10% (v/v) d'acide acétique pour éliminer l'excès de colorant. Après coloration, tous les gels ont été scannés pour avoir une image, mais aussi conservés sous forme déshydratée.

2.5.4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode analytique destructrice très sensible qui permet de déterminer la masse moléculaire d'un composé chimique ou biologique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (*m/z*). Toutes les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées en collaboration avec Gérard Bolbach du laboratoire des BioMolécules (Université Pierre et Marie Curie, Paris 6).

Les expériences ont été réalisées avec un instrument de type MALDI-TOF. C'est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur de temps de vol (TOF, *Time-Of-Flight mass spectrometry*). Les échantillons (environ 1 µl d'une solution 0,1 mg/mL) ont été mélangés à une matrice (1µl d'alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, HCCA). Ce mélange a été déposé sur une cible et après séchage un laser ionise les molécules et les désorbe de cette matrice. Du faite de l'interférence du SDS (détergent ionique) amené par la mTSPO lors de sa purification avec cette approche, le SDS est complémenté avec du DDM (détergent non anionique) par dilution.

2.5.5. Dichroïsme Circulaire (DC)

Principe de la méthode

Le dichroïsme circulaire est une méthode sensible et simple qui permet d'évaluer le niveau de structuration d'une protéine ou d'un peptide en solution. La technique est basée sur la capacité de ces molécules d'interagir différemment avec la lumière polarisée circulairement gauche et droite (Figure II. 08). La polarisation de toute onde lumineuse linéaire peut être décomposée en deux composantes circulaires gauche (PCG) et droite (PCD) de même amplitude et de même intensité. Ces deux composantes ne se superposent pas, elles sont donc chirales.

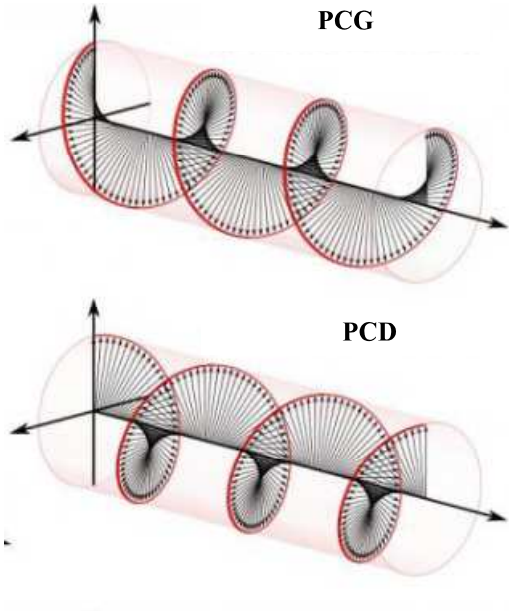


Figure II. 06 : Illustration du phénomene de polarisation circulaire droite et gauche.

Lorsque la lumière polarisée linéairement passe au travers d'un échantillon pourvu d'une activité optique, les deux composantes PCG et PCD ne sont pas absorbées de la même manière par l'échantillon. Le spectre dichroïque reflète la différence d'absorbance (ΔA) entre ces deux types de lumière, pour chaque longueur d'onde (λ) :

$$\Delta A\ (\lambda) = A_G - A_D$$

Par application de la loi de Beer-Lambert, cette différence d'absorbance peut se formuler de la façon suivante:

$$\Delta A\ (\lambda) = (\varepsilon_G - \varepsilon_D).l.C$$

Où ε_G et ε_D correspondent aux absorptivités molaires respectives de la lumière PCG et PCD, C est la concentration molaire et l est le trajet optique.
Le dichroïsme circulaire s'écrit alors :

$$\Delta\varepsilon\ (\lambda) = \varepsilon_G - \varepsilon_D$$

L'ellipticité θ, mesurée par l'appareil, est un angle correspondant à la forme de la polarisation de la lumière. En général, A<< 1 et $\Delta \varepsilon \infty \theta/lC$.

Application de la méthode

Le dichroïsme circulaire permet de caractériser la composition en structure secondaire d'une protéine (Woody, 1995) puisque chaque type de structure secondaire (hélice α, feuillet β, coude et forme aléatoire) donne un spectre dichroïque caractéristique (Figure II. 09). Le traitement des spectres expérimentaux par des logiciels appropriés permet par déconvolution d'obtenir une estimation de la proportion des différentes structures au sein d'une protéine (Jamin et Lacapère, 2007).

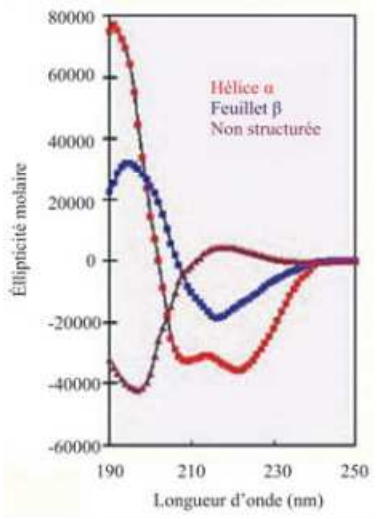


Figure II. 07 : Illustration des différents spectres caractéristiques de chaque type de structure

Les spectres de DC ont été mesurés avec un spectromètre JASCO J-80 équipé d'un portoir de cuvette thermostatée à 20°C par un thermorégulateur à effet Peltier, dans une cuvette de 1 mm de trajet optique. Pour chaque échantillon, un spectre a été mesuré entre 185 et 270 nm avec une largeur de bande de 1 nm, un pas de 0,2 nm, une vitesse de scan de 20 nm/min, un temps de réponse de 1 s et les spectres moyennés sur 5 acquisitions. Le spectre du tampon de préparation de l'échantillon a été soustrait de chaque spectre de protéine. La mTSPO (0,1 mg/mL) a été étudiée dans différents environnements (détergents, lipides et ligands) dans un tampon phosphate 10 mM, pH 6,5. Ce tampon et cette concentration de

protéine ont été choisis pour minimiser l'absorbance dans l'UV lointain et optimiser le rapport signal sur bruit.

2.5.6. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC (Differential Scanning Calorimetry) est une méthode très sensible permettant la mesure du flux de chaleur différentiel nécessaire pour maintenir un échantillon et une référence inerte à la même température (Figure II. 10). Elle permet d'obtenir les paramètres thermodynamiques de dénaturation d'une protéine : enthalpie calorimétrique de dénaturation. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une DSC (TA Instruments) au laboratoire des BioMolécules (UPMC). Pour chaque essai, un échantillon de 1 mL (contenant 2 mg/mL de mTSPO dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7,6) a été injecté dans une cellule en évitant la présence de bulles. Les échantillons sous pression de 3 atmosphères ont été chauffés de 20 à 80°C par pas de 1°C par minute. On mesure la différence des échanges de chaleur entre l'échantillon et une référence.

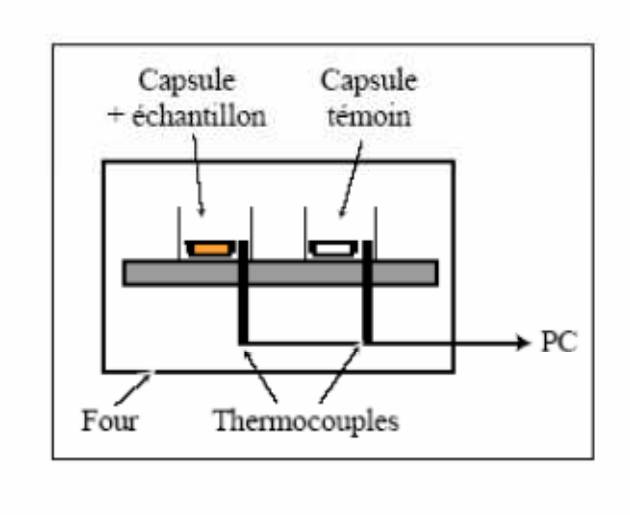


Figure II. 8 : Schéma du principe de la DSC.

2.5.7. Fluorescence intrinsèque des tryptophanes

La fluorescence intrinsèque est une technique qui permet l'étude de la conformation et de la stabilité des protéines (Eftink et al., 1994 et 1998, Le Rumeur et al., 2003). Le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine sont trois acides aminés possédant un noyau aromatique qui leur confère la propriété d'absorber dans l'ultraviolet et d'émettre des photons de fluorescence. Chaque acide aminé présente une fluorescence caractéristique dans

l'ultraviolet (Teale et Weber, 1957) (Tableau II. 06). Les propriétés de fluorescence des protéines résultent de la présence de ces trois acides aminés (fluorophores naturels). Cependant, les résidus tryptophanes représentent 90 % de la fluorescence des protéines du fait d'un rendement quantique plus élevé que les deux autres. (Albani, 2001). La fluorescence intrinsèque du tryptophane est très sensible à son environnement (Eftink et al., 1994) car son intensité de fluorescence augmente ou diminue lorsque la chaîne polypeptidique se replie ou se dénature conduisant à un changement de son exposition au solvant (Eftink et al., 1998). Cette technique permet aussi la caractérisation des interactions moléculaires (protéines - protéines, protéines - lipides, protéines - détergents).

Acides aminés	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
Tryptophane	280	348
Tyrosine	274	303
Phénylalanine	257	282

Tableau II. 06 : Acides aminés aromatiques et leurs longueurs d'ondes caractéristiques dans H_2O à pH 7 (Albani et al., 2001).

Dans cette étude, la fluorescence intrinsèque des tryptophanes nous a permis de caractériser la conformation et la stabilité de la mTSPO (qui contient 13 tryptophanes pour 189 résidus). Les spectres et les cinétiques de fluorescence ont été enregistrés au laboratoire, à température ambiante, sous agitation avec un spectrophotomètre PTI (Photon Technology International). La taille des fentes d'entrée et de sortie des monochromateurs a été optimisée (en général 2 nm à l'excitation et 4 nm à l'émission) pour avoir un signal maximal et ne pas saturer le photomultiplicateur. Les spectres d'émission de fluorescence enregistrés entre 310 et 400 nm ont été obtenus avec une excitation à 290 nm, un temps d'intégration 1s, des pas d'incrémentation de 1 nm et un moyennage de 5 spectres. Pour les mesures de stabilité en solution, des cinétiques de fluorescence ont été enregistrées avec une excitation à 290 nm et une émission à 345 nm (longueur d'onde du maximum spectral).

2.5.8. Mesure de liaison de ligand

Rappels sur l'interaction récepteur - ligand

L'interaction non covalente entre une molécule M (une protéine par exemple) et son ligand L donne lieu à un complexe réversible :

$$\mathbf{M + L \rightleftharpoons ML}$$

La constante d'association ou constante d'affinité Ka est égale au rapport entre les concentrations à l'équilibre de la forme complexée et des formes libres des deux especes :

$$\mathbf{Ka = \frac{[ML]}{[M]\,[L]}}$$

La canstante Ka de l'interaction entre une protéine et son ligand est reliée à l'énergie libre de Gibbs standard (ΔG) par l'équation $Ka = e^{\Delta G/ RT}$ (T = température exprimée en Kelvin et R= 8,314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$). Plus cette constante est grande, plus l'affinité entre les deux molécules est forte.

L'énergie libre (ΔG°) est la somme de deux contributions énergétiques :

$\Delta G° = \Delta H° – T\Delta S°$

où ΔH° et ΔS° sont l'enthalpie et l'entropie standard de l'interaction.

L'enthalpie de liaison reflète principalement la force de l'interaction du ligand avec la protéine cible (interaction non covalente) par rapport aux interactions entretenues avec le solvant. L'entropie, quant à elle, s'explique principalement par deux contributions : l'entropie de changement de solvatation et le changement de l'entropie conformationnelle (Leavitt et al., 2001).

2.5.8.1. En détergent

2.5.8.1.1. La microcalorimétrie de titrage isotherme (ITC)

Parmi les différentes méthodes qui permettent d'étudier la thermodynamique des interactions entres deux espèces (protéine - métal, protéine - ligand, protéine - protéine ou autre), l'ITC est la seule méthode permettant la mesure directe de la constante d'affinité (Ka) et de la stoechiométrie (Bmax) de la réaction ainsi que les variations d'enthalpie (ΔH°) et d'entropie (ΔS°) (Ladbury et al., 1996).

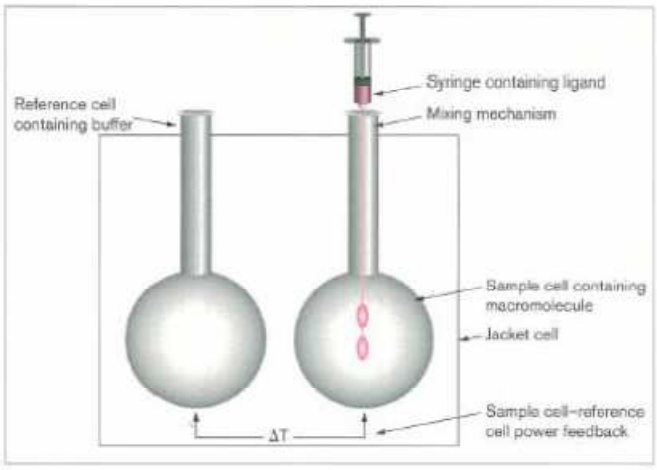
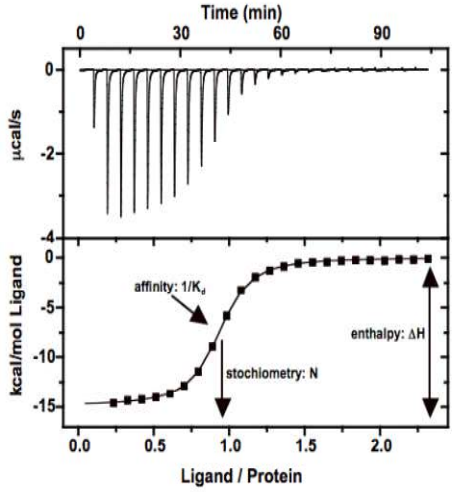


Figure II. 9 : Microcalorimètre ITC (Ladbury et al., 1996).

Lors d'une expérience d'ITC, de petites quantités de ligand sont ajoutées à l'aide d'une seringue, à intervalle régulier, dans une cellule contenant une macromolécule (protéine). Une solution sans protéine est placée dans une deuxième cellule, dite de référence (Figure II. 11). La température est maintenue constante entre ces deux cellules pendant le temps de titrage. A chaque injection, l'interaction entre les deux molécules s'accompagne d'une absorption ou d'un dégagement de chaleur (réaction endothermique ou exothermique) qui entraîne une variation de la température au sein de la cellule de travail. L'appareil applique alors une puissance électrique afin de rééquilibrer la température entre les deux cellules. La puissance fournie est mesurée en fonction du temps, elle est proportionnelle à la quantité de complexe formé (Figure II. 12.A). Le traitement des données acquises par un logiciel permet de générer une deuxième courbe par l'intégration des pics de variation d'énergie (ΔH°) en fonction du rapport molaire ligand/protéine. C'est à partir de cette deuxième courbe que l'on pourra calculer la stoechiométrie de la réaction et la constante Ka (Figure II. 12.B).



A

B

Figure II. 10 : Données microcalorimétriques caractéristiques d'une interaction ligand/macromolécule. (A) données brutes (µcal/sec en fonction du temps) d'une interaction provoquant un dégagement de chaleur (interaction exothermique). Si l'interaction est endothermique, la puissance est positive (> 0) et les pics observés sont orientés vers le haut. (B) Données traitées (kcal/mol de ligand en fonction du rapport molaire ligand/macromolécule). La courbe sigmoïde théorique est ajustée aux données expérimentales.

Les mesures microcalorimétriques de la liaison de PK 11195 avec la mTSPO ont été effectuées sur un microcalorimètre (TA Instruments) du laboratoire des BioMolécules (UPMC) en collaboration avec Sandrine Sagan.

Les solutions de mTSPO ont été injectées dans la cellule de travail (environ 1300 µl de protéine à 2 µM dans un tampon phosphate 10 mM, pH 6 en présence de détergent) préalablement rincée avec le même tampon. La seringue de titrage a été remplie avec les solutions de ligands à une concentration de 0,2 mM. Après l'obtention d'une ligne de base stable, la séquence d'injection consiste en 25 injections de 10 µL avec un intervalle entre injections de 5 min et sous agitation (250 rpm). Le blanc correspond à 25 injections de tampon-ligand dans une solution (sans protéine) contenant la même quantité de détergent présent dans les solutions protéiques.

2.5.8.1.2. Séparation des ligands libres et liés sur résine NTA-Ni

Comme toutes les chromatographies, la chromatographie d'affinité permet de séparer les composés d'un mélange. Nous avons utilisé cette capacité de séparation pour mesurer la liaison de ligand sur la mTSPO en la fixant par son étiquette polyhistidine sur la résine NTA-Ni. Nous avons ainsi séparé la protéine ayant un ligand lié et le ligand libre. La mTSPO a été mise en présence de son ligand dans un tube eppendorf puis incubée à température ambiante avec la résine NTA-Ni. Après une simple centrifugation 1 min à 2000 g, la mTSPO liée à la résine se retrouve au fond du tube et le ligand libre dans le surnageant. L'enregistrement de spectres d'absorption du surnageant (250 à 600 nm) (Figure II. 13) permet de suivre la fixation de la TSPO (à 280 nm) et de mesurer les ligands (PK 11195 et PPIX qui absorbent avec un maximum respectivement à 327 et 405 nm).

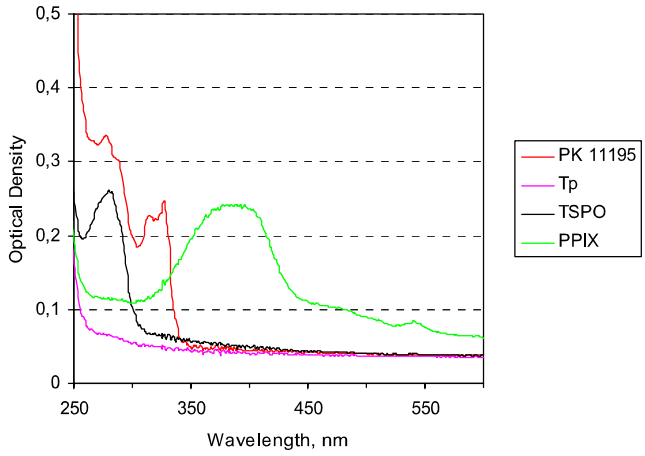


Figure II. 11 : Les spectres d'absorbance de la mTSPO (en noir), la PPIX (en vert), le PK11195 (en rouge) et le tampon phosphate 10 mM pH 7,8 contenant DPC (cmc) (en rose).

2.5.8.2. En protéoliposomes

De nombreuses protéines membranaires expriment leur activité seulement lorsqu'elles sont correctement repliées et insérées dans une bicouche lipidique au plus proche de leur état natif (Rigaud et al., 2002). La réincorporation des protéines membranaires purifiées en détergent dans des bicouches lipidiques synthétiques (liposomes) est l'une des techniques les plus utilisées pour étudier les aspects fonctionnels et structuraux de ces protéines (Banerjee et al., 1983).

2.5.8.2.1. Reconstitution

Le principe de la méthode de reconstitution consiste tout d'abord, à mettre la protéine membranaire solubilisée par un détergent en contact avec des lipides solubilisés eux aussi avec un détergent (formation d'un mélange ternaire protéine - lipides - détergent). Ensuite, le détergent est éliminé de la solution conduisant à la formation progressive des bicouches lipidiques fermées, dans lesquelles la protéine est incorporée (Rigaud et al., 2002). La méthode d'élimination de détergent utilisée dans notre cas a été la méthode d'adsorption sur des billes de polystyrène Biobeads (Bio-Beads SM2, Bio-Rad) (Rigaud et al., 1997, Lacapere et al., 2001).

Le suivi de la reconstitution peut être obtenu par différentes méthodes (Ostuni et al., 2010) : (i) dosage du détergent, (ii) diffusion de lumière puisque les protéoliposomes formés sont des objets plus grands que les complexes ternaires protéine-détergent-lipide, (iii) fluorescence si le changement d'environnement des tryptophanes s'y prête, (iv) microscopie électronique.

De manière pratique, la mTSPO purifiée en SDS a été diluée dans un tampon (Hepes NaOH 10 mM, pH 7,8, 2 cmc SDS (2 mg/ml)) à la concentration finale de 0,1 mg/mL, cette concentration permettant de réaliser les mesures d'absorbance et de fluorescence sans risquer la saturation du signal. Puis, le mélange de lipides DMPC/DMPE (9/1 p/p) a été ajouté de manière à obtenir le rapport lipide-protéine (LPR) désiré, en général égal à 5 pour les études focntionnelles. Des études antérieures avaient montré que la DMPC, lipide à chaîne courte avec une tête polaire choline ainsi que la présence de 10% de DMPE constituait un environnement optimal pour la formation de protéoliposomes avec la mTSPO (Lacapere et al., 2001). Ensuite, le SDS a été éliminé par adsorption sur des BioBeads, la reconstitution a été suivie par turbidimétrie en diffusion de lumière à 550 nm et/ou par fluorescence intrinsèque des tryptophanes. La quantité nécessaire de BioBeads pour éliminer la totalité du

SDS a été calculée à partir de la capacité 70 mg de SDS par g de BioBeads déterminée au laboratoire (Ostuni et al., 2010).

La microscopie électronique :

La microscopie électronique permet de suivre et de contrôler la réincorporation de la protéine en observant la formation des protéoliposomes. Les échantillons ont été déposés sur des grilles de Cu (200 mesh) lavées et préalablement carbonées (Lacapère, 2010). Le contraste (entre protéines, lipides et support) a été obtenu en utilisant de l'acétate d'uranyle (UA ; 1% poids/poids), qui fait apparaître les bords des vésicules en blanc (absence de colorant) et le centre des vésicules en noir (accumulation de colorant), l'ensemble constituant une coloration négative (le faisceau d'électron étant arrêté ou fortement déviés par les atomes lourds d'uranyle). L'observation a été réalisée grâce à un microscope électronique (JEOL JEM-1010) avec une haute tension de 80 kV. Différents champs ont été observés à plusieurs grandissements permettant de contrôler l'homogénéité de la solution et de mesurer la taille des protéoliposomes reconstitués.

2.5.8.2.2. Liaison de ligands radioactifs

Une fois la protéine reconstituée en protéoliposomes, on avait utilisé les ligands spécifiques radioactifs de la TSPO, le PK 11195 et le cholestérol pour déterminer si la TSPO avait une activité fonctionnelle de liaison. Pour ce faire les protéoliposomes ont été incubés dans des solutions de concentration croissante de [^{3}H] PK 11195 ou de [^{3}H] cholestérol, puis filtrés sur des filtres (Ostuni et al., 2010). Alors que les protéoliposomes sont retenus dans le filtre, la majeure partie des ligands libres passe au travers (voir plus loin l'optimisation) (Figure II. 14). Les filtres ont été ensuite mis en présence de 3 mL de liquide à scintillation et la radioactivité contenue dans les filtres a été mesurée à l'aide d'un compteur de radioactivité à scintillation liquide WALLAC 1409. Chaque mesure est réalisée trois fois sur trois filtres différents pour avoir des moyennes et obtenir des valeurs reproductibles.

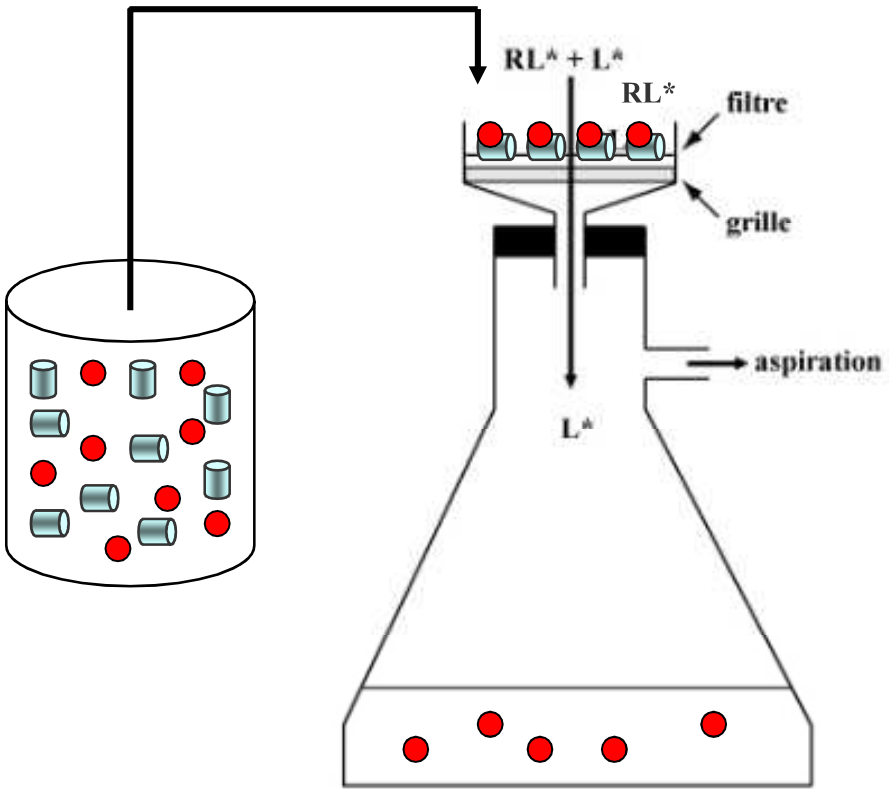


Figure II. 12 : Principe de la filtration.

Deux expériences ont été effectuées en parallèle pour mesurer la liaison spécifique et la liaison non spécifique des ligands. Lors de l'incubation on ajoute ou pas un excès de ligand non radioactif (ligand froid). En l'absence de ligand froid, les sites de liaisons spécifiques sur la mTSPO sont occupés par le ligand radioactif ainsi que les sites non spécifiques (liaison totale). Au contraire, en présence d'un excès de ligand froid, les sites spécifiques sont occupés par ce dernier mais les sites non spécifiques restent occupés par le ligand radioactif de la même manière (liaison non spécifique). La quantité de ligand lié spécifiquement à la protéine a été alors obtenue à partir de la liaison totale de ligand (lié spécifiquement et non spécifiquement) auquel on soustrait le ligand lié non spécifiquement (dans des membranes lipidiques ou sur les filtres).

Une simulation de la courbe de saturation de liaison du ligand lié à la mTSPO en fonction de la concentration totale peut être obtenue par l'équation suivante :

Ligand Lié = Ligand Total * Bmax / (Kd + Ligand Total)

Elle permet de calculer la constante de dissociation Kd et la capacité maximale de liaison Bmax (en nmol/mg de protéine) et ainsi d'en déduire la stoechiométrie de liaison du ligand.

Optimisation des conditions de mesure

Afin d'optimiser le signal spécifique avec une meilleure rétention de protéoliposomes et de diminuer le bruit de fond qui est dû principalement à la fixation non spécifique des ligands sur le filtre et le volume mort du filtre, le choix du filtre est crucial. Plusieurs filtres avec différentes compositions, épaisseurs et tailles de pores sont disponibles dans le commerce (GF/B, GF/C, GF/F en fibre de verre Whatman™, HAWP, en nitrocellulose, Millipore™). Des tests de rétention des protéoliposomes ainsi que la mesure du volume mort des différents filtres ont été réalisés à cet effet.

Test de rétention

Des solutions de protéoliposomes de concentration connue ont été filtrées à travers les différents filtres et la quantité de protéoliposomes retenue sur les filtres a été mesurée par la fluorescence intrinsèque du tryptophane des solutions avant et après filtration (Tableau II. 07).

Mesure du volume mort

Le volume restant après filtration (volume mort) dans les différents filtres a été mesuré en utilisant des solutions de [^{3}H] PK 11195 ou de [^{3}H] cholestérol de concentrations connues qui ont été filtrées à travers les différents filtres. Ce volume a été mesuré avec ou sans lavage pour voir si ce dernier diminuait le volume mort et par conséquence la fixation non spécifique (Tableau II. 07). Effectivement, on observe qu'avec le lavage la quantité de ligand fixée est beaucoup moins importante que sans lavage, cependant il affecte la rétention des protéoliposomes sur les filtres (résultats non montrés). Nous avons donc choisi une autre stratégie pour réduire la quantité de ligand fixé non spécifiquement sur le filtre, en diminuant la surface de filtration (il existe plusieurs types de supports commerciaux dont 2 de 25 et 13 mm de diamètre adaptés à nos conditions).

Filter	Proteoliposomes retention (% of total)	Background radioactivity (% of total)	
		Nonwashed	Washed
Whatman GF/B	74 ± 13	29.4	7.7
Whatman GF/C	62 ± 12	24.1	2.6
Whatman GF/F	60 ± 15	42.9	14.3
Millipore	86 ± 10	94.3	70.5

Tableau II. 07 : Caractéristiques des différents filtres testés pour la mesure de liaison du ligand radioactif PK 11195 à la mTSPO (Ostuni et al., 2010).

2.6. RMN

2.6.1. Principe

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) utilise les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (dans notre cas ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C). Ceux-ci, lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique et soumis à des impulsions électromagnétiques, absorbent l'énergie puis la relâchent lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires d'environnement.

2.6.2. Préparation des échantillons RMN

La sensibilité des différents noyaux n'est pas la même et l'acquisition de spectres ayant un bon rapport signal sur bruit dépend directement de la concentration de l'échantillon. Pour les études en RMN du ^{1}H, une concentration de 50 µM en protéine permet une acquisition correcte d'un spectre 1D en un temps acceptable (56 scans par exemple). Pour les études en RMN multidimensionnelle (^{1}H, ^{15}N, ^{13}C), la concentration en protéine doit être supérieure à 0,1 mM pour les études 2D (^{1}H, ^{15}N) et atteindre une valeur proche de 1 mM pour les études 2D (^{1}H, ^{13}C) et les études 3D (^{1}H, ^{15}N, ^{13}C). La solubilité de l'échantillon, sa stabilité aux températures utilisées pour obtenir des pics RMN fins et bien étalés dans la gamme spectrale ont été un objectif de ce travail (voir résultats).

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre RMN 500 MHz équipé d'une cryosonde (Bruker) en collaboration avec Céline Galvagnon et Nadège Jamin du laboratoire des Protéines Membranaires de l'iBitec (CEA Saclay) et Lucile Senicourt et Olivier Lequin au laboratoire des BioMolécules (UPMC).

Résultats et Discussion

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Expression et purification de la mTSPO

1.1. Expression dans E. coli

La construction plasmidique pET-15b- mTSPO (TSPO de souris) a été généreusement offerte par le Pr V. Papadopoulos du centre de recherche universitaire McGill, Montréal (Canada). Ce plasmide nous a permis la surexpression de la mTSPO dans la souche BL21 (DE3) d'*E. coli* après une induction de 5 h à 37°C et l'ajout de 1 mM d'IPTG.
La culture bactérienne dans ces conditions atteint une DO d'environ 5 (Figure III. 01).

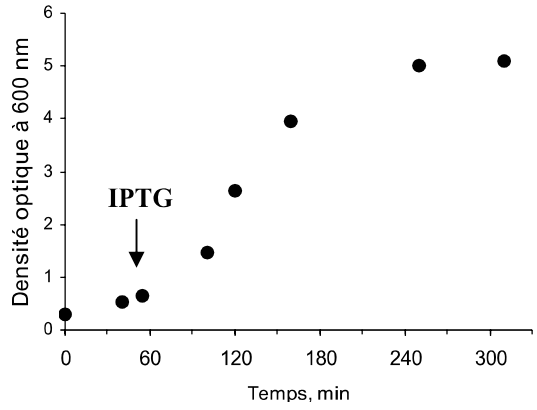


Figure III. 01 : Courbe de la croissance bactérienne d'E. coli **lors de la culture en milieu LB.** Le début de l'induction de l'expression de la TSPO par ajout d'IPTG est indiqué par une flèche.

1.2. Purification

Extraction des corps d'inclusion

La surproduction de la mTSPO dans les bactéries *E. coli* a pour conséquence son incorporation dans les corps d'inclusion (Garnier et al., 1993 ; Robert et al., 2010). Les bactéries avant et après induction ont été analysées par microscopie électronique en coloration négative (Figure III. 02). On observe de petites particules denses après induction facilement distinguables.

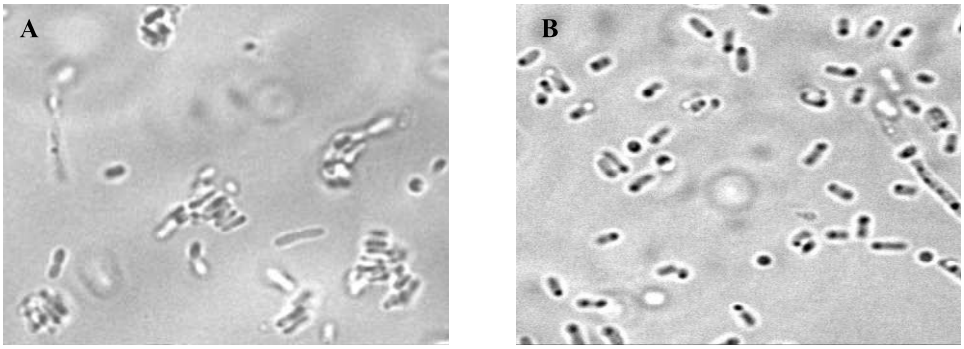


Figure III. 02 : Photographie prise au microscope électronique en coloration négative d'une culture de E. coli **BL21.** Avant (A) et après (B) induction par 1 mM d'IPTG de l'expression de la mTSPO.

Un taux d'expression trop élevé favorise les interactions hydrophobes intermoléculaires par rapport aux interactions internes, et empêche le repliement correct des protéines d'intérêt qui finissent dans des agrégats insolubles (corps d'inclusion) (Georgiou et Valax, 1999). Cet état a été longtemps considéré comme un inconvénient pour la purification de protéines recombinantes.

L'accumulation de la protéine dans les corps d'inclusion a toutefois quelques avantages : (i) elle peut être récupérée simplement par des séries de centrifugations et de lavages de culot, en effet, l'isolement de la protéine dans les corps d'inclusion peut constituer en elle-même une étape de purification (Marston et al., 1990); (ii) elle est protégée contre la protéolyse.

L'extraction des protéines des corps d'inclusions peut être obtenue par l'action d'agents forts comme le chlorure de guanidinium (GdmCl), l'urée ou le SDS (Palmer et al., 2012). La TSPO étant une protéine membranaire, l'ajout d'un détergent qui mime l'action des phospholipides autour des zones hydrophobes de la protéine est primordial pour la maintenir soluble, nous avons choisi le SDS pour extraire la mTSPO des corps d'inclusion et la maintenir soluble. La solubilisation des corps d'inclusion par le chlorure de guanidinium ou l'urée est en général suivie d'une étape de renaturation, ce qui aurait conduit à rajouter une étape pour les substituer par un détergent afin de maintenir la protéine soluble.

Chromatographie d'affinité

Après solubilisation des corps d'inclusion par le SDS, la mTSPO a été purifiée par chromatographie d'affinité sur résine NTA-Nickel. La colonne a été chargée avec le mélange issu de la solubilisation et les différentes fractions ont été analysées par spectrométrie d'absorption (spectres d'absorption entre 240 et 320 nm). Les premières fractions collectées

(lors de la charge) montrent une élimination de nucléotides (qui absorbent avec un maximum à 260 nm), puis les fractions de lavages ne contiennent que des protéines (maximum d'absorption à 280 nm) et l'élution de la mTSPO par 250 mM d'imidazole présente un spectre caractéristique avec un minimum à 250 nm, un maximum à 280 nm et un épaulement à 290 nm, ces derniers étant respectivement dus aux tyrosines et tryptophanes.

Le contenu protéique des différentes fractions collectées a été analysé par gels d'électrophorèse en polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE). Les bandes protéiques présentes dans les gels sont révélées par la coloration à l'argent. Les fractions correspondant au "Total (Tot)" avant la purification et au "Non Fixé (NF)" en sortie de colonne nous ont permis de constater la fixation d'une protéine de poids moléculaire de 20 kDa que l'on retrouve dans les fractions d'élution correspondant à la mTSPO (Figure III. 04). La quantité de protéine présente dans chaque fraction collectée a été calculée à partir des spectres enregistrés en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la mTSPO et permet de tracer un chromatogramme (Figure III. 03).

L'analyse du SDS-PAGE montre que la mTSPO présente dans plusieurs fractions d'élution est suffisamment pure pour qu'elles soient regroupées (E6-E9). L'analyse du contaminant présent dans certaines fractions est discutée au paragraphe 4.5. Ces fractions regroupées ont été dialysées contre des tampons adéquats (sans imidazole, ni NaCl par exemple) et stockées soit à 4°C pour un usage rapide ou à -20°C pour une conservation plus longue. Le maintient de l'intégrité de la protéine dans le temps a été suivie par analyse de dépôts sur des gels d'électrophorèse SDS-PAGE. Les profils obtenus pour des protéines gardées à 4°C, comme pour celles congelées à -20°C ne montrent pas de dégradation (résultats non montrés). La mTSPO purifiée en SDS est stable plusieurs semaines à 4°C et plusieurs années congelée à -20°C.

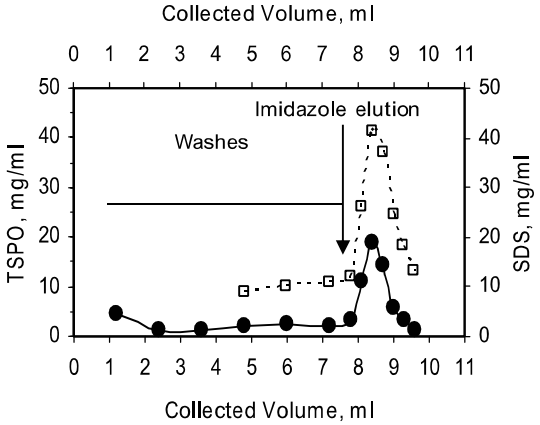


Figure III. 03 : Chromatogramme de purification de la mTSPO sur colonne NTA-Ni. L'analyse protéique des fractions éluées montre que la mTSPO est fortement présente permettant de convertir les mesures de densité optique en concentration de mTSPO (cercles pleins). Le contenu en SDS de chaque fraction a été mesuré (carrés vides).

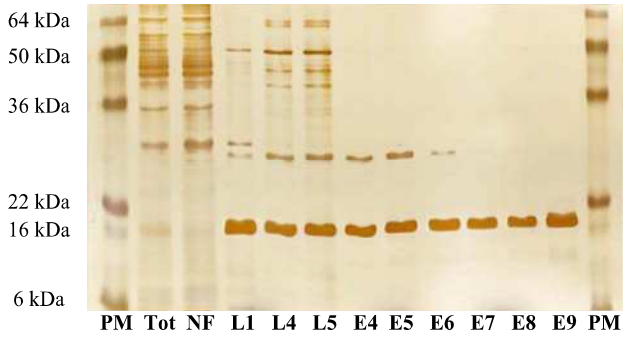


Figure III. 04 : Gel (SDS-PAGE) acrylamide 12 % coloré à l'argent représentant les différentes étapes de purification de la mTSPO. PM correspond aux standards de poids moléculaires. Tot (Total) correspond à la solution avant purification. NF (Non Fixé) correspond à la solution en sortie de colonne. L1, L4, L5 correspondent aux solutions de lavages. E4 à E9 correspondent aux solutions d'élution.

La méthode de préparation de la mTSPO recombinante entreprise dans cette étude nous a permis d'avoir une quantité (40 mg/L de culture), une concentration (pic maximum à 20 mg/ mL) et une stabilité satisfaisantes pour réaliser les différents tests biochimiques et biophysiques.

2. Caractérisation de la TSPO recombinante en SDS (mTSPO/SDS)

2.1. Mesure de la quantité de détergent

Pour réaliser les différentes études structurales et conformationnelles, il est nécessaire de connaître la quantité de détergent associé à la protéine purifiée. Par exemple, lors des études de cristallisation tridimensionnelle, la concentration initiale de détergent peut influencer la taille des cristaux (Schmidt-Krey et al., 1998). Contrôler la concentration de détergent est important pour la reproductibilité des cristaux car une concentration de détergent micellaire élevée peut perturber le processus de nucléation et/ou la croissance des cristaux (Privé, 2007). La cristallisation bidimensionnelle sous une monocouche lipidique par injection de la protéine membranaire en présence de détergent peut déstabiliser la monocouche, il est donc nécessaire de connaître et maitriser la quantité de détergent (Teboul et al., 2012, Vénien-Bryan et al., 1998, Levy et al., 2001).

La technique que nous avons utilisée pour le dosage est une approche spectrophotométrie par un substrat commercial Biorad sensible aux détergents (Ostuni et al., 2010). La Figure III.03 montre que dans les fractions de lavage, le détergent mesuré correspond à celui ajouté dans le tampon de lavage, alors que la concentration de détergent présente dans les fractions éluées augmente avec la concentration en protéine. Elle correspond à la quantité de détergent ajoutée dans le tampon d'élution plus celle amenée par la protéine (détergent entourant la protéine). A partir de ces deux concentrations (basale et en présence de mTSPO), on peut calculer la quantité de SDS associé à la protéine. Le rapport SDS/TSPO

obtenu (2 poids/poids) permet d'estimer que le nombre de molécules de SDS entourant la mTSPO est de 145, une valeur supérieure à celle d'une micelle de SDS qui est d'environ 60 (Linke, 2009). En effet, les molécules de SDS doivent couvrir toute la région hydrophobe de la mTSPO formée par les 5 hélices transmembranaires.

2.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'analyse enthalpique différentielle permet en théorie de déterminer la température de transition d'un échantillon d'un état replié vers un état dénaturé lorsqu'il est soumis à une programmation de température contrôlée.

Aucun pic de dénaturation de la mTSPO purifiée en SDS (mTSPO/SDS) et solubilisée dans le SDS n'a été observé sur le thermogramme sur la plage de température de 20°C à 80°C. Cette absence de température de transition nous laisse supposer que la mTSPO purifiée en SDS est inhomogène, elle est présente sous plusieurs conformations coexistantes et chaque conformation ayant une température de transition propre, on observe un étalement du pic de transition.

2.3. Digestion trypsique

Pour caractériser le repliement de la mTSPO/SDS, nous avons étudié son comportement en présence de trypsine. La mTSPO contient 11 arginines et 2 lysines qui sont les principaux sites de clivage de la trypsine. Ces sites de clivage se trouvent au niveau des boucles connectant les domaines transmembranaires et donc théoriquement accessibles. Différents rapports trypsine/mTSPO et temps de digestion ont été testés, mais aucune condition n'a permis d'observer des bandes de coupures sur gel SDS-PAGE. La figure III. 05 illustre une condition, la mTSPO/SDS a été incubée pendant 2 heures à 37°C en présence de trypsine à un rapport trypsine/mTSPO de 1/30 (poids/poids). Ceci indique que les sites de coupure ne sont pas accessibles à l'enzyme, suggérant que la mTSPO en micelles de SDS adopte un repliement compact qui n'expose pas les boucles.

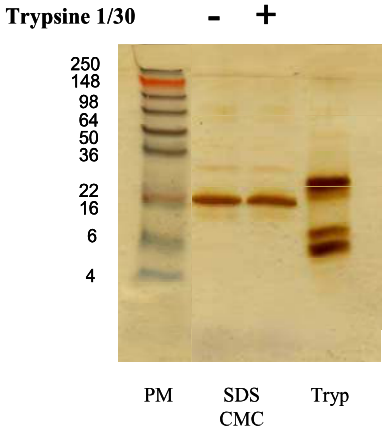


Figure III. 05 : Digestion trypsine de la mTSPO/SDS. Gel (SDS-PAGE) acrylamide 12% de la digestion par la trypsine de la mTSPO en micelle de SDS. Incubation de 2h à 37°C avec un rapport Trypsine/mTSPO de 1/30 (poids/poids). Tryp corespond a la trypsine et PM correspond aux standards de poids moléculaires. Nous avons vérifié que l'activité protéolytique de la trypsine est conservée en présence de SDS.

2.4. Dichroïsme circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire est une méthode simple et rapide qui permet d'évaluer la structure secondaire d'un peptide ou d'une protéine en analysant l'absorption dichroïque dans l'UV lointain car cette région est dominée par l'absorption des liaisons peptidiques.

Les spectres dichroïques de la mTSPO/SDS en présence de micelles de SDS ont été enregistrés entre 185 et 270 nm (Figure III. 06). L'analyse de ces spectres a été réalisée à l'aide de trois différents programmes SELCON 3, CONTIN et CDSSTR. Les résultats obtenus (Tableau III. 01) suggèrent que la mTSPO est composée majoritairement d'hélice-α mais que la structuration est inférieure aux prédictions théoriques. En effet, 5 hélices de 20 résidus (minimum pour traverser une membrane) sur un total de 169 résidus donnent une valeur de 53 % alors que la valeur mesurée est de l'ordre de 40%. Ces résultats suggèrent que la mTSPO en micelle de SDS n'a pas son repliement natif, confirmant les résultats de digestion trypsine.

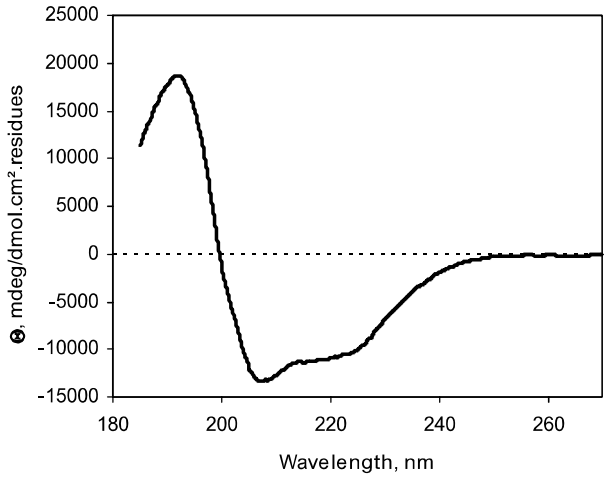


Figure III. 06 : Spectres de dichroïsme circulaire de la mTSPO/SDS. 0,1 mg/ml de mTSPO/SDS ont été observés dans un tampon contenant 2 cmc de SDS.

détergent	% hélice α	% feuillet β	% coude	% structure désordonnée
SDS	**36** ± 4	**14** ± 4	**21** ± 6	**28** ± 7

Tableau III. 01 : Analyse de la structure secondaire de la TSPO/SDS acquise par déconvolution des spectres dichroïques par le logiciel CDPRO.

2.5. Fluorescence intrinsèque

La TSPO est une protéine riche en tryptophane et nous avons utilisé sa fluorescence intrinsèque pour la caractériser. Il a été montré que le signal de fluorescence des tryptophanes est un outil de choix pour l'étude des changements conformationnels des protéines et de leur environnement. L'addition de mTSPO/SDS dans une solution sans détergent montre que le signal de fluorescence intense décroît dans le temps (Figure III.07 (a) (tracé rose)), alors que la même addition dans une solution contenant une cmc du SDS donne un signal plus faible mais stable (Figure III. 07 (a) (tracé bleu)). L'addition de concentrations croissantes de SDS à la mTSPO/SDS dans une solution sans détergent montre que l'intensité de fluorescence décroît jusqu'à ce que la concentration en SDS ait atteint 1 cmc (Figure III. 07 (b). L'interprétation de ces différences n'est pas simple. La cinétique observée en absence de détergent doit correspondre à la dissociation du SDS autour de la mTSPO. En effet, l'addition de SDS en fin de cinétique conduit à une augmentation et une stabilisation de la fluorescence. Par contre, pour expliquer la différence de niveau de fluorescence initial entre les deux conditions on peut penser qu'ils reflètent des états de repliement ou de polymérisation de la mTSPO différents conduisant à des changements d'environnement des tryptophanes.

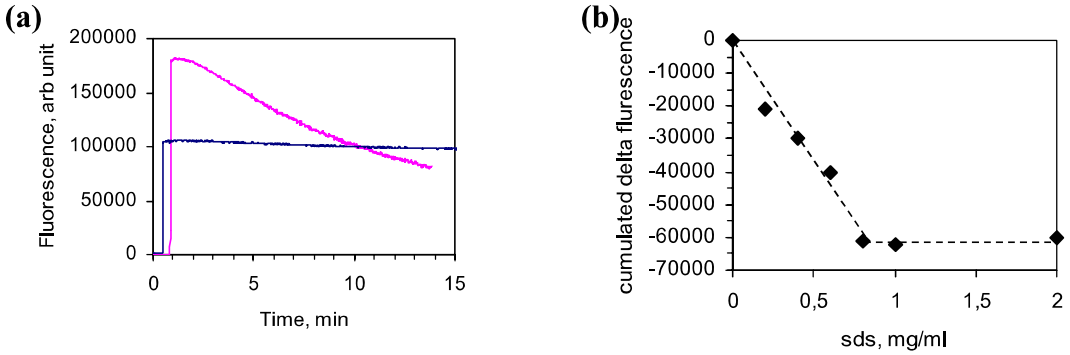


Figure III. 07 : Fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS. (a) Cinétique de l'évolution de la fluorescence intrinsèque de la mTSPO : en absence de SDS (rose), dans une solution contenant une cmc de SDS (bleu). (b) Fluorescence intrinsèque de la mTSPO en fonction de la concentration de SDS. (Longueur d'onde d'excitation à 290 nm et d'émission à 330 nm).

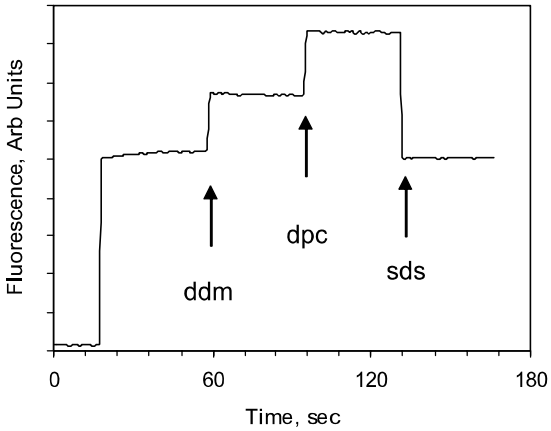


Figure III. 08 : Fluorescence intrinsèque de la TSPO en fonction du détergent. La cinétique de fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS (0,5 µM/1cmc) a été enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 290 nm et d'émission à 330 nm. Les flèches correspondent à l'ajout de DDM (2 cmc), DPC (4 cmc) et SDS (5 cmc).

L'addition de DDM (2 cmc) dans une solution contenant la mTSPO/SDS et une cmc de SDS induit une augmentation de 40 % de la fluorescence (Figure III. 08). Une addition supplémentaire de DPC (4 cmc) à la même solution, provoque une nouvelle augmentation de 40 % de la fluorescence. Ces changements de fluorescence sont complètement réversibles par l'ajout du SDS en quantité suffisante (5 cmc) (Figure III. 08). L'augmentation du signal qui est dû au DPC et DDM nous laisse penser que l'environnement du tryptophane a changé suggérant un éventuel changement de la structure de la TSPO dans ces deux détergents.

2.6. Spectrométrie de masse

C'est une méthode analytique très sensible qui permet de déterminer la masse moléculaire précise d'un composé chimique ou biologique en mesurant son rapport masse sur charge (m/c) après ionisation de la molécule (voir matériels et méthodes). Les détergents chargés comme le SDS apporté par la protéine purifiée interférent avec l'ionisation de la protéine et empêchent les mesures de masse par cette technique. L'addition de DDM, détergent non ionique, qui induit une augmentation de fluorescence intrinsèque (Figure III. 08), a permis de sortir la TSPO et de mesurer sa masse par MALDI-TOF (Sagan et Bolbach, 2009). La masse monochargée mesurée est de 20870 Da, ce qui correspond à la TSPO de souris augmentée de son étiquette polyhistidine, mais pour laquelle la méthionine en N-terminal a été perdue comme cela a déjà été décrit pour d'autres protéines recombinantes (Fernandez-San Milan et al., 2007).

2.7. Etude comparative du repliement de la mTSPO/SDS

La fluorescence de la mTSPO/SDS change en fonction de son environnement, nous avons tenté de dénaturer la mTSPO en ajoutant de l'urée, décrit comme un agent chaotropique dénaturant des protéines (Griko et al., 2001). Le spectre d'émission de la fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS dans une solution contenant 8 M d'urée montre une augmentation inattendue de l'intensité de fluorescence (Figure III. 09 (a)). L'évolution de la fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS est proportionnelle à la concentration d'urée (Figure III. 09 (b)). Ce signal est inferieur à celui obtenu avec la mTSPO/SDS mise en présence de DPC. Ces augmentations reflètent un changement de l'environnement des tryptophanes entre le SDS, l'urée et la DPC et peuvent suggérer un changement de la structure. Des mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées pour caractériser la structure secondaire de la mTSPO/SDS dans l'urée et la DPC. Les spectres obtenus sont représentés dans la figure III. 09 (c). Les spectres en présence de l'urée ont été réalisés entre 270 et 210

nm car au-delà de 210 nm l'urée absorbe et sature le signal. On observe dans cette figure une diminution du signal dichroïque de la mTSPO/SDS en présence d'urée alors qu'il augmente en présence de DPC. Par contre le spectre dichroïque de la mTSPO/SDS en présence d'urée ne varie pas si on augmente la concentration en SDS. L'analyse des spectres par déconvolution (Tableau III. 02) indique que la mTSPO/SDS en présence d'urée ne perd que partiellement sa structuration en hélice, alors qu'elle se structure plus en présence de DPC. Par contre, la présence conjointe d'urée et de SDS en concentration suffisante favorise une structuration secondaire en hélice.

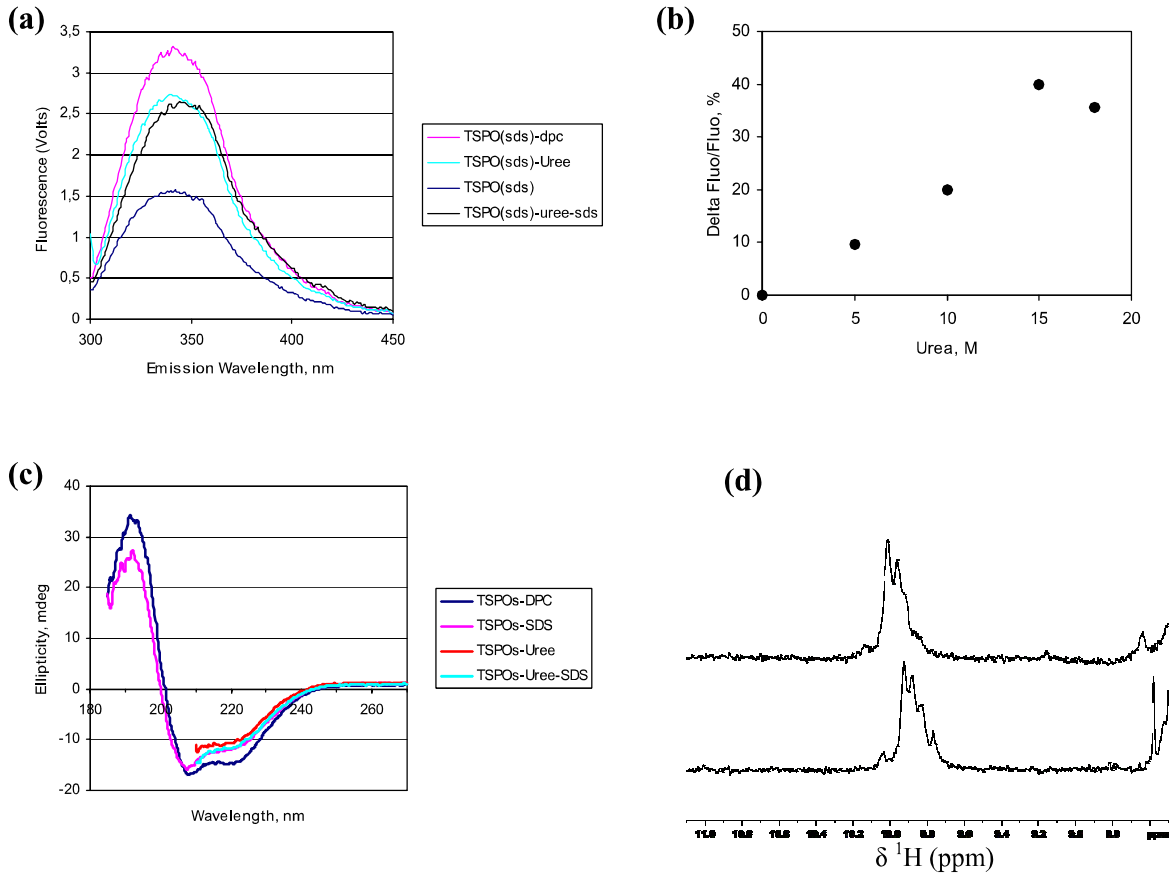


Figure III. 09 : Caractérisation du comportement de la mTSPO dans un milieu dénaturant. (a) Spectres de fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS dans une solution contenant du SDS (trait bleu foncé), de l'urée (trait bleu clair), de l'urée et du SDS (trait noir), de la DPC (trait rose). (b) Intensité de la fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS (à 340 nm) en fonction de la concentration d'urée. (c) Spectres de dichroïsme circulaire de la mTSPO/SDS dans les mêmes conditions que celles de fluorescence SDS (trait rose), DPC (trait bleu foncé), urée (trait rouge), urée et SDS (trait bleu clair). (d) Spectres RMN 1D ^{1}H de la mTSPO/SDS en présence d'urée (haut) ou de SDS (bas).

%	H	B	T	un
SDS	42	13	19	26
Uree	36	18	18	28
Uree SDS	47	12	16	25
DPC	50	10	16	24

Tableau III. 02 : Analyse de la structure secondaire acquise par déconvolution des différents spectres figurants dans la figure III. 09(c) par le logiciel CDPRO. H (hélice α), B (feuillet β), T (coude), un (structure désordonnée).

Il a été suggéré que la concentration d'urée nécessaire à la dénaturation d'une protéine permet d'en estimer sa stabilité. Plus la protéine est stable, plus elle est difficile à dénaturer et plus la concentration en agent dénaturant doit être grande. Dans notre cas il semble que l'urée soit incapable de dénaturer complètement la mTSPO/SDS. On peut penser que le SDS interagit fortement avec la mTSPO formant un complexe particulièrement stable. L'ajout de DPC ne vient pas substituer le SDS mais s'ajoute/s'associe comme l'urée. On forme des complexes mTSPO/SDS-DPC ou mTSPO/SDS-urée.

Des spectres RMN 1D du proton de la TSPO/SDS ont été enregistrés pour sonder l'environnement des protons de la protéine et analyser les effets de la présence des différents environnements. La dispersion des méthyles à haut champ, des protons amide et NH indoliques des chaînes latérales des tryptophanes à bas champ est révélatrice de la structuration de la protéine et de son environnement. La figure III. 09 (d) montre que les chaînes latérales des tryptophanes de la mTSPO/SDS sont visibles dans une région comprise entre 9,6 et 10,1 ppm. L'ajout d'urée ne déplace pas significativement ce massif tout comme la DDM. Par contre l'addition de DPC déplace le massif en deçà de 10,5 ppm (resultat non montré). .

La caractérisation de la mTSPO purifiée en SDS (mTSPO/SDS) montre qu'elle n'est pas homogène (DSC), qu'elle n'est pas complètement structurée (DC) et relativement compacte (protéolyse). L'addition de DPC à la mTSPO/SDS change son environnement comme révélé par la fluorescence intrinsèque et les spectres RMN 1D, mais aussi sa structure secondaire (DC). Cependant, cette addition ne permet probablement pas une substitution complète du détergent (SDS), si l'on se réfère aux effets de l'urée dont l'addition ne permet pas d'obtenir une dénaturation (DC). Nous avons donc développé des expériences d'échange complet.

3. Changement de l'environnement de la mTSPO recombinante

3.1. Echange de détergent lors de la purification

Il existe plusieurs méthodes pour échanger le détergent utilisé pour extraire les protéines membranaires des bicouches lipidiques ou des corps inclusion, en utilisant soit une précipitation dans un solvant organique (Wessel et al., 1984), soit par chromatographie hydroxyapatite céramique (Dong et al., 1997) ou par dialyse (Linke, 2009). La méthode entreprise dans cette étude est l'échange sur la colonne NTA-Ni lors de la purification (Warne et al., 2009). Elle est simple, rapide et permet l'utilisation de petites quantités de détergent en particulier si l'on utilise des détergents deutérés pour les études RMN relativement chers. La

substitution complète du SDS a été obtenue par un lavage abondant (plusieurs volumes de colonne) avec des concentrations du détergent de substitution plus importantes que celle de SDS. Ce protocole est adapté aux interactions fortes du SDS avec la TSPO, mais n'est pas applicable à tous les détergents (Robert et Lacapere, 2010). Par exemple, l'utilisation de Triton X100 ou d'octylglucoside ne permet pas l'élution de la TSPO de la colonne. De plus, il a été observé que l'élution de la TSPO en présence de DDM peut être obtenue mais la protéine est instable, et précipite rapidement. En réduisant les lavages, on peut obtenir une protéine stable, suggérant qu'il faut garder une petite quantité de SDS.

Une fois la TSPO obtenue dans différents détergents, ses propriétés biochimiques et biophysiques ont été caractérisées comme précédemment (rapport détergent/TSPO, digestion trypsine, DC, fluorescence intrinsèque et RMN 1D).

3.2. Dosage du détergent

Le tableau III. 03 présente les dosages de la quantité de chaque détergent avec qui la mTSPO recombinante a été purifiée avec la procédure colorimétrique décrite précédemment (Ostuni et al. 2010). On peut remarquer que le rapport détergent/mTSPO est relativement constant pour le SDS et la DPC puisqu'une molécule de mTSPO est entourée par 145-148 molécules de détergents. Par contre, le rapport DDM/mTSPO est beaucoup plus bas, ce qui peut être dû à la présence de SDS qui interagit avec la mTSPO et dont nous avons observé qu'il était nécessaire pour une purification en DDM (voir ci dessus).

Détergents	Rapport détergent/protéine (P/P)	Rapport détergent/protéine (mol/mol)	nombre d'agrégation	référence
SDS	2	145	62	Linke, 2009
DDM (SDS)	2	81	98	Linke, 2009
DPC	2.5	148	54-90	Lazaridis et al., 2005

Tableau III. 03 : Rapport détergent/mTSPO.

3.3. Digestion trypsique

Contrairement à ce qui a été observé auparavant pour la mTSPO/SDS, la mTSPO/DPC et la mTSPO/DDM (purifiée respectivement en présence de DPC ou de DDM) sont complètement digérées par la trypsine (Figure III. 10). Ceci nous laisse penser que la mTSPO/DPC et la mTSPO/ DDM adoptent un repliement qui laisse accessible les sites de coupure de la trypsine situé au niveau des boucles.

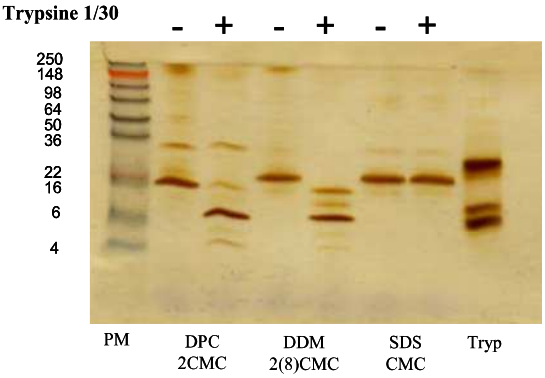


Figure III. 10 : Digestion à la trypsine de la mTSPO. Gel (SDS-PAGE) acrylamide 12% de la digestion par la trypsine de la mTSPO en SDS (cmc), en DPC (2 cmc) et ou en DDM (8 cmc). Incubation à 37°C pendant 2 h avec un rapport Trupsine/mTSPO de 1/30 (poids/poids).
Tryp correspond à la trypsine et PM correspond aux standards de poids moléculaires. Nous avons vérifié que l'activité protéolytique de la trypsine est conservée en présence de SDS, DPC et DDM aux concentrations utilisées.

Le PK 11195, ligand haute affinité de la TSPO, stabilise la structure secondaire de la mTSPO/DPC (Murail et al., 2008) et a permis récemment d'obtenir la structure à une résolution atomique par RMN (Jarmeko et al. 2014). En accord avec ces résultats, nous avons observé que la présence de PK 11195 protégeait de la digestion trypsique (Figure III. 11) en masquant probablement les sites de protéolyse. La liaison du PK11195 rapproche les TM et rend les sites de coupure placés dans les boucles cytosoliques moins accessibles à la trypsine.

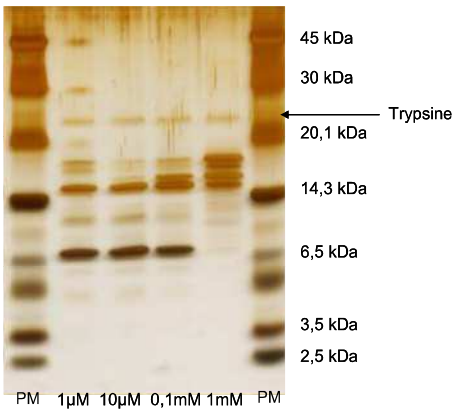


Figure III. 11 : Effet du PK 11195, ligand specifique de la TSPO, sur la digestion trypsine de la mTSPO/DPC. Gel (SDS-PAGE) acrylamide 12% de la digestion par la trypsine de la mTSPO/DPC en présence des concentrations croissantes de PK 11195 (1 µM- 1 mM), PM correspond aux standards de poids moléculaires. Incubation de 2 h à 37°C avec un rapport Trypsine/mTSPO de 1/30 (poids/poids). Nous avons vérifié que l'activité protéolytique de la trypsine est conservée en présence de DPC.

3.4. Dichroïsme circulaire

Des spectres dichroïques de la mTSPO purifiée dans différents détergents (mTSPO/SDS, mTSPO/DPC et mTSPO/DDM) ont été enregistrés et sont présentés dans la figure III. 12. L'analyse de ces spectres montre que le taux d'hélicité de la mTSPO augmente lorsque l'on change de détergent en allant du SDS au DDM et au DPC (Tableau III. 04), alors

que le taux de structure désordonnée diminue et que celui de feuillet β ne varie quasiment pas (Jamin et Lacapère 2007). Ces résultats sont en adéquation avec les augmentations de fluorescence (Figure III. 08), où le signal de fluorescence est plus élevé en DDM et DPC qu'en SDS.

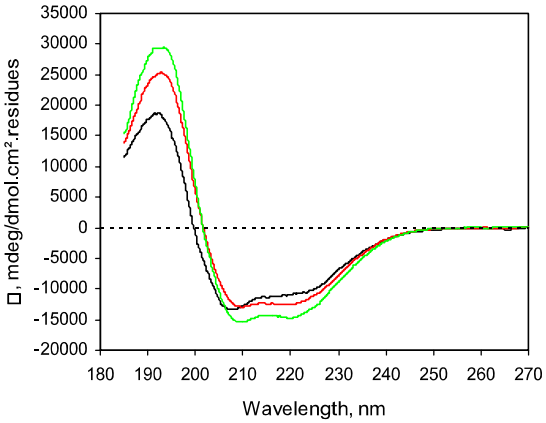


Figure III. 12 : Spectre de dichroïsme circulaire de la mTSPO/SDS dans différents détergents. 0,1 mg/ml de mTSPO/SDS ont été observés dans un tampon contenant 2 cmc de SDS (trait noir), 2 cmc de DDM (trait rouge) et 2 cmc de DPC (trait vert).

détergent	% hélice α	% Feuillet β	% coude	% structure désordonnée
SDS	**36** ± 4	**14** ± 4	**21** ± 6	**28** ± 7
DDM	**40** ± 5	**15** ± 4	**19** ± 4	**26** ± 5
DPC	**45** ± 7	**13** ± 9	**18** ± 5	**24** ± 9

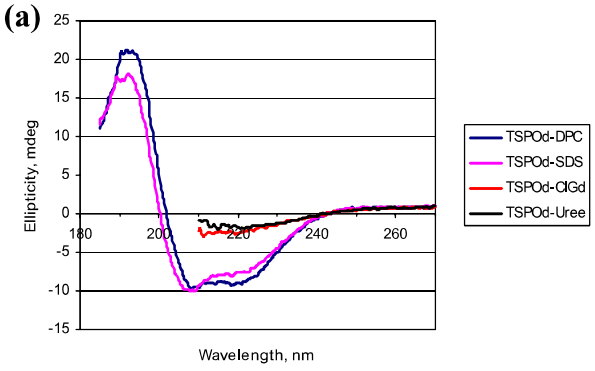
Tableau III. 04 : Analyse de la structure secondaire acquise par déconvolution des différents spectres de DC présentés dans la figure III. 12 par le logiciel CDPRO (Sreerama et al., 2004).

3.5. Etude comparative du repliement de la TSPO recombinante en DPC (mTSPO/DPC)

La figure III. 13(a) et le Tableau III. 05 montrent que la structure secondaire de la mTSPO/DPC peut être déstabilisée par les agents dénaturants comme l'urée et le chlorure de Guanidinium (GdmCl). Les spectres de dichroïsme circulaire de la mTSPO en présence de ces deux agents révèlent une forte diminution du signal à 220 nm. Leur analyse montre une disparition des structures en hélice α au profit de feuillets β et de structure désordonnée. L'addition de SDS à la mTSPO/DPC induit un changement de spectre dichroïque avec une réduction du taux d'hélice α. On peut noter que le repliement de la mTSPO dépend du

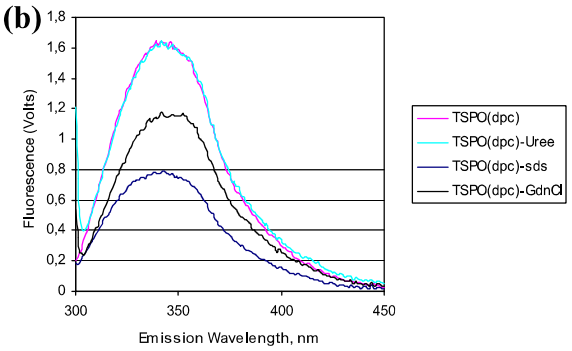
détergent présent majoritairement (voir Tableaux III. 02 et III. 05 correspondant à mTSPO/SDS et mTSPO/DPC).

Les spectres de fluorescence de la mTSPO/DPC obtenus dans les mêmes conditions que ceux de dichroïsme circulaire (Figure III. 13(b)) montrent qu'il est difficile de corréler l'intensité du signal de fluorescence intrinsèque à la structuration secondaire. En effet les spectres de la mTSPO/DPC en absence et en présence d'urée sont parfaitement superposés alors que la structure secondaire change énormément. La fluorescence intrinsèque révèle l'environnement des tryptophanes qui reste identique dans ces deux conditions. La présence de GdmCl provoque un changement important de la structure secondaire et une diminution de 50% de l'intensité de fluorescence avec un déplacement du maximum de fluorescence de près de 10 nm vers le rouge. Ce déplacement correspond à un changement d'environnement des tryptophanes avec un enfouissement dans un milieu plus hydrophobe (Maestro et al., 2005) qui, dans ce cas, peut être corrélé au changement de structure secondaire.



%	H	B	T	un
DPC	49-50	11-10	16	24
Urée	5	38	25	32
GdmCl	8	37	25	30

Tableau III. 05 : Analyse de la structure secondaire par déconvolution des différents spectres figurant dans la figure 13(a) par le logiciel CDPRO. H (hélice α), B (feuillet β), T (coude), un (structure désordonnée).



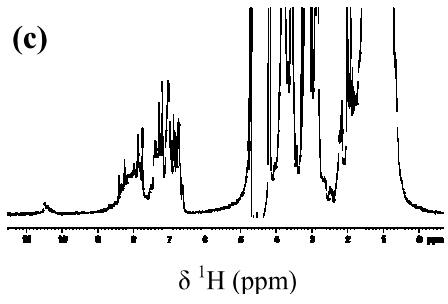


Figure III. 13 : Caractérisation du comportement de la mTSPO dans un milieu dénaturant. (a) Spectres de dichroïsme circulaire de la mTSPO/DPC dans une solution contenant du DPC (trait bleu foncé), de l'urée (trait noir), du GdmCl (trait rouge), du SDS (trait rose). **(b)** Spectres de fluorescence intrinsèque de la mTSPO/DPC dans les mêmes conditions que celles du dichroïsme circulaire DPC (trait rose), urée (trait bleu clair), GdmCl (trait noir), SDS (trait bleu). **(c)** Spectres RMN 1D ^{1}H de la mTSPO/DPC.

Le spectre RMN 1D du proton de la mTSPO/DPC (Figure III. 13(c)) montre que les chaînes latérales des tryptophanes sont visibles dans une région comprise entre 10 et 11 ppm et mieux caractérisé/étalé que lors de l'ajout de DPC à la mTSPO/SDS.

La caractérisation de la mTSPO purifiée en DPC (mTSPO/DPC) montre qu'elle est bien structurée avec un taux d'hélice α proche de la valeur théorique correspondant à 5 hélices transmembranaires (DC). Le positionnement des tryptophanes dans cet environnement donne des spectres RMN 1D plus étalés et des intensités de fluorescence plus importantes que pour la mTSPO/SDS. La couronne de détergent DPC entourant la protéine est facilement échangeable contrairement au SDS puisque l'urée et le GdmCl induisent une dénaturation importante. Le repliement obtenu dans ces conditions permet une accessibilité des sites de coupure trypsiques (inaccessibles pour la mTSPO/SDS) qui sont cependant masqués en présence du ligand de la TSPO, le PK 11195.

3.6. Ligands

La TSPO peut lier plusieurs types de ligands appartenant à des familles chimiques différentes (benzodiazépine comme le Diazépam ou le Chlorodiazépam - R0-4864, isoquinoléine comme le PK 11195, porphyrines comme la protoporphyrine IX, stéroïdes comme le cholestérol ou la prégnénolone) (Wendler et al., 2003 ; Lacapere et al., 2001 ; Le Fur et al., 1983). La mesure de leur liaison est un critère de "fonctionnalité" de la protéine recombinante et nous avons testé différentes méthodes pour caractériser cette liaison.

3.6.1. Fluorescence intrinsèque

Les mesures de changement de fluorescence intrinsèque ont été souvent utilisées pour mesurer des liaisons de ligands sur des protéines membranaires. Le signal peut être positif (augmentation) ou négatif (diminution) selon les interactions du ligand et de la protéine, l'intensité du signal induit peut varier selon le nombre de tryptophanes impliqués (Lacapere et al., 1981; Schroder-Tittmann et al., 2010). L'addition de PK 11195, comme de protoporphyrine IX (PPIX) à la mTSPO/DPC provoque une forte diminution du signal de fluorescence qui atteint une extinction de 100% avec une demi-saturation de 25 et 1,5 µM respectivement pour le PK 11195 et la PPIX (Figures III. 14). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour d'autres orthologues de la TSPO tant en termes de changement de fluorescence (100% d'extinction) que d'affinité (µM) (Li et al., 2013). Toutefois, il nous semble que cette extinction totale de la fluorescence intrinsèque ne soit pas en accord avec une mesure de liaison de ligand pour plusieurs raisons: (i) il est peu probable que tous les

tryptophanes participent aux interactions avec les ligands, (ii) les mêmes résultats ont été obtenus pour la mTSPO/DPC et la mTSPO/SDS (Figures III. 14), alors que cette dernière est mal repliée et ne doit probablement pas lier les ligands. Enfin les quantités de ligand nécessaires pour saturer le changement de fluorescence sont en large excès par rapport à la quantité de TSPO (0,25 µM) suggérant une affinité très éloignée de celle observée "*in vivo*" (Ostuni et al., 2009).

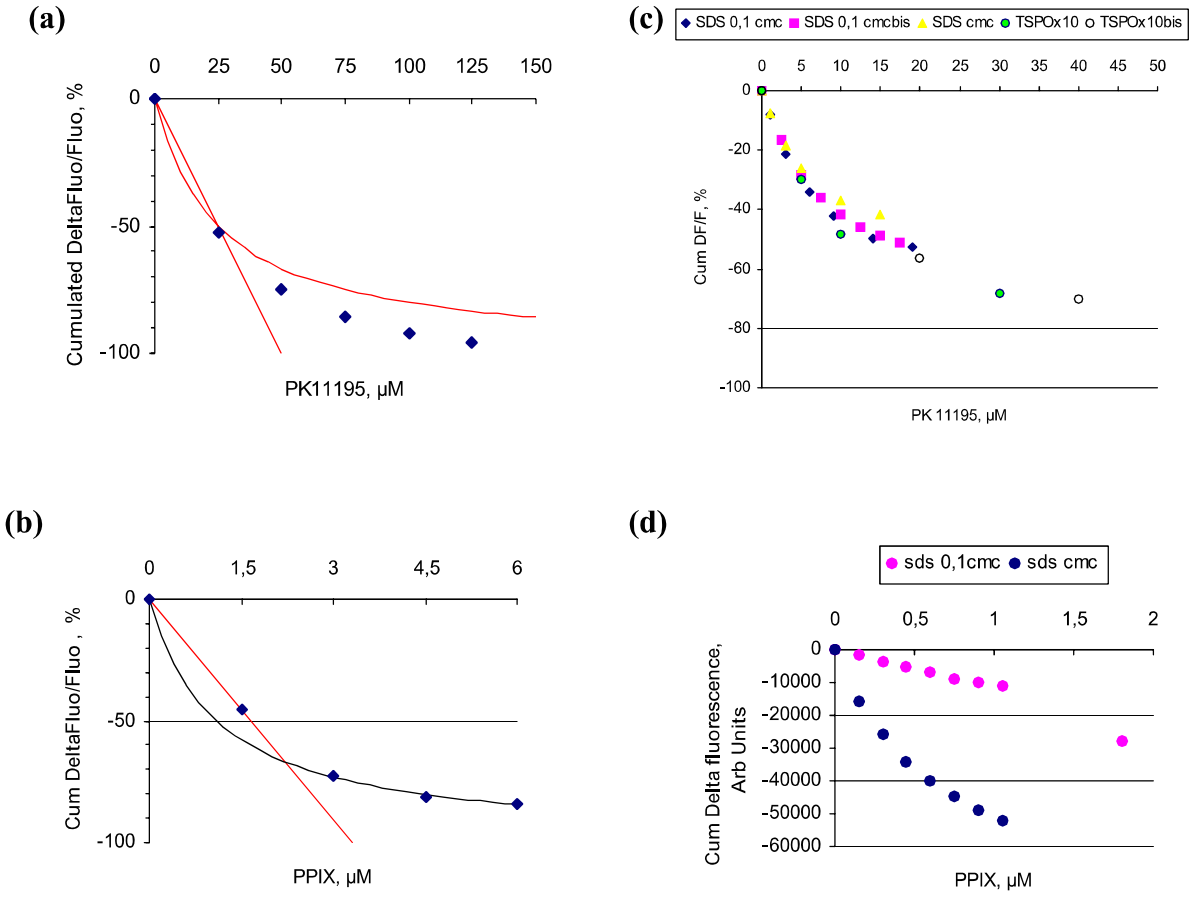


Figure III. 14 : Changements de fluorescence intrinsèque de la mTSPO induits par le PK 11195 (a, c) et la PPIX (b, d). (a) et (b) mTSPO/DPC et (c) et (d) mTSPO/SDS.

3.6.2. Calorimétrie à titrage isotherme (ITC)

La calorimétrie à titrage isotherme (ITC) constitue un outil de choix pour mesurer directement la chaleur associée à l'interaction d'un ligand à une protéine, pour en déduire la

constante d'affinité et la stœchiométrie. Dans ce contexte, cette technique a été utilisée pour évaluer l'affinité de la liaison du PK11195 à la mTSPO purifiée dans différents détergents. Les courbes de titrage représentant l'interaction entre le PK 11195 et la mTSPO/DPC ainsi que la mTSPO/SDS sont représentées sur la figure III. 15.

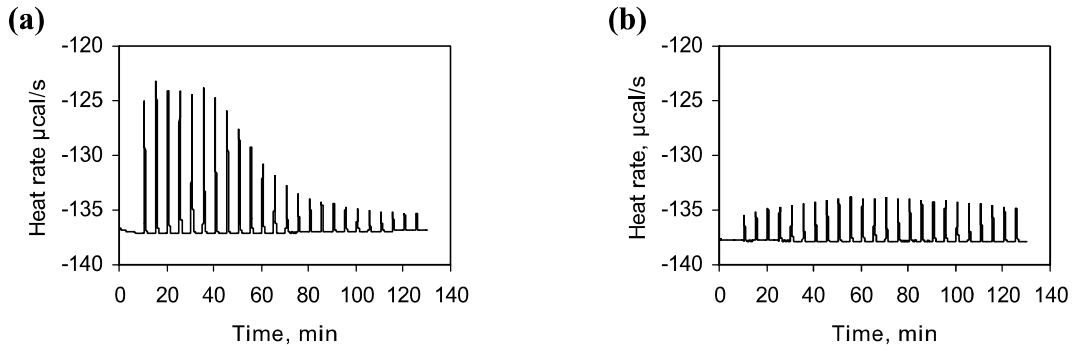


Figure III. 15 : Titrage isotherme des interactions de la mTSPO avec le PK 11195. (a) mTSPO/DPC (b) mTSPO/SDS.

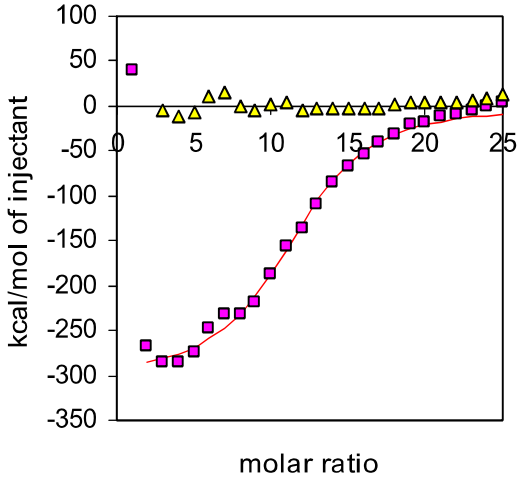


Figure III. 16 : Données intégrées (carré rose) en kcal/mol de PK11195 en fonction du rapport molaire PK11195/mTSPO, (triangle jaune) tampon sans mTSPO.

La figure III. 15 (a) montre les changements de chaleurs observés par des ajouts successifs de PK 11195 (10 µl 0,2 mM) sur la mTSPO/DPC (2 µM). Les premières additions provoquant un dégagement de chaleur indiquent la liaison du PK11195, puis le signal décroît jusqu'à une absence de signal indiquant la saturation des sites de liaison. Le traitement des données brutes effectué à l'aide du programme fourni par le fabricant après soustraction du blanc (même expérience avec du tampon sans protéine et contenant la même quantité de

détergent) (Figure III. 16), nous donne une valeur reproductible d'affinité de liaison de 0,6 µM pour plusieurs expériences. Cependant, la stœchiométrie mesurée donne une valeur très supérieure à 1 (environ 8 à 10 selon les expériences), ce qui suggère soit plusieurs sites de liaison du PK 11195 par mTSPO, soit une liaison non spécifique du ligand par exemple autour de la TSPO en interaction avec les molécules de détergent. Cependant, la structure de la mTSPO récemment publiée (Jaremko et al., 2014) montre qu'une seule molécule de PK11195 est liée à la mTSPO, nous pensons donc que cette stœchiométrie élevée vient d'une liaison non spécifique.

Aucun dégagement de chaleur n'est mesuré lorsque la mTSPO est solubilisée par le SDS (Figure III. 15 (b)) suggérant que le PK11195 ne se lie pas. Ce résultat conforte les résultats obtenus lors de la digestion par la trypsine et les mesures de dichroïsme circulaire, la mTSPO/SDS adopte une conformation compacte ne permettant pas au ligand d'accéder à son site de liaison qui est relativement profond dans la structure (Jaremko et al., 2014).

3.6.3. Séparation des ligands libres et liés

Il existe différentes manières de mesurer la liaison d'un ligand sur une protéine, plusieurs d'entre elles font appel à la séparation du ligand lié et du ligand libre. Après avoir incubé la mTSPO avec des ligands, nous avons utilisé la présence de l'étiquette polyhistidine pour séparer la mTSPO du milieu d'incubation et mesurer la quantité de ligand restant libre dans la solution grâce à leur absorption ou leur fluorescence (Vanhee et al., 2011). La mTSPO/DPC incubée en "Batch" avec NTA-Ni est retenue à 80 % après 30 minutes d'incubation pour atteindre presque 100% après 1 h (Figure III. 17(a)). Lorsque la mTSPO/DPC (~2,5 µM) est incubée en présence de PPIX (5 µM) elle est toujours retenue sur la résine NTA-Ni (Figure III. 17(a)) mais elle entraîne environ 50% de la PPIX (Figure III. 17(b)). Lorsque on incube ensemble la résine avec des quantités double de PPIX par rapport a la TSPO, on observe que la TSPO se fixe toujours sur la résine entraînant avec elle 50% de la PPIX puisque l'on retrouve plus 50% de PPIX dans le surnagent. Ce résultat suggère la fixation d'une PPIX par mTSPO, cette fixation est complètement déplacée par l'ajout de PK11195 en exces (Figure III. 17(b)). Les contrôles effectués avec la PPIX seule montrent une fixation non spécifique de celle-ci sur la résine.

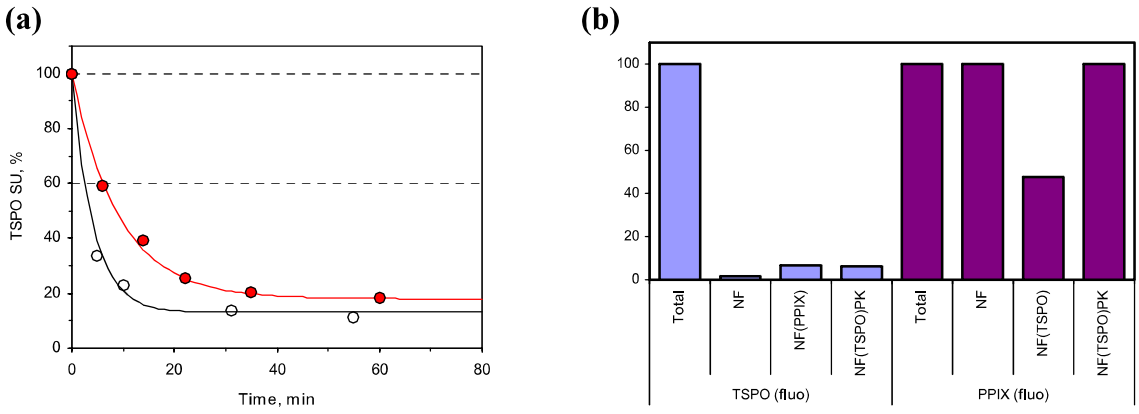


Figure III. 17 : Mesure de liaison de ligands par séparation du ligand lié et libre; (a) cinétique d'adsorption de la mTSPO/DPC (2,5 µM) sur la résine NTA-Ni (500 µl) en absence (noir) ou en présence de PPIX (5 µM) (rouge). **(b)** Mesure de liaison de la PPIX (5µM) sur la mTSPO/DPC (2.5µM) en presence ou en absence de PK 11195 (100µM).

3.7. Reconstitution de la mTSPO dans des liposomes

La TSPO est une protéine membranaire et il est important de vérifier son "comportement" dans un environnement le plus proche des conditions naturelles. Pour cela nous avons réintroduit la protéine dans une membrane lipidique et formé des protéoliposomes. L'étude de l'activité fonctionnelle a été réalisée par la mesure de liaison de ligands radioactifs après reconstitution de la TSPO dans un mélange de lipides (DMPC/DMPE, rapport 9/1) qui permet une formation de protéoliposomes et une bonne liaison du PK 11195 et du cholestérol radioactif (Lacapere et al., 2001, Delavoie et al., 2003; Jamin et al., 2005; Ostuni et al., 2010; Teboul et al., 2012). La reconstitution est suivie par plusieurs approches : *(i)* fluorescence intrinsèque, *(ii)* turbidimétrie en diffusion de lumière à 550 nm, *(iii)* microscopie électronique et *(iv)* dichroïsme circulaire (Ostuni et al., 2010; Teboul et al., 2012; Lacapere et al., 2014).

La reconstitution consiste à mélanger la mTSPO solubilisée en SDS avec des lipides (DMPC/DMPE, rapport 9/1) eux mêmes solubilisés en SDS, puis d'éliminer le détergent pour permettre la formation des protéoliposomes. Les techniques couramment utilisées pour l'élimination du détergent sont la dilution (Dolder et al., 1996), la dialyse (Jap et al., 1992), et l'adsorption sélective des détergent sur des BioBeads (Rigaud et al., 1997). Nous avons effectué cette élimination par ajouts de BioBeads (Lacapere et al., 2001). Au fur et à mesure de l'élimination du SDS par les BioBeads, on observe une augmentation de la fluorescence intrinsèque de la mTSPO (Figure III. 18(a-b)) qui indique probablement un changement d'environnement et de conformation de la protéine lorsqu'elle s'entoure d'une membrane

lipidique ce que lui permet d'adopter un repliement correct. En effet, cette augmentation du signal est d'une amplitude similaire à celle observée lors de l'échange SDS-DPC (Figures III. 09, 10 et 13) et s'accompagne d'un décalage spectral vers le bleu compatible avec un environnement moins hydrophobe (Maestro et a1., 2005). On observe aussi au fur et à mesure de l'élimination du détergent, une augmentation de la turbidité de la solution à 550 nm indiquant le passage de petits objets (complexe mTSPO SDS) à la formation de plus gros objets qui diffusent la lumière et correspondant aux protéoliposomes (Figure III. 18(e)). Le changement de la structure secondaire de la mTSPO lors de la reconstitution a été suivi par l'enregistrement des spectres de DC (Figure III. 18(c)). On observe un changement spectral avec une diminution à 205 nm reflétant un changement de la structure secondaire de la protéine. L'interprétation précise de ces résultats reste difficile. La méthode la plus "visuelle" pour suivre la formation des protéoliposomes, i.e. de vésicules, est la microscopie électronique. La figure III. 18(d) montre une image de microscopie électronique par coloration négative des protéoliposomes formés contenant la mTSPO, ils sont de taille homogène d'environ 200 nm et ne sont pas agrégés (Figure III. 18(f)).

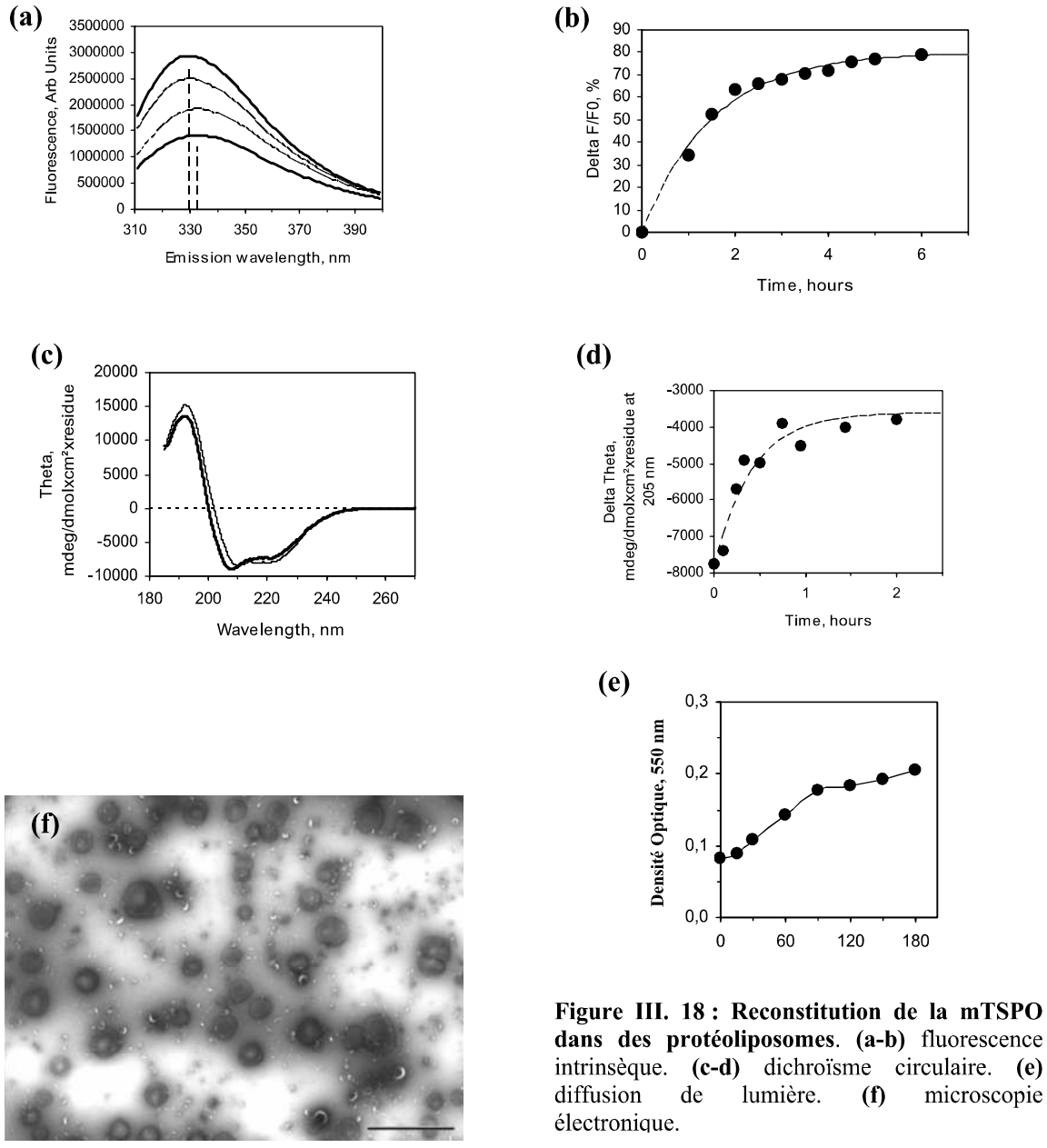


Figure III. 18 : Reconstitution de la mTSPO dans des protéoliposomes. **(a-b)** fluorescence intrinsèque. **(c-d)** dichroïsme circulaire. **(e)** diffusion de lumière. **(f)** microscopie électronique.

La mesure de liaison de ligands sur la mTSPO réincorporée dans une membrane a été réalisée par incubation des protéoliposomes avec les ligands radioactifs ([^{3}H] PK11195 et [^{3}H] cholestérol) puis filtration afin de séparer les ligands libres des ligands liés qui sont retenus dans les filtres avec les protéoliposomes.

3.7.1. Mesure de liaison du PK 11195

La mesure de liaison de doses croissantes de PK 11195 radioactif sur la mTSPO est présentée dans la figure III. 19. La simulation des données avec une courbe de saturation de liaison par l'équation *Ligand lié = Bmax*(ligand/Kd+ligand)* (Figure III. 19) nous a permis

de mesurer une affinité de 6±3 nM et un Bmax de 30±3 nmol de PK 11195 liés par mg de mTSPO. Cette affinité est en accord avec les données obtenues précédemment avec la mTSPO recombinante (Lacapere et al., 2001; Delavoie et al., 2003; Jamin et al., 2005; Ostuni et al., 2010) et aussi avec celle observée avec des préparations de membranes de tissus (Ostuni M et al., 2009). Le Bmax obtenu dans ces conditions est inférieur à la stœchiométrie maximale calculée théoriquement (la mTSPO ayant un poids moléculaire d'environ 20 kDa, une stœchiométrie d'un ligand par protéine correspond à environ 50 nmol de ligand lié par mg de mTSPO). On peut émettre ici plusieurs hypothèses pour expliquer la différence entre les mesures et la théorie : *(i)* tous les sites de liaison ne sont pas accessibles car, lors de la reconstitution, les protéines peuvent prendre deux orientations possibles faisant face à l'intérieur ou à l'extérieur des vésicules ; *(ii)* toutes les protéines ne sont pas fonctionnelles, une partie des protéines est mal repliée ou mal incorporée ; *(iii)* une partie des protéoliposomes n'est pas retenue lors de la filtration.

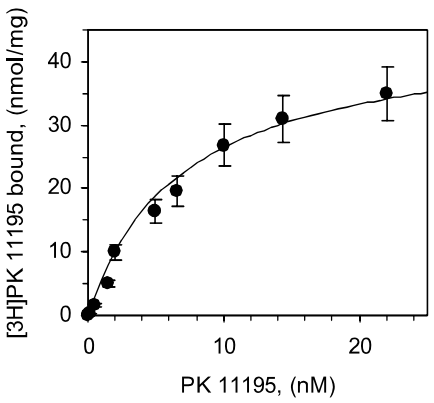


Figure III. 19 : Liaison du PK 11195. La simulation des données avec une courbe de saturation permet d'obtenir une affinité de 6±3 nM et un Bmax de 30±3 nmol.

3.7.2. Mesure de liaison du Cholestérol

La mesure de liaison de doses croissantes de cholestérol radioactif sur la mTSPO est présentée dans la figure III. 20. La simulation des données avec une courbe de saturation nous a permis de mesurer une affinité de 6±2 nM et un Bmax de 37±4 nmol de PK11195/mg de mTSPO. Ces deux valeurs de Kd et de Bmax sont en accord avec celles obtenues précédemment avec la mTSPO recombinante (Lacapere et al., 2001; Delavoie et al., 2003; Jamin et al., 2005; Ostuni et al., 2010).

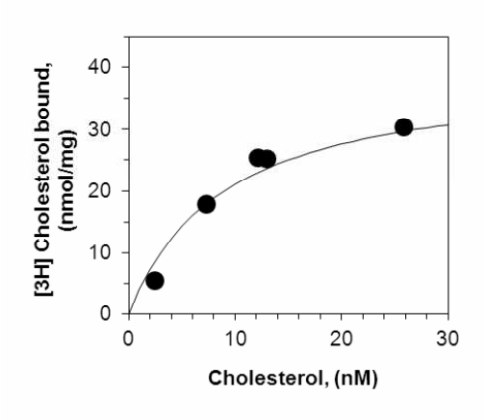


Figure III. 20 : Liaison du Cholestérol. La simulation des données avec une courbe de saturation permet d'obtenir une affinité de 6±2 nM et un Bmax de 37±4 nmol.

3.7.3. Mesure de liaison de la PPIX

Des mesures de liaison du PK 11195 en présence de concentrations croissantes de PPIX (Figure III. 21) montrent une diminution de la quantité de PK 11195 lié, suggérant que ces deux ligands sont compétiteurs et qu'ils devaient se lier sur le même site. La simulation des données avec une courbe de compétition par l'équation *Ligand lié = 100-100*(ligand/Kc+ligand)* permet d'estimer une constante de compétition et le calcul du Kd de la PPIX est obtenu par l'équation *Kc=Kd*(1+[PK 11195]/Kd PK 11195)*. La valeur d'affinité de la mTSPO de l'ordre de 1 µM pour la PPIX ainsi obtenue est en accord avec les données de la littérature (Hirsch et al., 1988; Ostuni et al., 2010) effectués sur des membranes natives. Mais il faut noter qu'elle est supérieure (Verma et al., 1987; 1988) et inférieure (Wendler et al., 2003) à d'autres.

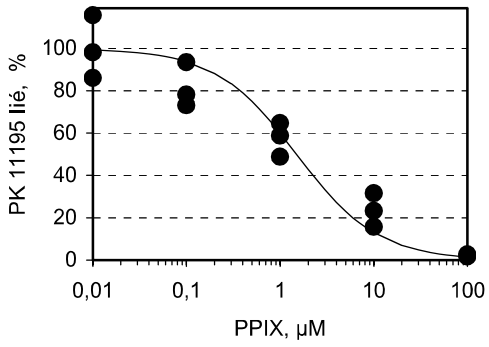


Figure III. 21 : Chasse du PK 11195 par la protoporphyrin IX (PPIX). La simulation des données avec une courbe de chasse permet d'obtenir une affinité de 1±3 µm.

3.8. Etude de stabilité de la mTSPO par fluorescence intrinsèque

La nature souple et dynamique de la ceinture de détergent qui entoure une protéine membranaire est une des cause des difficultés des études structurales (Privé et al., 2007). En

particulier, lors de la cristallisation les propriétés du complexe protéine - détergent ne sont pas forcement favorables à la formation d'un réseau bien ordonné. Différentes approches de stabilisation ont été étudiées comme la sélection du détergent, l'ajout de lipides, de ligands, les mutations-délétions (LeMaire et al., 2000; Seddon et al., 2004; Privé et al.,2007; Warne et al., 2009).

Nous avons montré précédemment dans ce travail que le changement du détergent entourant la mTSPO était un facteur important pour la structuration de la protéine (Figure III. 12). Toutefois, ce paramètre n'est pas suffisant car la fluorescence intrinsèque de la mTSPO/DPC, qui a le meilleur taux d'hélicité, montre une décroissance au cours du temps qui suggère une instabilité (Figure III. 22). Nous avons dans un premier temps tenter de stabiliser cette fluorescence en joutant des lysophospholipides qui se comportent comme des détergents (car ils n'ont qu'une chaîne aliphatique contrairement aux phospholipides qui en ont deux) mais qui possèdent une tête polaire commune avec les phospholipides. Nos collaborateurs RMNistes en ont testé plusieurs et ont observé que seule la LMPE (Lyso Myristoyl Phosphatidyl Ethanolamine) combinée à la DPC avait un effet sur les spectres (Galvagnon, 2011). Ce résultat peut être comparé d'une part à la composition de la membrane des mitochondries qui est essentiellement formée de phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) et d'autre part à nos travaux sur la reconstitution de la mTSPO en liposomes qui montrent qu'un mélange de DM**PC** et DM**PE**, (DiMyristoyl Phosphatidyl Choline et Ethanolamine), stabilise la structure et permet de récupérer une bonne liaison de ligand (Lacapere et al., 2001; Delavoie et al. 2003; Jamin et al., 2005; Ostuni et al., 2010).

La figure III. 22 (a) montre que la fluorescence intrinsèque de la mTSPO/DPC est stabilisée en présence des quantités croissantes de LMPE.

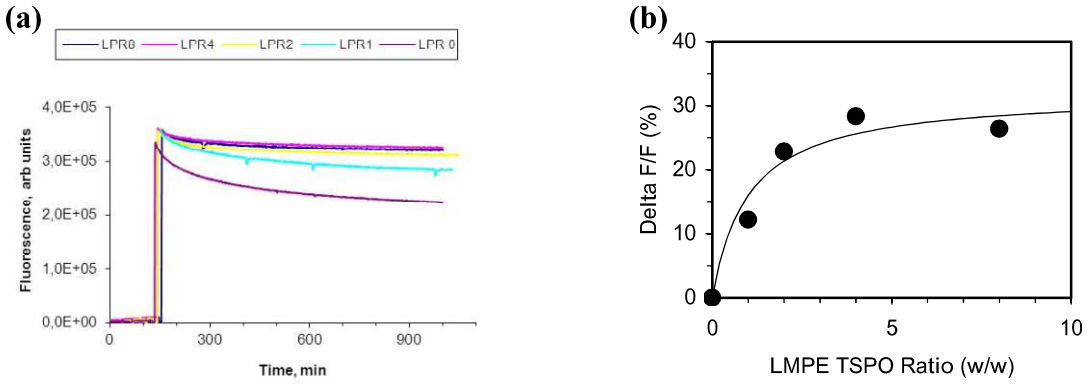


Figure III. 22 : Stabilisation de la fluorescence de la mTSPO/DPC par des lysodérivés. (a) cinétiques de fluorescence en présence de quantités croissantes de LMPE (b) Dépendance en concentration de la stabilité. Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec une excitation à 290 nm et une émission à 340 nm. La courbe de stabilisation de fluorescence par la LMPE est maximale dès un rapport de 2 (p/p).

Cette stabilisation dépend de la quantité de LMPE ajoutée (Figure III. 22 (b)) et est optimale à partir d'un rapport LMPE sur mTSPO de 2 (poids/poids). Des tests de substitution complète de la DPC par la LPE ont montré que c'était impossible, suggérant que la présence conjointe des deux molécules (DPC et LMPE) était nécessaire. Le mécanisme de stabilisation suggère une interaction de la mTSPO avec la LMPE, mais la composition du complexe stabilisé n'est pas élucidée car deux hypothèses sont possibles : (i) la LMPE se substitue partiellement à la DPC ou (ii) la LMPE s'ajoute à la DPC pour former des complexes mTSPO/DPC/LMPE.

Une stabilisation du signal de fluorescence de la mTSPO/DPC a été également observée en ajoutant un mélange de DMPC et DMPE dans un rapport 9/1 comme utilisé pour les reconstitutions (Figure III. 23 (a)). Cette stabilisation est dépendante de la quantité de lipides ajoutée (Figure III. 23 (b)) et atteint son maximum avec un rapport lipides sur protéine (LPR) d'environ 2-4 (poids/poids). Le mécanisme de stabilisation suggère une interaction de la mTSPO avec les lipides, mais la nature et la forme des objets formés n'ont pas été élucidés/étudiés. Au maximum cinquante à cent molecules de lipides sont associées à la mTSPO.

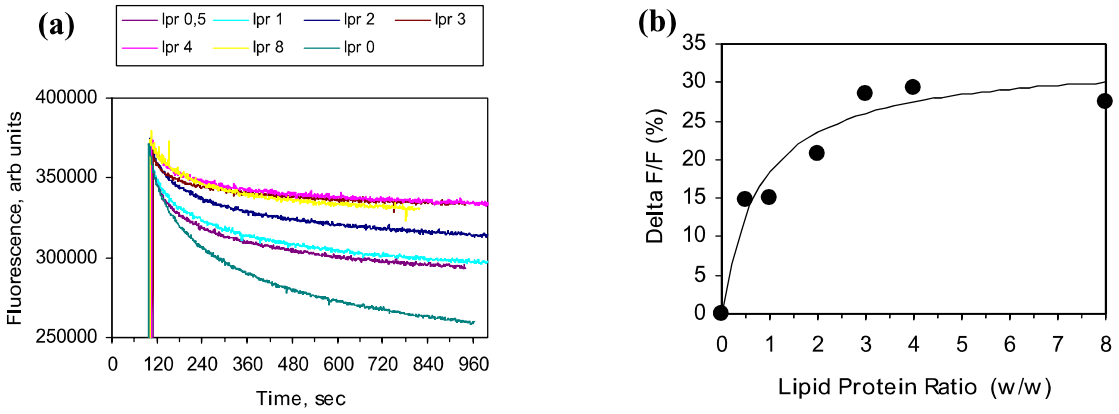


Figure III. 23 : Stabilisation de la fluorescence de la mTSPO/DPC par des lipides. (a) cinétiques de fluorescence en présence de quantités croissantes de DMPC/DMPE (b) Dépendance en concentration de la stabilité. Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec une excitation à 290 nm et une émission à 340 nm. La courbe de stabilisation de fluorescence par les lipides est maximale dès un rapport de 3 (p/p).

Contrairement aux résultats obtenus avec la mTSPO/DPC, la modification de l'environnement de mTSPO/SDS par des lipides est très complexe car le SDS possède une interaction très forte avec la protéine et ne permet par aux lipides de venir autour car il a une propriété "délipidante" forte (Kragh- Hansen et al., 1998). En ce qui concerne la TSPO/DDM (SDS), l'adition du mélange de DMPC et DMPE induit une augmentation du signal de fluorescence intrinsèque important (Figure III. 24 (a)) jusqu'à un niveau comparable à celui de la mTSPO/DPC suggérant une association à la protéine. Le maximum est atteint avec un rapport lipides sur protéine (LPR) d'environ 5 (poids/poids) supérieur à celui observé pour la mTSPO/DPC qui peut être dû à la présence de SDS (Figure III. 24 (b)).

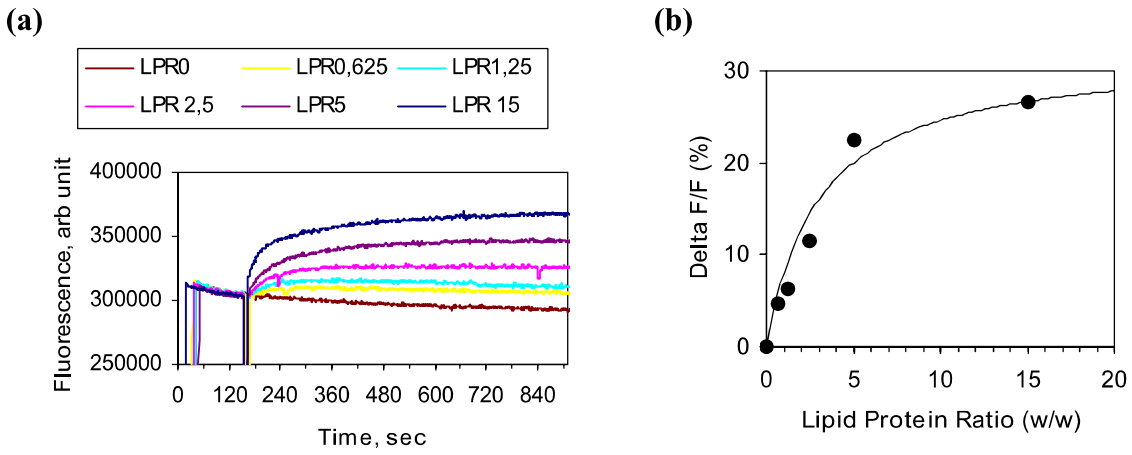


Figure III. 24 : Augmentation de la fluorescence de la mTSPO/DDM (SDS) en présence de lipides. (a) cinétiques de fluorescence en présence de quantités croissantes de DMPC/DMPE (b) Dépendance en concentration de l'augmentation de fluorescence Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec une excitation à 290 nm et une émission à 340 nm. La courbe de stabilisation de fluorescence par les lipides est maximale dès un rapport de 5 (p/p).

On peut noter à ce stade que les spectres RMN 1D de la mTSPO/DPC en présence de DMPC/DMPE corroborent les résultats obtenus par fluorescence puisque une modification de l'environnement des tryptophanes est suggérée par une variation du déplacement chimique des NH indolique (Figure III. 25). Des lipides avec différentes têtes polaires (DMPC, DMPG, DMPS, POPS, ...) ont été testés montrant un effet plus prononcé de la DMPC parmi les différents lipides testés (Galvagnon, 2011).

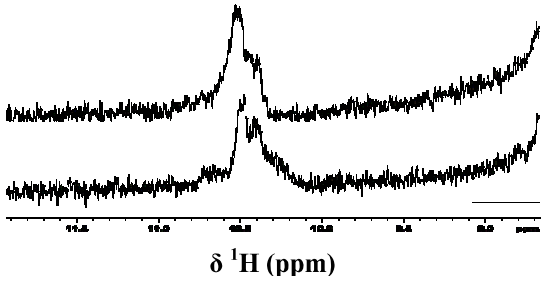


Figure III. 25 : Spectres RMN 1D (^{1}H) de la mTSPO/DPC en absence (tracé inférieur) ou en présence de lipides DMPC/PE (tracé supérieur). Le spectre correspond à la région des NH des chaînes latérales des tryptophanes.

En conclusion, la substitution du SDS entourant la mTSPO par le DPC conduit à un changement de repliement de la protéine dans un état plus "fonctionnel" au regard de sa structure et de sa possibilité de lier le PK 11195. Toutefois, l'instabilité de la fluorescence intrinsèque de la protéine suggère que le DPC seul n'est pas suffisant pour aborder les études structurales, la présence d'un "agent stabilisant" semble nécessaire. L'ajout de lipides (ou lysodérivés) avec le DPC (système ternaire) ou la substitution complète du détergent par des lipides (système reconstitué) permet un gain significatif de stabilité et un état fonctionnel de meilleur affinité pour la liaison des ligands de la TSPO. Ces environnements constituent une base pour les études structurales et fonctionnelles en présence de différents ligands.

4. Etudes structurales de la mTSPO

Plusieurs approches ont été développées soit au laboratoire, soit en collaboration pour les études structurales de la mTSPO (pour une revue des différentes approches, voir par exemple Lacapère et al., 2007). La formation de cristaux tridimensionnels (3D) ou bidimensionnels (2D) nécessite de petites quantités de protéine pour chaque essai de cristallisation. L'analyse de cristaux 3D demande l'insertion d'atomes lourds pour le phasage, ceci peut être obtenu en insérant par exemple une sélénométhionine (Doublié et al., 1997; Lacapère et al., 2007). Par contre pour les études en solution par RMN il faut des quantités plus importantes de protéines marquées avec des isotopes "visibles" ^{15}N et ^{13}C.

4.1. Cristallographie bidimensionnelle (2D)

L'approche de cristallisation bidimensionnelle associée à la microscopie électronique avec la mTSPO a été développée par un des thésards du laboratoire (David TEBOUL). La démarche globale est de placer la protéine dans des bicouches lipidiques où elle s'associe et forme des cristaux dans les "bonnes conditions" (Lacapère et al., 2007). L'avantage de cette approche est que la structure des protéines membranaires est obtenue dans leur environnement natif contrairement aux micelles de détergent qui peuvent affecter la structure (Hite et al., 2007). De nombreux essais en solution ont été réalisés à partir de la mTSPO solubilisée dans différents détergents, réincorporée dans plusieurs types de lipides, mais sans succès (Teboul et al., 2012). Seuls des protéoliposomes de plusieurs centaines de nanomètres non cristallins, riches en TSPO, ont été observés. Un changement de stratégie par une approche de cristallisation sous une monocouche lipidique fonctionnalisée a été tenté. La démarche consiste à injecter sous une monocouche fonctionnalisée (lipide-NTANi) la mTSPO qui va interagir par son étiquette polyhistidine avec ces lipides. Le problème est de contrôler la

quantité de détergent pour ne pas solubiliser la monocouche. Ceci a été obtenu grâce aux acquis des tests en solution où la formation de vésicules peut être contrôlée pour ne garder que des complexes mTSPO-lipides contenant peu de détergents qui ont été injectés avec succès sous la monocouche (Teboul et al., 2012). Des objets protéiques circulaires et creux au centre adsorbés sous la monocouche ont été mis en évidence sur des images de microscopie électronique (Figure III. 26). Leur analyse en particules isolées a donné une forme moyenne dont le diamètre est d'environ 6 nm (Teboul et al., 2012). En 2010, des cristaux hélicoïdaux de la TspO bactérienne de *Rhodobacter Sphaeroïdes* ont été obtenus (Korkhov et al., 2010), montrant que dans les études de cristallisation le choix de l'espèce protéique pouvait être crucial ! L'observation de ces tubes par cryo-microscopie électronique et leur analyse a permis d'obtenir la première structure 3D de la TSPO. Bien que les données fussent de basse résolution (10 A°), la reconstitution 3D a révélé que cette TspO est composée de cinq domaines transmembranaires associés en dimère (Figure III. 26 (e)). Chacun des monomères peut être inclus dans un cercle de 2,5 nm, une dimension bien inférieure à nos objets, suggérant un état de polymérisation de trois ou quatre pour la mTSPO (Teboul et al., 2012; Lacapere et al., 2014).

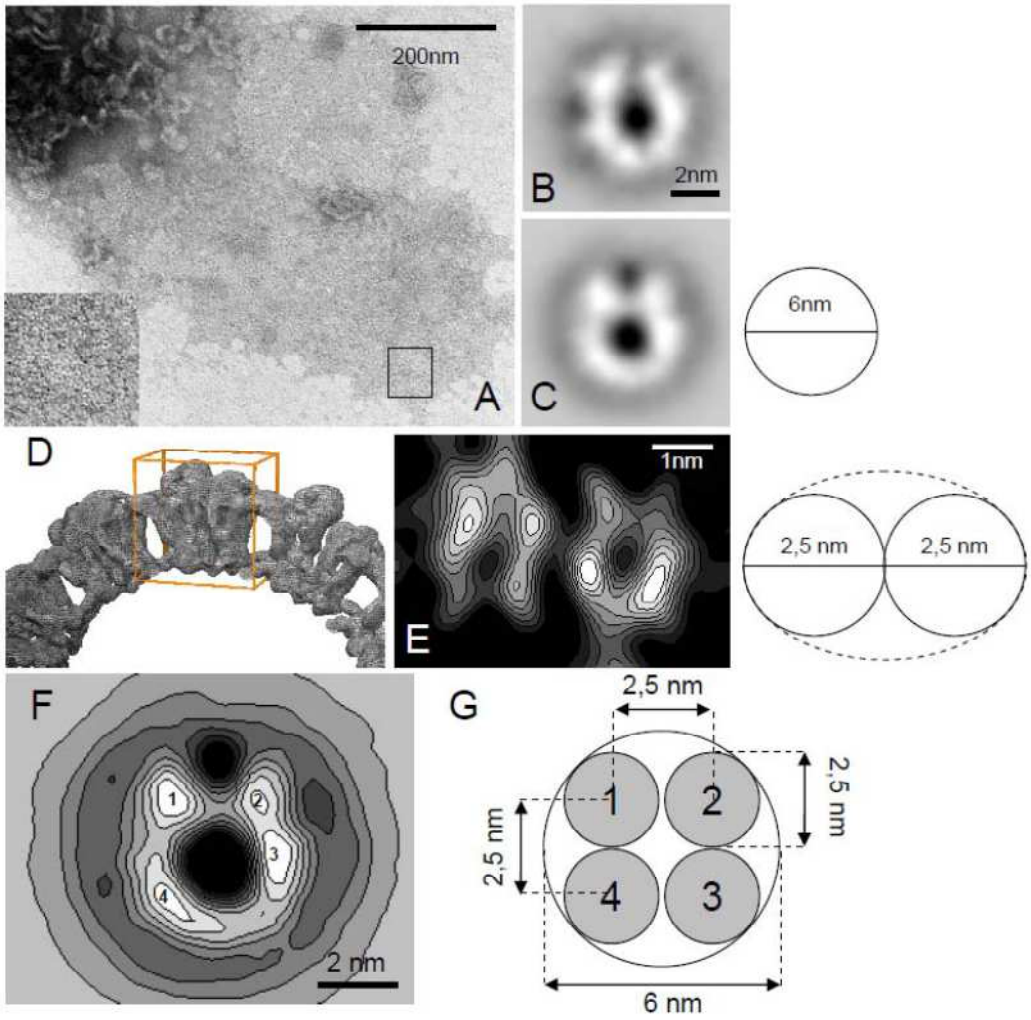


Figure III. 26 : Images de la mTSPO. (a) Photographie prise par microscopie électronique de la mTSPO partiellement reconstituée en DMPC/DMPE et injectée sous une monocouche de lipides fonctionnalisés (DOGS-NTA-Ni/DOPC). L'insert en bas à gauche est un agrandissement de la zone indiquée par une boîte dans la photo. (b,c) Moyennes de 2 sous-classes de particules obtenues après analyse et correspondant respectivement à 114 et 403 particules. Chacune de ces moyennes peut être incluse dans un cercle de rayon de 6 nm comme schématisé sur la droite (d) Section de la carte de densité électronique de la forme bactérienne de la TSPO (Korkhov et al., 2010) utilisée pour obtenir la projection d'un dimère inclus dans la boite orange (e) Projection d'un dimère dans le plan de la membrane. Chacun de ces monomères peut être inclus dans un cercle de rayon de 2,5nm comme schématisé sur la droite (f) Décomposition en niveau de contour de la particule présentée en (c) montrant les 4 pics de densité visible en blanc et numérotés de 1 à 4 (g) Schéma montrant l'assemblage possible des 4 monomères de mTSPO de chacun 2,5nm dans la particule de 6 nm de rayon (Teboul et al., 2012).

On peut supposer que cette différence de polymérisation entre les deux espèces peut être reliée à leurs fonctions différentes. La TspO bactérienne est impliquée dans le transport et la régulation des intermédiaires tetrapyrroliques dans la voie de biosynthèse de la bactériochlophylle pour fonctionner à l'état de dimère (Yelissev et Kaplan S., 2000). La TSPO de mammifère est impliquée dans le transport du cholestérol dans la biosynthèse des stéroïdes

et les sels biliaires (Lacapere et Papadopoulos, 2003) quant à elle pourrait fonctionner sous forme de dimère ou tetramère (Delavoie et al., 2003). Toutefois, la structure de la mTSPO déterminé par RMN et publiée récemment (Jaremko et al., 2014) montre que la TSPO murine est monomérique dans des micelles de détergent ! Il faut noter que cette structure a été obtenue en présence de ligand, le *(R)*-PK11195, pouvant suggérer une unité fonctionnelle monomérique. On peut se demander si cette structure dans des micelles de détergent est celle de la protéine dans des conditions natives fonctionnelle où elle transporte du cholestérol. Le site de liaison du cholestérol qui comprend un motif CRAC (**Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus –L/V-(X)1–5-Y-(X)1–5-R/K-** (Li H et al. 1998)) est situé dans la partie C-terminal et fait face au détergent dans la structure RMN et on ne peut exclure que la fonction de transport implique plusieurs monomères.

La liaison du PK 11195 sur un monomère pourrait servir à activer le transport par un monomère interagissant avec des lipides mais aussi un polymère. Il est donc intéressant de caractériser la structure de la mTSPO dans des bicouches lipidiques pour comprendre le mécanisme de transport.

4.2. Cristallographie tridimensionnelle (3D)

L'approche de cristallisation tridimensionnelle associée à la diffraction de rayons X avec la mTSPO a été développée en collaboration avec le professeur Eva PEBAY-PEYROULA à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. La démarche globale est de placer la protéine concentrée dans un milieu contenant des agents précipitants comme des sels ou du PEG favorisant l'association de complexes protéine-detergent qui s'organisent en cristal. Nous avons été confronté à de nombreuses difficultés pour obtenir des cristaux, c'est à dire pour passer d'un état désordonné liquide à un état ordonné cristallin, en particulier la stabilité de la protéine est un critère important (Privé et al., 2007; Cross et al., 2011). Les premiers tests de cristallisation (400 conditions, kit Qiagen) ont été effectués avec la mTSPO en SDS, puis rapidement avec la mTSPO en DPC. L'observation de petits cristaux de nature protéique (Lacapere et al., 2014) nous a rapidement conduit à envisager l'étape suivante d'analyse de clichés de diffraction qui nécessite la présence d'atomes lourds dans le cristal pour le phasage. La substitution des atomes de soufre des méthionines et des cystéines par des atomes de sélénium permet d'utiliser le signal anormal pour obtenir des informations sur la phase (Doublié et al., 1997). Nous avons donc développé le marquage sélectif des méthionines de la mTSPO, en ajoutant de la sélénométhionine (SeMet) dans le milieu de culture des bactéries (Guerrero et al., 2001).

4.3. Etudes en solution

La RMN constitue une approche non cristallographique qui permet de déterminer la structure atomique de peptides et de protéines en solution. Les études de RMN des grosses protéines nécessitent un enrichissement isotopique pour l'acquisition des spectres nécessaires à la détermination de la structure 3D (Montaville et Jamin 2010). En effet, certains noyaux ne sont pas observables par RMN en absence spin nucléaire *(I=0)* comme pour carbones ^{12}C ou en raison de propriétés de relaxationdéfavorables comme pour azotes ^{14}N.

La détermination de la structure d'une protéine membranaire de la taille de la TSPO par RMN est encore un challenge plus important puisqu'il faut que la protéine reste stable (plusieurs jours pour l'acquisition des différents spectres à 3 dimensions ^{15}N, ^{13}C, ^{1}H) dans son environnement et concentrée (pour avoir suffisamment de signal). Plusieurs difficultés ont été rencontrées dont les plus importantes ont été : (i) la production de la mTSPO pure triplement marquée (^{15}N, ^{13}C, ^{2}H) en grande quantité (mM), (ii) la stabilisation dans le temps d'une seule conformation de la protéine.

4.4. Surexpression de la mTSPO marquée

Pour les deux approches de cristallisation 3D et de RMN, il a été nécessaire de produire une mTSPO marquée. Ces différents types de marquage (SeMet et enrichissement en ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H) sont obtenus en cultivant les bactéries *E. coli* dans un milieu minimum (M9) supplémenté soit avec la SeMet et des sources nutritionnelles (ammonium et glucose), soit avec des sources nutritionnelles isotopiques (ammonium [^{15}N] NH_4Cl, glucose [^{13}C] et [^{2}H]).

Le passage du milieu classique LB, un milieu riche, à un milieu minimum M9 a comme conséquence une baisse de production de la protéine recombinante. En effet ce type de milieu nécessite l'adaptation de l'hôte bactérien, et entraîne par conséquence une diminution de la croissance bactérienne. Dans le but d'optimiser l'expression de la protéine marquée et d'obtenir la plus grande quantité de protéine en fonction du volume de culture, plusieurs expériences ont dû être faites, en modifiant les paramètres et le protocole.

La méthode de culture

Réaliser la culture bactérienne directement dans le milieu M9 a comme conséquence une faible croissance bactérienne (la DO ne dépasse pas la valeur de 2) (Figure III. 27). Pour optimiser la culture nous nous sommes inspiré d'une méthode (Marley et al., 2001) à laquelle nous avons apporté quelques modifications. Le principe de cette méthode consiste à réaliser d'abord une culture bactérienne dans un milieu riche non marqué (LB) permettant d'avoir une

croissance rapide et une masse bactérienne importante. Puis nous avons fait un échange du milieu de culture avec le même volume, mais de composition différente (milieu minimum M9 contenant les éléments marqués). On observe dans la Figure III. 28 représentant le suivi de la croissance par mesure d'absorbance que la DO finale atteint une valeur d'environ 4-5. Cette méthode de culture nous permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec la culture dans le milieu riche LB.

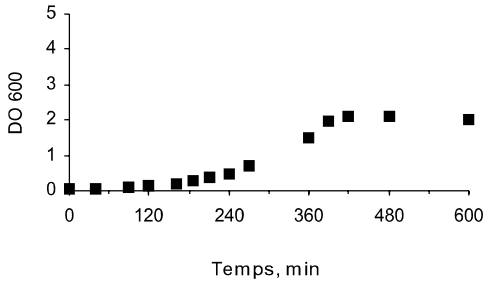


Figure III. 27 : Courbe de croissance bactérienne lors de la culture en milieu minimum M9.

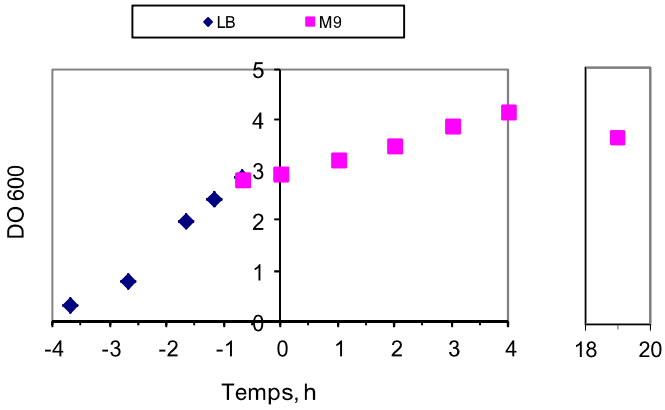


Figure III. 28 : Courbe de croissance bactérienne en milieu LB (losanges bleus) puis en milieu minimum (carrés roses) selon la méthode de Marley et al., 2001.

Lors de la production de la protéine non marquée en LB, le rendement final après purification est d'environ 40 mg de mTSPO pour un litre de culture (Robert et al., 2010). Ce rendement diminue lors de la culture en milieu M9 pour atteindre 10 mg de mTSPO marquée par litre de culture. La stratégie entreprise pour obtenir une même quantité de protéine marquée avant purification a été l'augmentation du volume de culture bactérienne (4 L) pour avoir plus de bactéries et ainsi produire plus de protéines marquées.

Le temps d'induction

Pour optimiser le niveau d'expression nous avons suivi la production de mTSPO en fonction du temps d'induction. 1 mL de culture bactérienne a été prélevé toutes les heures

après l'induction, centrifugé pendant 10 min à 4000 g, puis les culots bactériens ont été repris dans un tampon contenant du SDS pour lyser les bactéries et enfin 30 µl de ces culots ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 12% (Figure III. 29). L'analyse du gel montre que la bande d'une masse apparente de 20 kDa correspondant à la TSPO apparaît clairement à partir de 3 heures d'induction et que son intensité est importante lorsque l'induction a été prolongée sur une nuit et atteint presque 24 heures (Figure III. 29).

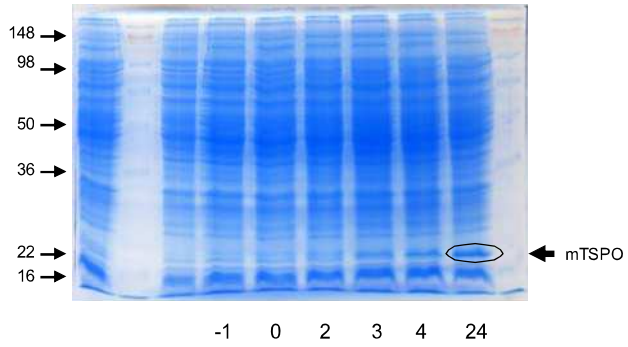


Figure III. 29 : SDS-PAGE acrylamide 12 % coloré au bleu de coomassie représentant le contenu en mTSPO (flèche à droite) des bactéries au cours de la croissance avant (-1) et après induction (0 à 24h). PM, correspond aux standards de poids moléculaires.

La quantité de glucose et de sulfate d'ammonium

La concentration des sources nutritionnelle en carbone (glucose) et azote (ammonium) est importante pour une bonne croissance et une bonne expression de protéine recombinante. Les protocoles de la littérature suggèrent jusqu'à 20 g de glucose et 1 g à 2 g d'ammonium par litre de culture (concentration finale des 2 composés de l'ordre de 10 mM). Ces concentrations ont été utilisées pour la production de mTSPO marquée à la SeMet. Cependant, le coût élevé du glucose marqué ^{13}C et encore plus du glucose doublement marqué ^{13}C et ^{2}H nous a conduit réduire sa concentration (4 g/L), comme décrit dans la littérature (Marley et al., 2001). On peut noter que nous avons réalisé des essais de cultures avec des quantités croissantes de glucose (2 et 20 g/L), la croissance bactérienne ainsi que les culots bactériens récupérés sont assez similaires, mais la quantité de mTSPO produite et obtenue après purification est au moins 2 fois plus importante pour une culture avec 20 g/L de glucose.

4.5. Purification de la mTSPO marquée

Après récupération des culots de bactéries, l'extraction de la TSPO marquée des corps d'inclusion et sa purification sur colonne de résine NTA Nickel ont été réalisées de la même façon que la protéine non marquée. Le gel d'électrophorèse des différentes fractions de cette purification (Figure III. 30(a)) montre bien une bande de 20 kDa correspondant à la mTSPO,

mais révèle aussi la présence d'une autre bande relativement abondante aux alentours de 30 kDa (Parsy et al., 2007). Une première analyse de cette protéine par excision de la bande du gel et séquençage N-terminal nous a révélé qu'il s'agissait de la triose phosphate isomérase (TIM-like beta barrel) de la bactérie *E. coli*. Pour éliminer cette protéine l'ensemble des fractions collectées lors de la première purification ont été regroupées, diluées pour réduire la concentration d'imidazole et redéposées sur une nouvelle colonne de résine Ni-NTA. Le gel d'électrophorèse des différentes fractions collectées lors de cette deuxième purification (Figure III. 30(b)) montre la disparition du contaminant bactérien. Un des avantages de cette procédure avec 2 colonnes que lors de la seconde purification il est possible de faire l'échange du SDS par un autre détergent. En particulier, l'ensemble de ces mises au point nous a permis d'avoir la mTSPO marquée ([^{15}N], [^{13}C] et [^{2}H]) en quantité et pureté suffisantes pour les études RMN en présence de détergent deutéré (^{2}H-DPC).

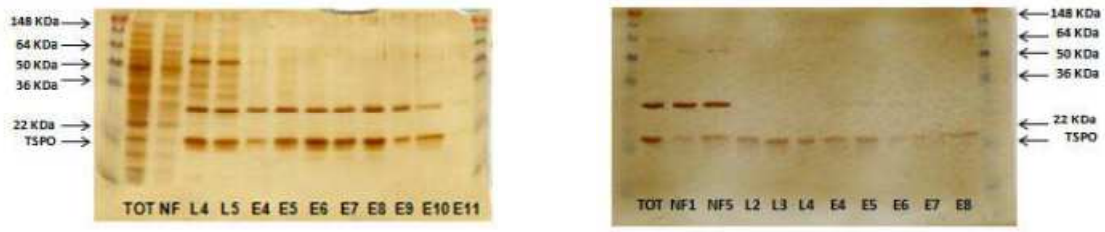


Figure III. 30 : **Gels d'électrophorèse SDS-PAGE acrylamide 12% colorés à l'argent représentant les différentes étapes de purification de la mTSPO marquée**. Le 1er et le dernier correspondent aux standards de poids moléculaire. Le puits "TOT" (TOTal) correspond à la solution avant dépôt sur la colonne, les puits "NF" (Non Fixé) à la solution en sortie de colonne, les puits suivants correspondent aux lavages (L2 à L5) et les derniers puits aux élutions (E4 à E11). (a) Gel après la 1ère purification, on peut voir la présence d'une bande correspondant à une protéine contaminante de 29 kDa sur l'image. (b) Gel après la 2ème purification, la bande de la protéine contaminante disparait. L'affinité de la protéine contaminante pour la colonne est plus faible que celle de la TSPO, permettant leur séparation lors de la 2ème purification. Lors de la première purification, la protéine contaminante plus abondante que la TSPO se fixe en quantité comparable à la TSPO.

Caractérisation du/des contaminant(s) bactérien(s)

Afin de mieux caractériser et de comprendre l'origine de la contamination protéique de nos purifications, nous avons réalisé une culture de bactéries contenant le plasmide pET15-mTSPO dans du milieu LB sans induction de la production de la mTSPO par l'IPTG. Après récupération des culots de bactéries, la solubilisation des corps d'inclusion a été effectuée par l'addition de 1% SDS et la purification des protéines sur colonne de résine NTA Nickel a été réalisée sans présence de détergent. La Figure III. 31 montre le gel d'électrophorèse des différentes fractions de cette purification. On observe non seulement une bande vers 30 kDa mais aussi d'autres bandes moins intenses (Bartlow et al., 2011). Une analyse par

spectrométrie de masse MALDITOF des fractions E7 à E9 regroupées révèle la présence de 2 protéines, la triosephosphate isomérase et la FKBP-type PPIase (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) correspondant aux bandes de poids moléculaire de 27 et 21 kDa, respectivement. Une analyse par ORBITRAP des peptides obtenus après digestion trypsique a complété cette première analyse en mettant en évidence d'autres protéines de *E. coli* (comme par exemple la catalase). Cette caractérisation confirme des travaux déjà publies (Bolanos-Garciua et al., 2006; Parsy et al., 2007; Bartlow et al., 2011) montrant que de nombreuses protéines bactériennes "natives" de *E. coli* se fixent sur la résine de colonnes NTA-Ni. L'abondance de ces protéines, dont la majorité sont des protéines de réponse au stress (Bolanos-Garciua et al., 2006), entre en compétition avec les protéines surexprimées. Ceci est d'autant plus vrai lorsque les protéines recombinantes ne sont pas exprimées en grande quantité (Bolanos-Garciua et al., 2006) comme on le voit clairement pour les purifications de la mTSPO obtenue par culture en milieu LB ou en milieu minimum.

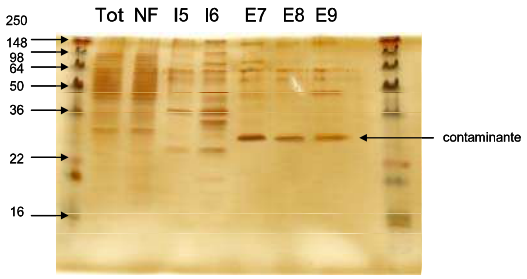


Figure III. 31 : Gels d'électrophorèse acrylamide 12% colorés à l'argent representant les etapes de purification de la proteine contaminante. Le 1er et le dernier correspondent aux standards de poids moléculaire. Le puits "TOT" (TOTal) correspond à la solution avant dépôt sur la colonne, les puits "NF" (Non Fixé) à la solution en sortie de colonne, les puits suivants correspondent aux élutions (E7 à E9). La flèche indique la bande correspondant à la protéine contaminante majoritaire de 29 kDa.

4.6. Caractérisation du taux de marquage des différentes mTSPO marquées

La spectrométrie de masse est une technique de choix pour mesurer le taux de marquage car le remplacement de méthionine par la sélénométhionine, des isotopes l'azote 14 par l'azote 15, du carbone 12 par le carbone 13 et de certains hydrogènes par des deutériums induit une augmentation de la masse de la protéine.

L'analyse des taux de marquage obtenus est représentée dans le tableau III. 06. Le taux de marquage est de 100% pour la sélénométhionine et varie entre 80 et 94 % pour les marquages isotopiques (ce qui est conforme avec les données de la littérature utilisant ces protocoles).

	SeMet	^{15}N	^{15}N, ^{13}C	^{15}N, ^{13}C, ^{2}H
Taux de marquage (%)	100	94	90	80

Tableau III. 06 : Taux de marquage obtenus par la spectrométrie de masse.

4.7. RMN

Les études structurales par RMN en solution de la mTSPO ont été initialement développées en collaboration avec le groupe dirigé par Jean-Michel NEUMANN au CEA Saclay. Les premiers spectres RMN (2D HSQC ^{15}N-^{1}H) obtenus pour la mTSPO/DPC ont montré un mauvais étalement dans la région des tryptophanes. Ces signaux ont été spectaculairement améliorés en ajoutant le ligand PK 11195 (Murail et al., 2008). Cependant les premiers essais d'acquisition de spectres RMN 3D (^{13}C, ^{15}N et ^{1}H) nécessaire à la détermination de la structure par RMN, ont mis en évidence certaines contraintes expérimentales : (i) le besoin d'une protéine concentrée (de l'ordre du mM) pour réduire les temps d'acquisition, (ii) la nécessité de stabiliser une conformation unique de la mTSPO/DPC liée à son ligand le plus affin le PK 11195 et (ii) enfin d'acquérir des spectres à des températures relativement élevées (aux alentours de 40°C) afin d'obtenir des pics fins bien résolus.

L'optimisation de la production et de la purification (voir ci dessus) nous a permis d'obtenir en routine 0.5 mM de mTSPO/DPC triplement marquée. Des essais de concentration par évaporation-centrifugation (speed-vac) nous ont permis d'atteindre des concentrations de l'ordre de 2,5 mM. Nous avons observé que lorsque la concentration en protéine approche le mM, la concentration de DPC était critique pour maintenir la mTSPO stable jusqu'à 40°C. Une valeur du rapport DPC/mTSPO de 6 (poids/poids) semble minimale pour maintenir la TSPO soluble et stable pendant plusieurs semaines à 40°C.

Les paramètres des concentrations en mTSPO et DPC ayant été stabilisés nous avons recherché les conditions de saturation des sites de liaison de la mTSPO/DPC par le PK 11195, c'est-à-dire en augmentant le rapport PK 11195 sur TSPO pour déplacer l'équilibre entre les conformations mTSPO libres et mTSPO saturées. Nous avons rapidement observé, lors de titrage, la formation d'un précipité qui se forme d'autant plus rapidement que la température

est élevée. L'analyse et la caractérisation de ce phénomène de précipitation a été complexe, est-ce le PK 11195 qui précipite ou la mTSPO ou le complexe mTSPO-PK 11195 ?
La séparation rapide de ce précipité par centrifugation montre que toute la protéine reste en solution et que le PK 11195 diminue. Par contre si on laisse la solution évoluer seule dans le temps, ce précipité semble entraîner la protéine. Nous avons donc étudié la solubilité du PK 11195.

Solubilité du PK 11195

La solubilité du PK 11195 dans un tampon phosphate pH 6 (tampon utilisé pour les études RMN) a été caractérisée par l'enregistrement des spectres d'absorbance entre 275 nm et 360 nm (Figure III. 32(a)). Le spectre du PK 11195 présente un maximum à 327 nm dont l'intensité augmente linéairement avec la concentration de la solution jusqu'à 300 µM. Au delà de cette valeur, on observe une forte augmentation de l'absorbance à 350 nm et une perte de la linéarité à 327 nm (Figure III. 32(b)). Cette observation suggère que le PK11195 agrège au-delà de 300 µM dans un tampon phosphate.

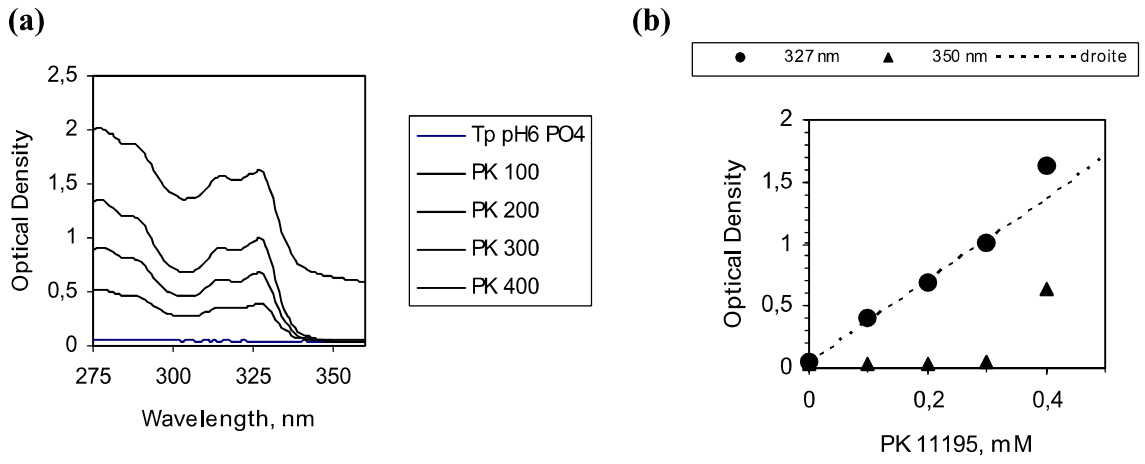


Figure III. 32 : Solubilité du PK 11195 (a) Superposition des spectres d'absorption de solution de concentration croissante de PK 11195 dans un tampon phosphate. **(b)** Evolution de l'absorbance à 327 nm (cercles) et à 350nm des différentes solutions de PK 11195 présentées en (a). La mesure à 327 nm correspond au maximum d'absorption du PK 11195, alors que celle à 350 nm correspond à un minimum sauf si le PK 11195 agrège.

Solubilité du PK11195 en présence de DPC

Le PK11195 est une molécule hydrophobe peu soluble dans un milieu aqueux et l'addition d'un détergent comme la DPC modifie sa solubilité en l'intégrant dans les micelles de détergent. Les mesures d'absorbances à 327 nm et 350 nm de spectres de PK 11195 dans

des solutions de composition variable de DPC nous ont permis de caractériser les variations de la solubilité de PK 11195 en fonction de la concentration de DPC (Figure III. 33(a)). La mesure des seuils de perte de solubilité (augmentation de l'absorbance à 350 nm) en fonction de la concentration de DPC est représentée dans la (Figure III. 33(b)). La pente de la droite obtenue permet d'estimer qu'il faut environ 5 moles de DPC pour solubiliser une mole de PK 11195 dans des gammes de concentration faibles.

Cependant ces mesures ne permettaient pas de mettre en évidence pourquoi nous avons observé une précipitation du PK 11195 dans nos expériences de RMN à fortes concentrations. Nous avons bien observé qu'il existait une concentration saturante de PK 11195 pour une concentration donnée de DPC qui pouvait être extrapolée aux conditions RMN mais comment se fait la précipitation ? En ajoutant des concentrations croissantes de PK 11195 à une solution contenant 100 mg/mL (285 mM) de DPC, nous avons observé une bonne solubilisation du PK 11195 jusqu'à 20 mM, mais en dépassant cette limite nous avons observé une précipitation avec une chute de la concentration soluble de PK 11195 vers 14-15mM (Figure III. 34(a)). Nous en avons conclu que les micelles de DPC se saturent en PK 11195, puis il apparaît une précipitation accompagnée d'un phénomène de désaturation. Celui-ci est d'autant plus prononcé que la température est élevée.

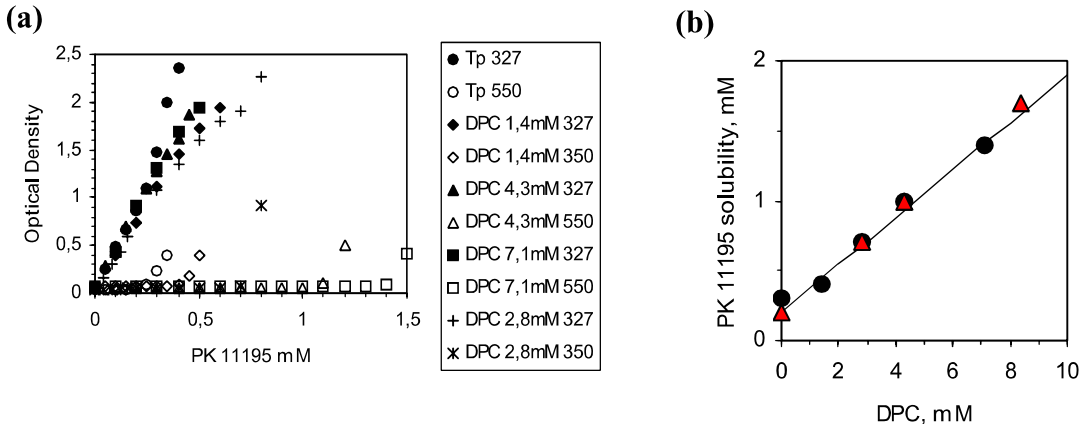


Figure III. 33 : Solubilité du PK 11195 en présence de DPC (a) Evolution de l'absorbance à 327 nm et à 350 nm de différentes solution de PK 1195 dans un tampon phosphate contenant des concentrations croissantes de DPC. **(b)** Evolution du seuil de solubilité du PK 11195 en fonction de la concentration en DPC obtenu par mesure des seuils de précipitation observés par l'augmentation de la DO à 350 nm.

Détermination du rapport mTSPO /DPC/PK11195

Lors de la préparation de nos échantillons nous préparons des films de PK 11195 (par évaporation d'une solution alcoolique dans des tubes eppendorf) dans lesquels nous mettons à agiter la protéine marquée. Nous avons clairement observé que la saturation de la mTSPO par son ligand nécessitait de franchir un premier seuil de saturation puis de le dépasser pour déplacer l'équilibre entre les conformations mTSPO libres et mTSPO saturées (Figure III. 34(b)).

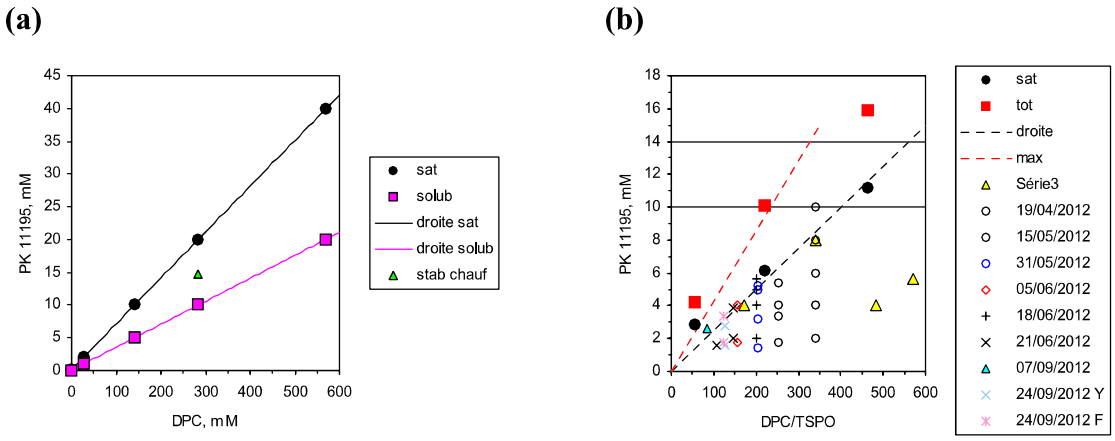


Figure III. 34 : (a) Solubilité du PK 11195 en présence de DPC Evolution des seuils de solubilité et de saturation du PK 11195 en fonction de la concentration en DPC ('absorbance à 350 nm de différentes solution de PK 1195 dans un tampon phosphate contenant différentes concentrations de DPC). **(b) Titrage de différentes préparations de TSPO par le PK 11195** chaque préparation est caractérisée par un rapport DPC/TSPO mesuré, dans lequel est ajouté progressivement des concentrations croissante de PK 11195 mesuré par l'augmentation de la DO à 327 nm. La saturation correspond au seuil à partir duquel les spectres RMN commencent à s'étaler et le total correspond au seuil à partir duquel l'ensemble TSPO DPC PK 11195 précipite.

Les expériences présentées ci-dessus ont montré que le partitionnement du PK 11195 entre la DPC libre et la mTSPO solubilisée en DPC était sous le contrôle de la précipitation du PK 11195 (Figure III. 35). Les expériences de RMN en vue de la saturation de la mTSPO par le PK 11195 en présence de DPC n'ont jamais pu être optimisées, la recherche de conditions modifiant l'affinité de la mTSPO pour ce ligand, ajout de LMPE, de lipides n'a jamais pu aboutir à un échantillon pour lequel l'ensemble de la population de mTSPO adopte de façon stable une conformation unique. Récemment (Jaremko et al. 2014) il a été montré que l'utilisation d'un énantiomère du PK 11195, sa forme *(R)* et non le racémique avait permis de résoudre ce problème et d'obtenir la structure de la mTSPO en DPC avec son ligand PK 11195 lié. Il avait été décrit précédemment que les 2 énantiomères n'avaient pas la même affinité (Dubroeucq et al., 1986), le *(R)* ayant une affinité de 4-6 nM alors que le *(S)* aurait

une affinité 1000 fois plus grande (3µM). Cependant le mélange racémique donne une affinité apparente tout à fait bonne puisqu'elle est de l'ordre de 10 nM suggérant que la forme *(R)* se fixe très fortement alors que la forme *(S)* ne fait que participer à la précipitation !

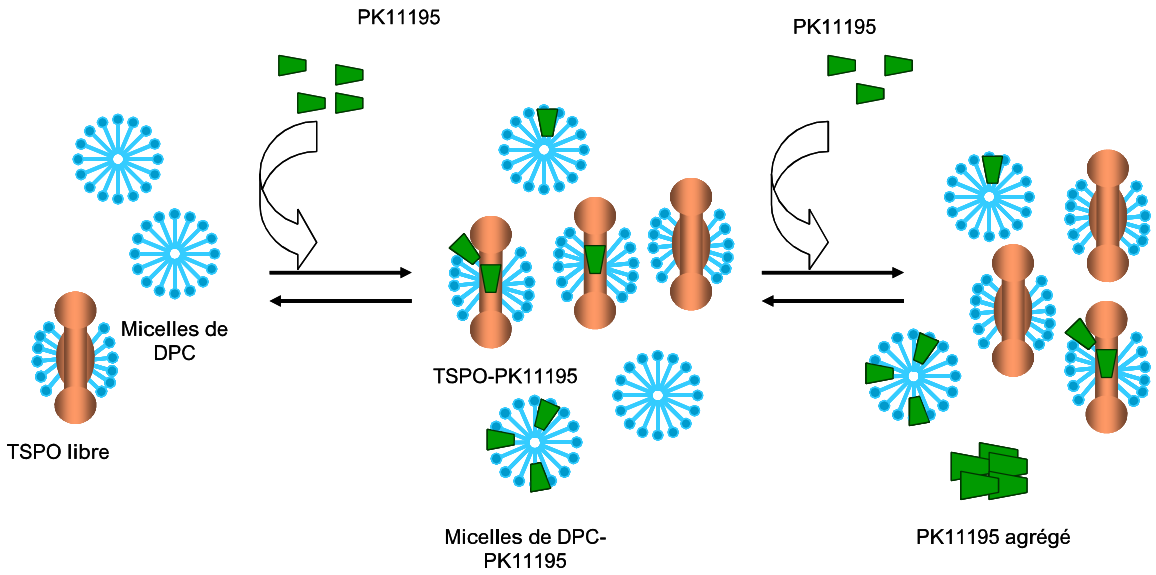


Figure III. 35 : Schéma illustrant le titrage de la TSPO en micelle de DPC par son ligand le plus spécifique, le PK 11195. La TSPO purifiée est entourée de molécules de DPC et coexiste avec des micelles de détergent libre. L'addition de PK 11195, composé peu soluble, au milieu conduit à une partition de celui-ci sur le site de liaison de la TSPO mais aussi dans les micelles de détergent. Lorsque la concentration de PK 11195 est augmentée pour obtenir une saturation de la TSPO, les micelles de détergent se saturent également. Cet équilibre entre saturation de la TSPO et des micelles est instable car une sursaturation des micelles de détergent conduit à "l'exclusion" du PK 11195 des micelles et à sa précipitation sous forme d'aggrégats.

5. Relations structure fonction de la mTSPO

5.1. Site de liaison du PK 11195

L'approche de la mutagenèse dirigée a été choisie pour déterminer les acides aminés impliqués dans la liaison du PK 11195 (ligand activateur). Les mutations choisies ont été obtenues par génération des plasmides de mTSPO correspondants (voir matériel et méthodes). Les protéines mutées ont été exprimées chez la bactérie *E. coli*, puis purifiées sur colonne d'affinité et reconstituées dans des protéoliposomes comme précédemment décrit pour la mTSPO sauvage. Les mesures de liaison du PK 11195 (affinités et stoechiométries) pour les différents mutants ont été réalisées par incubation avec du PK 11195 radioactif et filtration (voir ci dessus).

Plusieurs données de la littérature suggéraient que le site du PK11195 impliquerait des boucles extramembranaires coté cytosol de la TSPO et son domaine C-terminal (Farges et al., 1993, 1994 ; Li et al., 1998). Le tableau III. 07 présente les mutations ponctuelles et suppression qui affectent fortement la liaison du PK 11195. On peut noter l'effet spectaculaire de la mutation V26T qui induit une perte totale de liaison qui a été confirmé récemment dans la structure résolue par RMN (Jaremko et al., 2014). L'interprétation de l'effet des délétions de domaines entiers était un peu plus difficile avant l'obtention de la structure qui montre l'implication de nombreux résidus des différentes TM, car on ne pouvait pas distinguer l'implication de résidus spécifiques. De plus les mesures réalisées sur ces protéines "délétées" ne donnent pas d'informations sur les affinités et les stoechiométries.

	Kd PK 11195 (nM)	% liaison	Référence
V26T	>	-	Farges et al., 1994
del 5-20	-	~ 70	Li & Papadopoulos 1998
del 41-51	-	~ 55	Li & Papadopoulos 1998
del 120-133	-	~ 55	Li & Papadopoulos 1998
del 141-152	-	~ 75	Li & Papadopoulos 1998
del 151-169	-	~ 75	Li & Papadopoulos 1998

Tableau III. 07 : Le pourcentage de liaison des différents mutants de la TSPO.

Partant de ces données, nous avons émis l'hypothèse que la liaison du PK11195, une molécule hydrophobe polycyclique, pouvait impliquer des résidus aromatiques via des interactions de Van der Waals ou des interactions π. Notre choix s'est porté tout d'abord sur des résidus tryptophanes (W), tyrosines (Y) et phénylalanines (F) présents et conservés dans les boucles cytosoliques de la mTSPO : W33, Y34, W42, F99 et F100 (Figure III. 36).

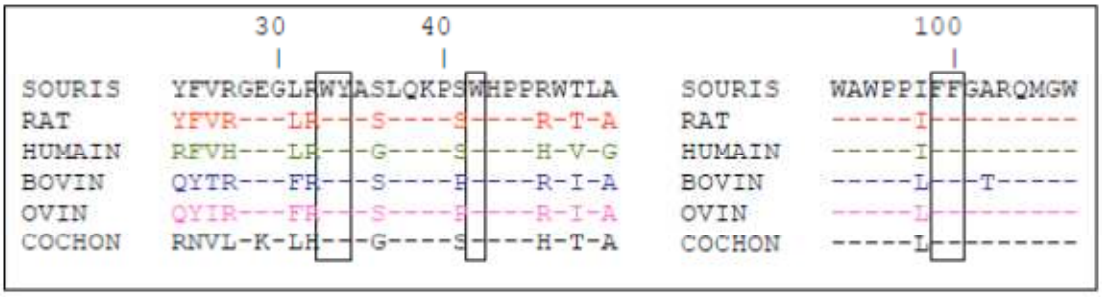


Figure III. 36 : Alignements de séquence des deux boucles cytoplasmiques de la TSPO. Les premiers et derniers résidus correspondent à ceux situés aux extrémités des hélices transmembranaires. Les résidus encadrés correspondent aux résidus cibles présentant des chaînes latérales aromatiques pouvant intervenir dans le site de liaison du PK 11195.

Dans des études de mutagenèse il faut non seulement choisir le résidu à muter mais aussi choisir quel type de mutation à réaliser. Afin d'annuler toutes les interactions des chaînes latérales, on peut muter les résidus en Alanine (A), qui ne présente qu'un groupement CH_3 et ne perturbe pas a priori les structures secondaires. Pour la Tyrosine (Y) qui possède un cycle aromatique et une fonction alcool, on peut concerver la fonction alcool en la mutant en Sérine (S) ou la fonction aromatique en la mutant en Phénylalanine (F) pour tenter de distinguer la contribution de chaque groupement.

Les mutants Y34F et Y34S étaient disponibles au laboratoire (don du Pr V Papadopoulos). Les mesures de liaison nous ont permis de calculer les valeurs des constantes de dissociation (Kd) et de stoechiométrie (Bmax) pour ces deux mutants (Figure III. 37(b)). Les Kd sont respectivement de 40±10 et 20±3 nM pour Y34S et Y34F et Bmax respectivement de 25±5 et 27±3 nmol/mg pour Y34S et Y34F. Les valeurs des constantes de dissociation sont plus élevées que pour la protéine sauvage (Figure III. 37(a)) mais la suppression du noyau aromatique phényl par la mutation en Sérine (S) induit une perte d'affinité plus importante que la mutation en Phénylalanine (F), qui conserve la présence d'un cycle aromatique.

Malgré différents essais, nous n'avons pas réussi à effectuer les mutations W33 et W42. Toutefois, la région contenant le W42 nous paraissait importante, nous avons aussi utilisé un plasmide disponible au laboratoire dans lequel les résidus 41 à 50 étaient supprimés (don du Pr V Papadopoulos). Les mesures de liaison de PK 11195 (Figure III. 37(c)) nous ont permis de mesurer un Kd de 20±8 nM et un Bmax de 25±8 nmol/mg. Ici aussi le Kd observé est supérieur à celui de la protéine sauvage, induisant une perte de liaison de près de 50% pour des concentrations de 5 ou 10 nM de PK 11195, en accord avec les données publiées précédemment (tableau III. 07, Li et al., 1998).

Des travaux antérieurs (Li et al., 1998 ; Anzini et al., 2001) ont suggéré l'implication du domaine C-terminal de la TSPO dans la liaison du PK 11195. Les travaux de modélisation (Anzini et al., 2001) proposent un rôle pour le résidu W161, mais celui-ci n'est présent que dans l'espèce humaine. Nous avons voulu savoir si le segment C-terminal était vraiment impliqué et choisi d'utiliser une construction disponible au laboratoire où tout le segment C-terminal de la TSPO de souris est supprimé du résidu 153 au résidu 169. La mesure de liaison de PK 11195 nous a permis de calculer un Kd de 25±15 nM et un Bmax de 30±10 nmol/mg (Figure III. 37(c)). Cette fois encore, le Kd est supérieur à celui de la protéine sauvage. Cette

perte d'affinité induit une perte de liaison (environ 50%) légèrement supérieure à celle observée dans les données publiées précédemment (Tableau III. 08, Li et al., 1998).
Pour des raisons non expliquées, et malgré différents essais, nous n'avons réussi à effectuer que la mutation de F100A parmi les 2 résidus qui se trouvent au niveau de la deuxième boucle. Les résultats de la mesure de liaison de PK 11195 indiquent un Kd de 20±5 nM et un Bmax de 25±7 nmol/mg (Figure III. 37(d)). Ici aussi, le Kd observé est supérieur à celui de la protéine sauvage.

Afin de tester notre hypothèse de l'implication simultanée de résidus des deux boucles (TM1-TM2 et TM3-TM4) nous avons réalisé un double mutant Y34F et F100A. Le choix du Y34F plutôt que Y34S a été guidé par la volonté de garder une mesure de liaison permettant, si c'est le cas, d'exclure une perte de structure de la mTSPO par les mutations. Les résultats de la mesure de liaison de PK 11195 indiquent un Kd de 150±25 nM et un Bmax de 25±7 nmol/mg (Figure III. 37(d)). La forte augmentation du Kd par rapport à la protéine sauvage et aux mutants simples (Y34 et F100) suggère une contribution des deux boucles dans la formation du site de liaison du PK 11195.

Mutation	Kd (nM)	Bmax (nmol/mg)
WT	6±3	30±3
Y34S	40±7	25±5
Y34F	20±3	27±3
Délétion 41-50	20±8	25±8
Délétion C-terminale (153-169)	20±5	30±10
F100A	20±5	25±7
Y34F F100A	150±20	25±10

Tableau III. 08 : Les résultats de mesures de liaison du [^{3}H] PK 11195 sur la mTSPO sauvage et des differents mutants.

Les résultats de mutagenèse dirigée obtenus dans ce travail (Tableau III. 08) montrent que l'ensemble des mutations ou délétions effectuées dans les boucles externes et le domaine C-terminal conduit à des pertes d'affinité de liaison du PK 11195, mais ne modifie pas la stoechiométrie de cette liaison. Ces données indiquent que le site de liaison du PK 11195 sur la protéine implique la participation conjointe de résidus localisés dans les différents domaines extramembranaires de la protéine (boucles et domaine C-terminal). Ces résidus ne sont pas directement impliqués dans la fixation du PK 11195 comme la V26 localisée dans la

cavité hydrophobe révélée récemment par la structure déterminée par RMN (Jaremko et al., 2014), mais sont impliqués dans le mouvement de plusieurs domaines de la TSPO nécessaire à la formation de ce site.

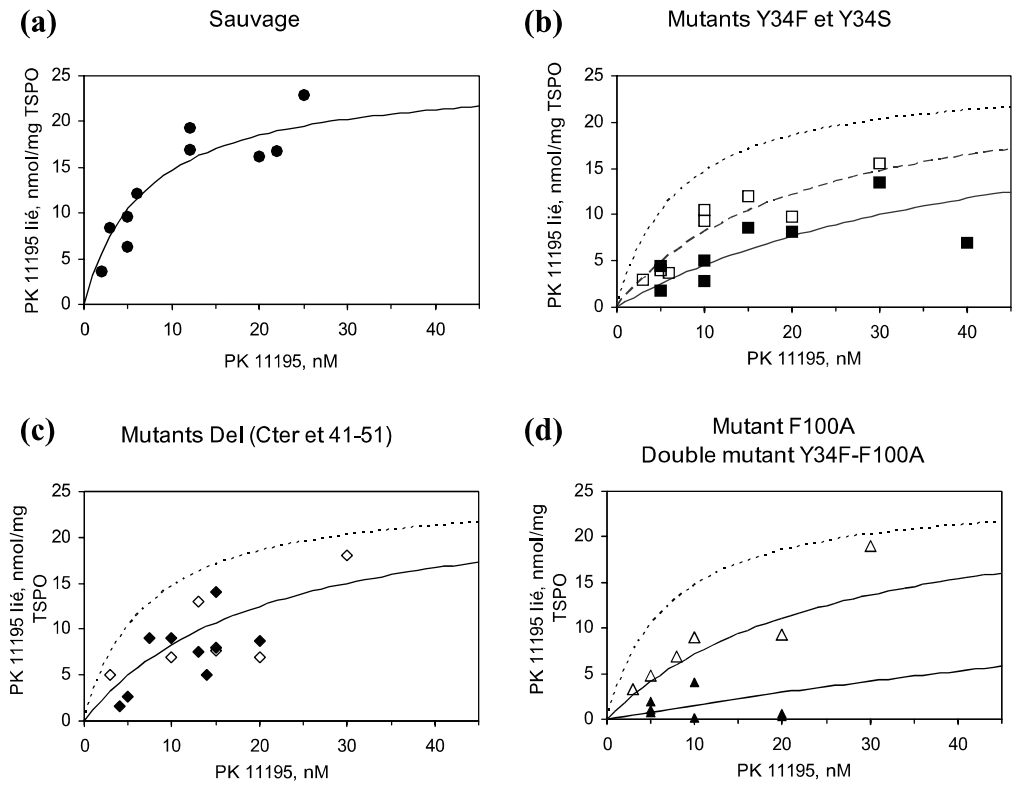


Figure III. 37 : Liaison du PK 11195 sur (a) TSPO sauvage, (b) (carrés vides) mutant Y34F (carrés pleins) mutant Y34S, (c) (losanges vides) déletion du domaine C-terminal, (losanges pleins) délétion du segment 41-51, (d) (triangles vides) mutant F100A, (triangles pleins) double mutant Y34F-F100A.

5.2. Apport du marquage sélectif

Le marquage isotopique combiné à la spectroscopie RMN en solution est une méthode de choix pour avoir des informations structurales et dynamiques à l'échelle atomique. Classiquement le marquage isotopique est utilisé pour faciliter l'attribution des pics hétéro-nucléaires, mesurer les couplages et ainsi permettre la détermination de la structure. Mais il peut aussi être utilisé pour suivre les modifications structurales induites par exemple par la liaison de ligands.

Le marquage sélectif des acides aminés permet une attribution simplifiée dans les spectres RMN, mais aussi de caractériser les acides aminés sensibles à la fixation de ligand

comme le PK 11195 en apportant des informations sur les relations structure-fonction complémentaires à celles obtenues par mutagenèse dirigée.

Bien que ce type de marquage soit assez délicat à réaliser (voir Matériels et Méthodes) nous avons obtenu un marquage sélectif des méthionines et des lysines. Le marquage sélectif des méthionines (^{15}N) permet d'obtenir un spectre 2D HSQC ne contenant que 5 pics correspondant aux 5 méthionines que contient la mTSPO (Figure III. 38 (a)). La présence de PK 11195 ne modifie pas ces pics suggérant un changement d'environnement faible. Les récentes données structurales de la mTSPO (Jaremko et al. 2014) confirment que les méthionines sont relativement éloignées du site de liaison du PK 11195. Par contre la présence de PK 11195 affecte fortement les 2 pics du spectre HSQC (Figure III. 38 (b)) correspondant aux 2 lysines que contient la mTSPO. La première (K39) localisée dans la boucle reliant les TM1 et TM2 est en interaction avec le PK 11195 dans la structure atomique. La suppression de la région 41-50 montre également une perte de liaison de ligand suggérant la contribution de ce domaine. Par contre la seconde (K69) est localisée dans la partie C-terminale de la TM2, à l'opposé du site de liaison du PK 11195. Le déplacement de pic observé suggère un mouvement de la TM2 lors de la liaison du PK 111195, en accord avec les changements de spectre de CD observés (voir plus haut).

En conclusion, les résultats obtenus par mutagenèse dirigée combinés aux données RMN de protéine marquée sélectivement ont permis de distinguer des résidus contribuant à la fixation du PK 11195 de ceux non affectés par la cette liaison. Ces données vont être discutée en parallèle avec les résidus impliqués directement dans la liaison du PK 11195 mis en évidence par la structure atomique (Jaremko et al, 2014), dans la partie conclusions et perspective du manuscrit.

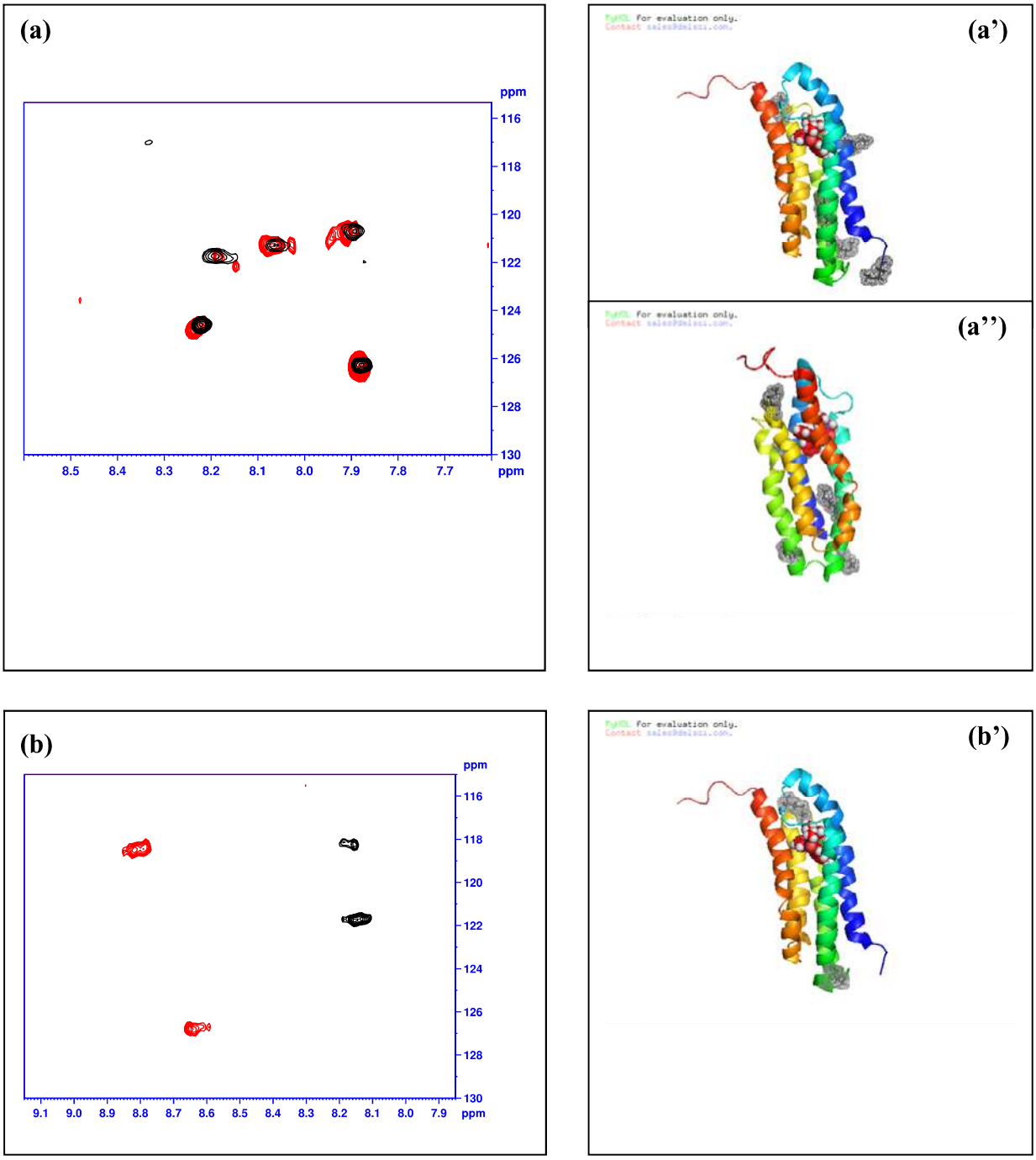


Figure III. 38 : Les spectres HSQC ^{1}H-^{15}N de la TSPO marquée spécifiquement ^{15}N d'un acide aminé (a) méthionine, (b) lysine. Les spectres HSQC ont été obtenus en absence (noir) et en présence (rouge) du PK 11195. Loacalisation dans la structure tridimensionnelle de la mTSPO avec son ligand, le PK 11195 (Jaremko et al., 2014) des cinq méthionines selon 2 vues différentes (a' et a'') et des deux lysines (b').

Conclusions et Perspectives

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude des relations structure/fonction des protéines permet la compréhension de leur fonctionnement et de leur rôle dans les processus biologiques. Une approche consiste à obtenir plusieurs structures de la protéine dans différents états conformationnels en les "piégeant" avec des ligands par exemple. Cette méthode requiert des quantités importantes de protéines pures et stabilisées par différents ligands. Ces études sont encore plus difficiles pour les protéines membranaires car elles sont souvent peu exprimées naturellement, nécessitant leur surexpression. Leur nature amphiphile (hydrophobe-hydrophile) leur confère une instabilité en dehors d'un environnement de bicouche lipidique et nécessite l'utilisation de détergent pour leur étude. Ce travail de thèse consistait à produire, purifier la TSPO de souris (mTSPO), une protéine membranaire, pour déterminer sa structure afin d'élucider par la suite son mécanisme de fonctionnement.

La mTSPO a été surexprimée dans *E. coli*, extraite des corps d'inclusions par le SDS et purifiée en présence de détergent à l'aide de son étiquette polyhistidine par chromatographie d'affinité (NTA-Ni). Ce protocole nous a permis d'obtenir la mTSPO recombinante en quantité et pureté suffisante pour développer des études structurales. Les études biochimiques et biophysiques ont montré que la mTSPO purifiée en SDS n'était que partiellement repliée et inactive au sens de la liaison de ligand. Un changement de l'environnement par substitution du SDS par un autre détergent, la DPC, ou par des lipides a permis d'obtenir une protéine correctement repliée et fonctionnelle puisqu'elle lie son ligand de haute affinité, le PK 11195. Les essais de cristallisation n'ont pas permis d'obtenir des cristaux analysables pour déterminer une structure atomique (Lacapere et al., 2014). Il semble que la difficulté majeure vient de l'instabilité de la mTSPO en absence de ligand, en particulier en détergent. Les études par microscopie électronique ont toutefois permis d'observer, en membrane, des particules (Teboul et al. 2012) suggérant des assemblages en polymère en accord avec des données biochimiques (Delavoie et al., 2003). Les travaux de RMN liquide ont été les plus prometteurs quant à la détermination de la structure. La mTSPO triplement marquée (^{2}H, ^{15}N, ^{13}C) a été produite, purifiée et concentrée (~1 mM) pour les études RMN de triple résonance. Des études antérieures avaient montré que la présence du PK 11195 stabilisait une conformation de la mTSPO faiblement concentrée (0,2 mM), révélée par une modification spectaculaire du spectre RMN 2D HSQC $^{15}N/^{1}H$ (Murail et al. 2008). Toutefois, la stabilisation, à forte concentration de mTSPO, d'une conformation unique n'a pas

pu être obtenue quelles que soient les conditions testées. La forte concentration de PK 11195 nécessaire pour obtenir une stoechiométrie d'une molecule de ligand lié par protéine (>1 mM) conduit à la formation d'un précipité. La caractérisation de celui-ci a montré que c'était essentiellement du ligand et qu'il pouvait entraîner à terme la précipitation de la protéine.

Cependant, en mars 2014, un autre groupe a pu obtenir par RMN liquide la structure de la mTSPO en DPC en utilisant l'enantiomère *(R)* du PK 11195 qui a une meilleure affinité que l'énantiomère *(S)* et le racémique (Jaremko et al. 2014). La figure IV. 01(a) montre que l'arrangement des hélices n'est pas séquentiel et que le site de liaison de PK11195 se trouve dans une poche hydrophobe située dans la partie supérieure des 5 hélices transmembranaires (Figure IV. 01(c)).

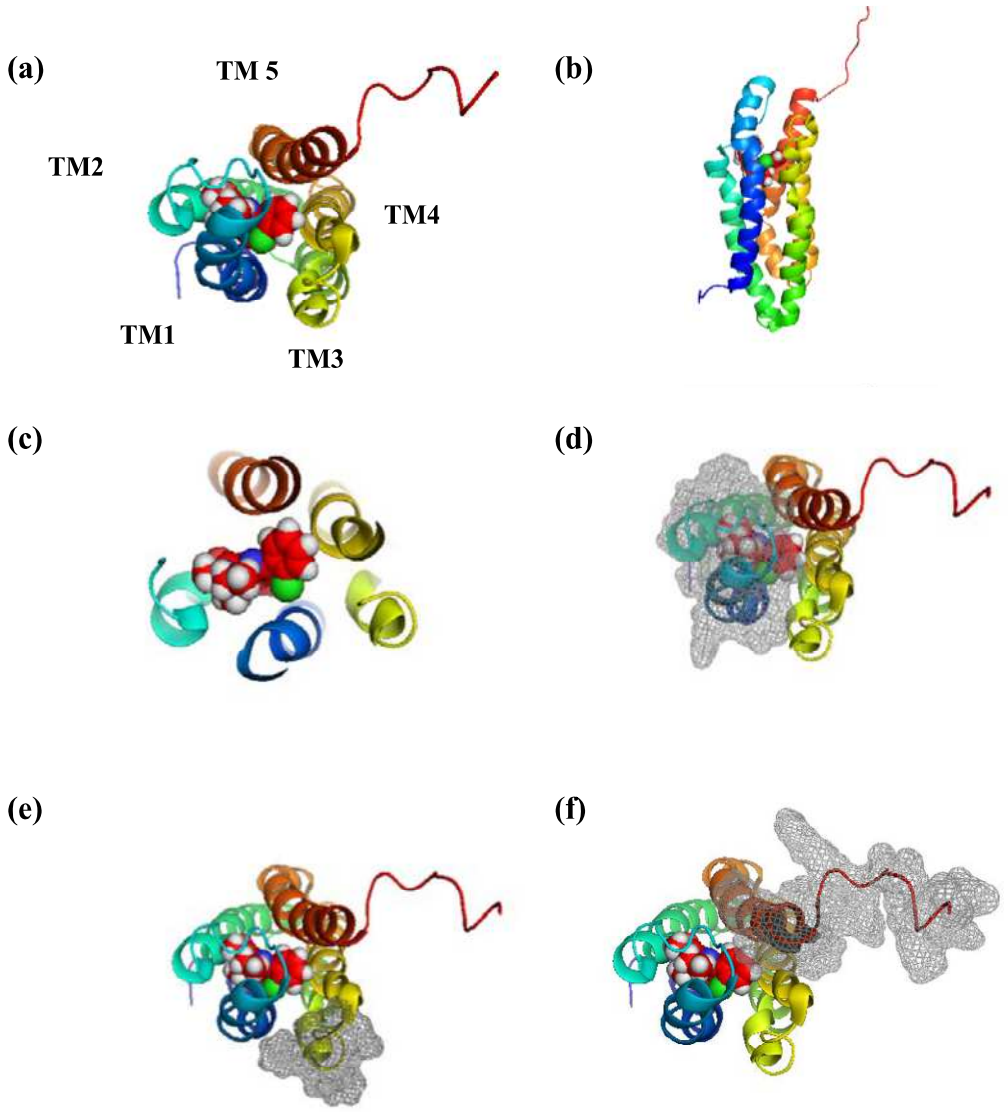


Figure IV. 01 : Structure tridimensionnelle de la mTSPO avec son ligand le plus spécifique, le PK11195, résolue par RMN (Jaremko et al., 2014). Structure visualisée par le logiciel PyMol **(a)** vue de dessus, **(b)** vue de coté. **(c)** Mise en évidence de la poche de liaison du PK 11195. Mise en évidence par la densité électronique de la **(d)** boucle entre TM1-TM2, **(e)** boucle entre TM3-TM4, **(f)** domaine C-terminal.

Le PK 11195 interagit avec plusieurs acides aminés des différentes TM et l'accès à cette poche hydrophobe semble fermé par un ensemble de résidus appartenant aux boucles extra membranaires (TM1-TM2 et TM3-TM4) et au segment C-terminal. L'importance de la participation de la boucle reliant la TM1 et la TM2 (Figure IV. 01 (d) dans la liaison du PK 11195 avait été déjà suggérée par des études de mutagenèse dirigée (ponctuelle ou délétion) (Farges et al., 1993, 1994; Li & Papadopoulos, 1998). Les résultats que nous avons obtenus lors des études par mutagenèse dirigée suggèrent la contribution d'une Tyrosine (Y34) localisée dans cette boucle et dont la mutation en Sérine induit une forte diminution de l'affinité du PK 11195. Toutefois, ce résidu n'interagit pas directement avec le PK 11195 dans la structure et on peut proposer plusieurs hypothèses pour expliquer la modification d'affinité observée. Soit Y34 participe à une stabilisation de la boucle elle même, soit Y34 intervient dans l'accessibilité du PK 11195 lors de son passage du cytosol à la poche hydrophobe. La participation de plusieurs résidus situés dans la deuxième partie de la boucle et le début de la TM2 (S41-A50) observée dans la structure est en accord avec nos résultats de mutagenèse (del 41-51) confirmant de précédents travaux (Li & Papadopoulos, 1998). Il est à noter que cette délétion de 10 acides aminés, qui induit une modification significative de l'affinité, n'a pas un effet aussi spectaculaire que l'on aurait pu attendre, vu le nombre d'acides aminés supprimés. On peut émettre l'hypothèse que la suppression (del 41-51) ne réduit que partiellement les 61 contacts du PK 11195 avec la TSPO (Jaremko et al., 2014). En particulier, cette région implique plus d'une dizaine d'acides aminés conservés (Jaremko et al., 2014) et la réduction du nombre de contacts par la suppression de quelques résidus peut permettre de garder une relative bonne liaison. Ce qui peut expliquer les faibles dimunitions d'affinité pour nos mutants.

La contribution de la boucle reliant la TM3 à la TM4 (Figure IV. 01 (e)) dans la formation du site de liaison du PK 11195 n'est pas évidente puisque les résidus sont plutôt excentrés par rapport à l'axe d'entrée du site. Les résultats que nous avons obtenus lors des études par mutagenèse dirigée suggèrent une contribution d'une des Phénylalanines (F100) dont la structure révèle qu'elle est face au solvant. Toutefois, nos résultats de mutagenèse montrent un effet drastique de la double mutation (Y34-F100) suggérant une contribution des deux boucles (TM1-TM2 et TM3-TM4) dans la formation du site de liaison du PK 11195. De la même manière, le segment C-terminal en extension de la TM5 fait clairement face au solvant, mais la partie C-terminale de la TM5 semble interagir avec les deux boucles (TM1-TM2 et TM3-TM4) pouvant expliquer les effets de la suppression du segment C-terminal (153-169) dans la modification de l'affinité pour le PK 11195. De façon plus globale, la

structure de la mTSPO avec le PK 11195 lié est en accord avec nos hypothèses (et nos résultats) de mutagenèse où les différents domaines extramembranaires participaient à la liaison du PK 11195 et à la stabilisation du complexe TSPO/DPC-PK11195.
Il est à noter que des résultats antérieurs de bioinformatique (Anzini et al., 2001) avaient proposé, sur la base de résultats de mutagenèse, la construction d'un modèle d'interaction impliquant la contribution de trois domaines de la TSPO pour la liaison du PK 11195: (i) TM1-TM2 avec les résidus R24, E29, L31, K39, P40, S41 et W42, (ii) TM4 avec W107, et (iii) C-ter avec W161.

La résolution de la première structure de la TSPO complexée à son ligand de haute affinité, le PK 11195, est un premier pas pour la compréhension du fonctionnement de cette protéine. Toutefois, elle ne permet pas encore de décrire une de ces fonctions la mieux caractérisée, à savoir le transport du cholestérol. Le cholestérol est une molécule polycyclique qui comprend une chaîne aliphatique, un ensemble de 4 cycles et un groupe hydroxyle (Figure IV. 02 (a)). Le cholestérol se lie sur la TSPO au niveau d'un domaine appelé CRAC, une séquence d'acides aminés mise en évidence pour la première fois chez la TSPO (Li & Papdopoulos, 1998) et caractérisée ensuite chez d'autres protéines (Fantini & Barrantes 2013). Ce domaine qui comprend plusieurs résidus caractéristiques (L/V-X_{1-5}-Y-X_{1-5}-K/R), permet la formation d'une cavité où peut venir se positionner le cholestérol (Figure IV. 02 (b)) avec des interactions spécifiques de la chaîne aliphatique avec les résidus hydrophobes (A145, M149), des cycles du stérane avec Y152 et de l'hydroxyle avec R156 (Jamin et al. 2005).



Figure IV. 02 : Structure du cholestérol (A). Modèle d'interaction du cholestérol avec le domaine CRAC de la mTSPO (adapté de Jamin et al., 2005)

La structure atomique de la mTSPO/DPC- PK11195 révèle que le site CRAC est orienté vers l'extérieur des TM faisant face à la membrane. Cette orientation n'est pas celle imaginée initialement dans les modèles construits par modélisation moléculaire (Bernassau et al., 1993; Culty et al., 1999) où le cholestérol avait été positionné au coeur des 5 TM. Toutefois, elle permet de mieux interpréter les données fonctionnelles montrant que le

cholestérol contenu dans le feuillet externe des membranes mitochondriales pouvait être transporté par la TSPO vers la matrice des mitochondries (Krueger & Papadopoulos 1990). L'ensemble de ces données suggère la fixation du cholestérol entre la TSPO et les lipides. La question qui demeure est comment se fait le transport. Une première hypothèse serait que le cholestérol "glisserait" le long de la TM5, ou à l'interface entre 2TM et les lipides, le mouvement pouvant être généré par la liaison du ligand induisant un changement de conformation de la TSPO. Une autre hypothèse serait que l'unité fonctionnelle de la TSPO soit un polymère qui pourrait faire intervenir d'autres protéines mitochondriales (Rone et al., 2012; Issop et al., 2013), mais aussi des polymères de TSPO dont le degré d'ordre n'est pas clairement défini (Delavoie et al., 2003). L'étude de la TSPO de *Rhodobacter sphaeroïdes* par cryomicroscopie électronique a permis de visualiser un dimère dans une membrane (Korkov 2010). Nos travaux sur la mTSPO, également par microscopie électronique, suggèrent un assemblage de trois ou quatre monomères (Teboul et al., 2012; Lacapere et al., 2014). La question qui se pose alors est comment se fait le transport par le polymère de TSPO. Il y a plusieurs hypothèses : (i) chaque monomère de TSPO transporte un cholestérol ou (ii) chaque complexe transporte un seul cholestérol. La première hypothèse serait plus en accord avec nos mesures de liaison de cholestérol radioactif suggérant une molécule de cholestérol fixée par monomère (Lacapère et al., 2001; Ostuni et al., 2010). Se repose alors la question du mécanisme, on peut envisager une dimérisation du cholestérol entre 2 monomères de TSPO. En effet, la dimérisation du cholestérol est un phénomène qui a été observé dans des modèles de membranes synthétiques mais il n'est pas encore élucidé au niveau des membranes plasmiques (Fantini & Barrantes, 2013). Le cholestérol peut former deux types distincts de dimères stabilisées par des interactions de Van der Waals. Deux molécules de cholestérol peuvent se mettre en longueur (queue-à-queue transmembranaire) (Harris et al, 1995; Rukmini et al, 2001) ou peuvent former un dimère face-à-face en laissant les faces opposées interagir avec les protéines (Figure IV. 03). Il a été décrit que dans ce deuxième cas, le dimère du cholestérol peut moduler l'oligomérisation fonctionnelle des protéines (Hanson et al., 2008). Si c'est le cas pour la TSPO, le mécanisme de transport reste encore à élucider.

Pour cela il faudrait pouvoir élucider la structure de la TSPO dans son milieu naturel en présence de lipides pour comparer avec celle obtenue récemment en micelle de détergent (Jaremko et al., 2014). La cristallisation reste envisageable, mais aussi les études de RMN en solution avec des bicelles (Morrison et al., 2012) ou de RMN du solide avec des protéoliposomes comme cela a été fait récemment avec un RCPG (Park et al., 2012). Cette dernière approche a été commencée au laboratoire (Thèse de Lucile Sénicourt), les premiers

résultats sont encourageants (Lacapere et al., 2014). Les spectres RMN du solide de protéoliposomes de mTSPO en présence et en absence du PK 11195 montrent des différences nettes suggérant des changements de conformation. Les interactions de la TSPO avec d'autres molécules telles que la PPIX ou le cholestérol, des molécules biologiques transportées par la TSPO, sont envisageables. En particulier, nos résultats montrent que la mTSPO lie la PPIX avec une bonne affinité ouvrant la voie à des études structurales avec ce ligand. De même les interactions de la TSPO avec d'autres protéines membranaires comme par exemple le VDAC peuvent être envisagées. En effet, la structure du VDAC a été résolue par RMN et cristallisation, en présence de détergent et de lipides (Hiller et al., 2010). Le VDAC produit comme protéine recombinante (Hiller et al., 2010) forme aussi des assemblages polymériques (Hiller et al., 2010) ouvrant ainsi la voix aux études de complexes (supercomplexes ?) pouvant être impliqués dans la fonction de la TSPO.

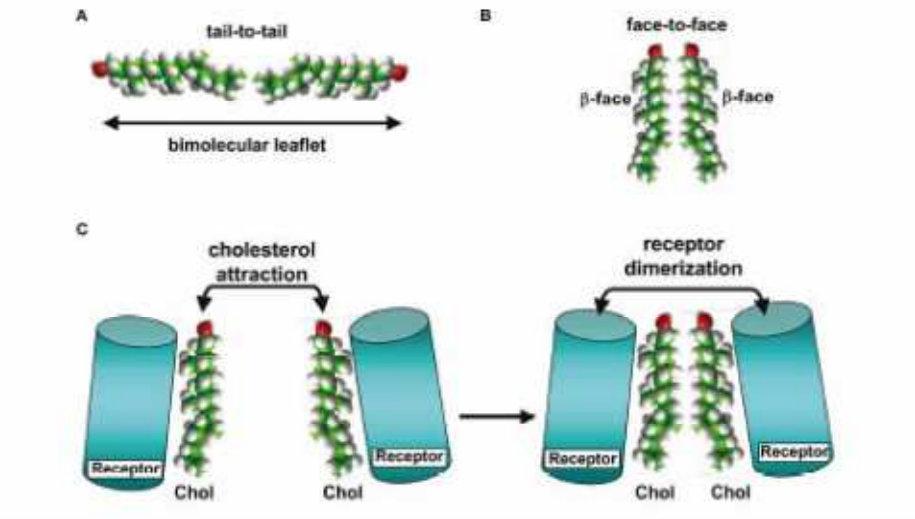


Figure IV. 03 : **Interactions cholestérol - cholestérol**. Dans des membranes modèles, deux molécules de cholestérol peuvent former des complexes queue à queue (A) ou face à face (B). Dans ce dernier cas, les propriétés de reconnaissance entre 2 molécules de cholestérol peuvent induire la dimérisation de récepteurs membranaires (C). Figure issus de Fantini & Barrantes, 2013.

Bibliographie

V. BIBLIOGRAPHIE

A

Addona GH, Sandermann H Jr, Kloczewiak MA, Husain SS, Miller KW. Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor. Biochim Biophys Acta. 1998 Mar 13;1370(2):299-309.

Albani JR. Effect of binding of Calcofluor White on the carbohydrate residues of alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid) on the structure and dynamics of the protein moiety. A fluorescence study. Carbohydr Res. 2001 Aug 23;334(2):141-51.

Andersen KV, Ludvigsen S, Mandrup S, Knudsen J, Poulsen FM. The secondary structure in solution of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver using 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry. 1991 Nov5;30(44):10654-63.

Anholt R.R., De Souza E.B., Kuhar M.J, Snyder S.H. (1985) Depletion of peripheral-type benzodiazepine receptors after hypophysectomy in rat adrenal gland and testis. *Eur. J. Pharmacol.* 110: 41-46

Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. J Biol Chem. 1986 Jan 15;261(2):576-83.

Antkiewicz-Michaluk L, Guidotti A, Krueger KE. Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. Mol Pharmacol. 1988 Sep;34(3):272-8.

Anzini M, Cappelli A, Vomero S, Giorgi G, Langer T, Bruni G, Romeo MR, Basile AS. Molecular basis of peripheral vs central benzodiazepine receptor selectivity in a new class of peripheral benzodiazepine receptor ligands related to alpidem. J Med Chem. 1996 Oct 11;39(21):4275-84.

Anzini M., Cappelli A., Vomero S., Seeber M., Menziani MC., Langer T., Hagen B., Manzoni C, Bourguignon JJ (2001) Mapping and fitting the peripheral benzodiazepine receptor binding site by carboxamide derivatives. Comparison of different approaches to quantitative ligand-receptor interaction modeling. J Med Chem 44: 1134-1150

B

Banerjee RK, Datta AG. Proteoliposome as the model for the study of membrane-bound enzymes and transport proteins. Mol Cell Biochem. 1983;50(1):3-15.

Bartlow P, Uechi GT, Cardamone JJ Jr, Sultana T, Fruchtl M, Beitle RR, Ataai MM. Identification of native Escherichia coli BL21 (DE3) proteins that bind to immobilized metal affinity chromatography under high imidazole conditions and use of 2D-DIGE to evaluate contamination pools with respect to recombinant protein expression level. Protein Expr Purif. 2011 Aug;78(2):216-24.

Basile AS, Lueddens HW, Skolnick P. Regulation of renal peripheral benzodiazepine receptors by anion transport inhibitors. Life Sci 1988;42: 715-726.

Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, Dubroeucq MC, Gueremy C, Le Fur G. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. J Neurochem 1983;41: 1744-1750.

Berkovich A, McPhie P, Campagnone M, Guidotti A, Hensley P. A natural processing product of rat diazepam binding inhibitor, triakontatetraneuropeptide (diazepam binding inhibitor 17-50) contains an alpha-helix, which allows discrimination between benzodiazepine binding site subtypes. Mol Pharmacol. 1990 Feb;37(2):164-72.

Bernassau JM, Reversat JL, Ferrara P, Caput D, LeFur G (1993) A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport J Mol Graph 11, 236-244

Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? Front Physiol. 2013 May 10;4:95.

Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jul;86(13):4897-901.

Bolanos-Garcia VM, Davies OR. Structural analysis and classification of native roteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity hromatography. Biochim Biophys Acta. 2006 Sep;1760(9):1304-13..

Bormann J, Clapham DE. gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Apr;82(7):2168-72.

Braestrup C, Albrechtsen R, Squires R.F. (1977) High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*, 269: 702-704.

C

Canat X, Carayon P, Bouaboula M, Cahard D, Shire D, Roque C, Le Fur G, Casellas P. Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. Life Sci. 1993;52(1):107-18.

Cappelli A, Pericot Mohr Gl, Gallelli A, Giuliani G, Anzini M, Vomero S, Fresta M, Porcu P, Maciocco E, Concas A, Biggio G, Donati A. Structure-activity relationships in carboxamide derivatives based on the targeted delivery of radionuclides and boron atoms by means of peripheral benzodiazepine receptor ligands. J Med Chem. 2003 Aug 14;46(17):3568-71.

Cappelli A, Giuliani G, Valenti S, Anzini M, Vomero S, Giorgi G, Sogliano C, Maciocco E, Biggio G, Concas A. Synthesis and structure-activity relationship studies in peripheral

benzodiazepine receptor ligands related to alpidem. Bioorg Med Chem. 2008 Mar 15;16(6):3428-37.

Carayon P, Portier M, Dussossoy D, Bord A, Petitpretre G, Canat X, Le Fur G, Casellas P. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage. Blood 1996;87: 3170-3178.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(7):2172-5.

Cinone N., Holtje HD., Carotti A (2000) Development of a unique 3D interaction model of endogenous and synthetic peripheral benzodiazepine receptor ligands. J Comput Aided Mol Des 14(8):753-768

Corsi L, Geminiani E, Avallone R, Baraldi M. Nuclear location-dependent role of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in hepatic tumoral cell lines proliferation. Life Sci. 2005 Apr 15;76(22):2523-33.

Culty M., Li H., Boujrad N., Amri H., Vidic B., Bernassau JM., Reversat JL., Papadopoulos V (1999) In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol 69: 123-130.

D

De Souza EB, Anholt RR, Murphy KM, Snyder SH, Kuhar MJ. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. Endocrinology 1985;116: 567-573

Delavoie F, Li H, Hardwick M, Robert JC, Giatzakis C, Peranzi G, Yao ZX, Maccario J, Lacapere JJ, Papadopoulos V. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. Biochemistry 2003;42: 4506-4519.

Diezel W, Liebe S, Kopperschläger G, Hofmann E. [Association of proteins during polyacrylamide gel electrophoresis]. Acta Biol Med Ger. 1972;28(1):27-37.

Dolder M, Engel A, Zulauf M. The micelle to vesicle transition of lipids and detergents in the presence of a membrane protein: towards a rationale for 2D crystallization. FEBS Lett. 1996 Mar 11;382(1-2):203-8.

Dong M, Baggetto LG, Falson P, Le Maire M, Penin F. Complete removal and exchange of sodium dodecyl sulfate bound to soluble and membrane proteins and restoration of their activities, using ceramic hydroxyapatite chromatography. Anal Biochem. 1997 May 1;247(2):333-41.

Doublié S. Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. Methods Enzymol. 1997;276:523-30.

Dubroeucq MC, Bénavidès J, Doble A, Guilloux F, Allam D, Vaucher N, Bertrand P, Guérémy C, Renault C, Uzan A, et al. Stereoselective inhibition of the binding of [3H]PK 11195 to peripheral-type benzodiazepine binding sites by a quinolinepropanamide derivative. Eur J Pharmacol. 1986 Sep 9;128(3):269-72.

Duparc C, Lefebvre H, Tonon MC, Vaudry H, Kuhn JM. Characterization of endozepines in the human testicular tissue: effect of triakontatetraneuropeptide on testosterone secretion. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Nov;88(11):5521-8.

E

Eftink MR. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. Biochemistry (Mosc). 1998 Mar;63(3):276-84. Review.

Eftink MR. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. Biophys J. 1994 Feb;66(2 Pt 1):482-501.

F

Fantini J, Barrantes FJ. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. Front Physiol. 2013 Feb 28;4:31.

Fan J, Lindemann P, Feuilloley MG, and Papadopoulos V (2012) Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa). Curr Mol Med. 12(4): 369-86.

Farges R, Joseph-Liauzun E, Shire D, Caput D, Le Fur G, Loison G, Ferrara P. Molecular basis for the different binding properties of benzodiazepines to human and bovine peripheral-type benzodiazepine receptors. FEBS Lett. 1993 Dec 13;335(3):305-8.

Farges R., Joseph-Liauzun E., Shire D., Caput D., Le Fur G., Ferrara P. (1994) Site-directed mutagenesis of the peripheral benzodiazepine receptor: identification of amino acids implicated in the binding site of Ro5-4864. *Mol. Pharmacol.* **46**: 1160–1167.

Faure JP, Hauet T, Han Z, Goujon JM, Petit I, Mauco G, Eugene M, Carretier M, Papadopoulos V. Polyethylene glycol reduces early and long-term cold ischemia-reperfusion and renal medulla injury. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Sep;302(3):861-70.

Favreau F, Rossard L, Zhang K, Desurmont T, Manguy E, Belliard A, Fabre S, Liu J, Han Z, Thuillier R, Papadopoulos V, Hauet T. Expression and modulation of translocator protein and its partners by hypoxia reoxygenation or ischemia and reperfusion in porcine renal models. Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jul;297(1):F177-90.

Fernández-San Millán A, Farran I, Molina A, Mingo-Castel AM, Veramendi J. Expression of recombinant proteins lacking methionine as N-terminal amino acid in plastids: human serum albumin as a case study. J Biotechnol. 2007 Jan20;127(4):593-604.

Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, Costa E, Guidotti A. Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Feb;83(3):827-31.

G

Galvagnon, Etude structurale de la protéine de translocation et de ses domaines hélice – boucle – hélice transmembranaires par RMN en solution. These 2011.

Galvagnion C, Montaville P, Coïc YM, Jamin N. Production and initial structural characterization of the TM4TM5 helix-loop-helix domain of the translocator protein. J Pept Sci. 2013 Feb;19(2):102-9.

Gandolfo P, Louiset E, Patte C, Leprince J, Masmoudi O, Malagon M, Gracia-Navarro F, Vaudry H, Tonon MC. The triakontatetraneuropeptide TTN increases [CA2+]i in rat astrocytes through activation of peripheral-type benzodiazepine receptors. Glia. 2001 Aug;35(2):90-100.

Garnier S., Jbilo O., Combes T., Bribes E., Carayon P., Le Fur G., Casellas P. (1993) Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Biol.Chem.* **274**: 2938-2952 .

Garnier M, Boujrad N, Ogwuegbu SO, Hudson JR, Jr., Papadopoulos V. The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. J Biol Chem 1994;269: 22105-22112.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3784-8.

Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, Weizman A. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. Pharmacol Rev 1999;51:629-650.

Gavish M, Weizman R. Role of peripheral-type benzodiazepine receptors in steroidogenesis. Clin Neuropharmacol. 1997 Dec;20(6):473-81. Review.

Georgiou G, Valax P. Isolating inclusion bodies from bacteria. Methods Enzymol. 1999;309:48-58.

Gilquin B., Taillebourg E., Cherradi N., Hubstenberger A., Gay O., Merle N., Assard N., Fauvarque M.O., Tomohiro S., Kuge O., Baudier J. (2010) The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol. Cell. Biol.* **30**(8): 1984-1996.

Ginter C, Kiburu I, Boudker O (2013) Chemical catalysis by the translocator protein (18Kda). Biochemistry 52(21): 3609-3611

Goto NK, Kay LE. New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. Curr Opin Struct Biol. 2000 Oct;10(5):585-92. Review.

Griko Y, Sreerama N, Osumi-Davis P, Woody RW, Woody AY. Thermal and urea-induced unfolding in T7 RNA polymerase: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study. Protein Sci. 2001 Apr;10(4):845-53.

Guerrero SA, Hecht HJ, Hofmann B, Biebl H, Singh M (2001) production of selenomethionine-labelled proteins using simplified culture conditions and generally applicable host/vector systems. Appl Microbiol Biotechnol 56: 718-723

Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, Costa E. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Jun;80(11):3531-5.

H

Hanson MA, Cherezov V, Griffith MT, Roth CB, Jaakola VP, Chien EY, VelasquezJ, Kuhn P, Stevens RC. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 A structure of the human beta2-adrenergic receptor. Structure. 2008 Jun;16(6):897-905.

Hardwick M, Fertikh D, Culty M, Li H, Vidic B, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. Cancer Res. 1999 Feb 15;59(4):831-42.

Harris JS, Epps DE, Davio SR, Kézdy FJ. Evidence for transbilayer, tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoylglycerophosphocholine liposomes. Biochemistry. 1995 Mar 21;34(11):3851-7.

Hiller S, Abramson J, Mannella C, Wagner G, Zeth K. The 3D structures of VDAC represent a native conformation. Trends Biochem Sci. 2010 Sep;35(9):514-21. doi: 10.1016/j.tibs.2010.03.005. Epub 2010 Aug 12. Review.

Hirsch JD, Beyer CF, Malkowitz L, Beer B, Blume AJ. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. Mol Pharmacol. 1989 Jan;35(1):157-63.

Hite RK, Raunser S, Walz T. Revival of electron crystallography. Curr Opin Struct Biol. 2007 Aug;17(4):389-95. Epub 2007 Aug 27. Review.

I

Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene. 1990 Nov 30;96(1):23-8.

Issop L, Rone MB, Papadopoulos V. Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. Mol Cell Endocrinol. 2013 May 22;371(1-2):34-46.

J

Jaiswal A, Kumar S, Enjamoori R, Seth S, Dinda AK, Maulik SK. Peripheral benzodiazepine receptor ligand Ro5-4864 inhibits isoprenaline-induced cardiac hypertrophy in rats. Eur J Pharmacol. 2010 Oct 10;644(1-3):146-53.

Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, Murail S, Robert JC, Giatzakis C, Papadopoulos V, Lacapère JJ. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. Mol Endocrinol. 2005 Mar;19(3):588-94.

Jamin N, Lacapère JJ (2007) Circular dichroism as a tool for controlling membrane protein folding or structural modifications. In Pebey-Peyroula, E. (ed) Biophysical analysis of membrane proteins. Investigating structure and function, pp 243-258, Wiley-VCH Press.

Jansson M, Li YC, Jendeberg L, Anderson S, Montelione GT, Nilsson B. High-level production of uniformly ^{15}N- and ^{13}C-enriched fusion proteins in Escherichia coli. J Biomol NMR. 1996 Mar;7(2):131-41.

Jap BK, Zulauf M, Scheybani T, Hefti A, Baumeister W, Aebi U, Engel A. 2D crystallization: from art to science. Ultramicroscopy. 1992 Oct;46(1-4):45-84.

Jaremko L, Jaremko M, Giller K, Becker S, Zweckstetter M. Structure of the mitochondrial translocator protein in complex with a diagnostic ligand. Science. 2014 Mar 21;343(6177):1363-6.

Joseph-Liauzun E, Farges R, Le Fur G, Ferrara P, Loison G. High-level production of a human membrane protein in yeast: the peripheral-type benzodiazepine receptor. Gene. 1995 Apr 3;155(2):195-9.

K

Kim HJ, Howell SC, Van Horn WD, Jeon YH, Sanders CR. Recent Advances in the Application of Solution NMR Spectroscopy to Multi-Span Integral Membrane Proteins. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2009 Nov 1;55(4):335-360.

Klammt C, Löhr F, Schäfer B, Haase W, Dötsch V, Rüterjans H, Glaubitz C, Bernhard F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. Eur J Biochem. 2004 Feb;271(3):568-80.

Klammt C, Schwarz D, Dötsch V, Bernhard F. Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale. Methods Mol Biol. 2007;375:57-78. Review.

Korkhov VM, Sachse C, Short JM, Tate CG. Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. Structure. 2010 Jun 9;18(6):677-87.

Kragh-Hansen U, le Maire M, Møller JV. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. Biophys J. 1998 Dec;75(6):2932-46.

L

Lacapère JJ, Delavoie F, Li H, Péranzi G, Maccario J, Papadopoulos V, Vidic B. Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jun 8;284(2):536-41.

Lacapere JJ, Iatmanen-Harbi S, Senicourt L, Lequin O, Tekely P, Purusottam RN, Hellwig P, Kriegel S, Ravaud S, Juillan-Binard C, Pebay Peyroula E and Papadopoulos V. Structural Studies of TSPO, a Mitochondrial Membrane Protein. In Mus Veteau, I. (ed) Membrane Proteins Production for Structural Analysis. Springer Science+Business Media New York 2014

Lacapère JJ, Gingold MP, Champeil P, Guillain F. Sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of a calcium gradient. Steady state and kinetic fluorescence studies. J Biol Chem. 1981 Mar10;256(5):2302-6.

Lacapère JJ, Pebay-Peyroula E, Neumann JM, Etchebest C. Determining membrane protein structures: still a challenge! Trends Biochem Sci. 2007 Jun;32(6):259-70. Epub 2007 May 3. Review.

Lacapère JJ, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: tructure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. Steroids. 2003 Sep;68(7-8):569-85. Review.

Lacapere JJ (2010) Membrane protein structure determination: methods and protocols. Methods in Molecular Biology, vol 654, Springer Science, Humana Press.

Ladbury JE, Chowdhry BZ. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. Chem Biol. 1996 Oct;3(10):791-801. Review.

Lazaridis T, Mallik B, Chen Y. Implicit solvent simulations of DPC micelle formation. J Phys Chem B. 2005 Aug 11;109(31):15098-106.

Leavitt S, Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. Curr Opin Struct Biol. 2001 Oct;11(5):560-6. Review.

Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, Imbault F, Flamier A, Benavides J, Uzan A, Renault C, Dubroeucq MC, Guérémy C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. Life Sci. 1983 Apr 18;32(16):1839-47.

Le Rumeur E, Fichou Y, Pottier S, Gaboriau F, Rondeau-Mouro C, Vincent M, Gallay J, Bondon A. Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids. Evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. J Biol Chem. 2003 Feb 21;278(8):5993-60017.

Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 3;1666(1-2):62-87. Review.

Lee KM, Androphy EJ, Baleja JD. A novel method for selective isotope labeling of bacterially expressed proteins. J Biomol NMR. 1995 Jan;5(1):93-6.

Le Maire M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim Biophys Acta. 2000 Nov 23;1508(1-2):86-111. Review.

Lesouhaitier O, Feuilloley M, Vaudry H. Effect of the triakontatetraneuropeptide (TTN) on corticosteroid secretion by the frog adrenal gland. J Mol Endocrinol. 1998 Feb;20(1):45-53.

Levy D, Chami M, Rigaud JL. Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy. FEBS Lett. 2001 Aug 31;504(3):187-93. Review.

Li H, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. Endocrinology. 1998 Dec;139(12):4991-7.

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. J Biol Chem. 2003 Mar 7;278(10):8516-25.

Li F, Xia Y, Meiler J, Ferguson-Miller S. Characterization and modeling of the oligomeric state and ligand binding behavior of purified translocator protein 18 kDa from Rhodobacter sphaeroides. Biochemistry. 2013 Aug 27;52(34):5884-99.

Linke D. Detergents: an overview. Methods Enzymol. 2009;463:603-17.

Liu J, Rone MB, Papadopoulos V. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. J Biol Chem. 2006 Dec 15;281(50):38879-93.

Lu P, Jarema M, Mosser K, Daniel WE. lac repressor: 3-fluorotyrosine substitution for nuclear magnetic resonance studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 Oct;73(10):3471-5.

M

Maestro B, Sanz JM. Accumulation of partly folded states in the equilibrium unfolding of the pneumococcal choline-binding module C-LytA. Biochem J. 2005 Apr 15;387(Pt 2):479-88.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Markley JL, Putter I, Jardetzky O. High-resolution nuclear magnetic resonance spectra of selectively deuterated staphylococcal nuclease. Science. 1968 Sep 20;161(3847):1249-51.

Marley J, Lu M, Bracken C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. J Biomol NMR. 2001 May;20(1):71-5.

Marston FA, Hartley DL. Solubilization of protein aggregates. Methods Enzymol. 1990;182:264-76.

Maaser K, Grabowski P, Oezdem Y, Krahn A, Heine B, Stein H, Buhr H, Zeitz M, Scherübl H. Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. Clin Cancer Res. 2005 Mar 1;11(5):1751-6.

McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 15;89(8):3170-4.

Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. Biochim Biophys Acta. 2007 Jun;1771(6):663-76. Epub 2007 Mar 6. Review.

Moffatt BA, Dunn JJ, Studier FW. Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. J Mol Biol. 1984 Feb 25;173(2):265-9.

Montaville P, Jamin N. Determination of membrane protein structures using solution and solid-state NMR. Methods Mol Biol. 2010;654:261-82.

Morohaku K, Pelton SH, Daugherty DJ, Butler WR, Deng W, Selvaraj V. Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. Endocrinology. 2014 Jan;155(1):89-97.

Morrison EA, Henzler-Wildman KA. Reconstitution of integral membrane proteins into isotropic bicelles with improved sample stability and expanded lipid composition profile. Biochim Biophys Acta. 2012 Mar;1818(3):814-20.

Murail S, Robert JC, Coïc YM, Neumann JM, Ostuni MA, Yao ZX, Papadopoulos V, Jamin N, Lacapère JJ. 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. 2008 Jun;1778(6):1375-81.

N

Nettleship JE, Assenberg R, Diprose JM, Rahman-Huq N, Owens RJ. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. J Struct Biol. 2010 Oct;172(1):55-65.

O

O'Beirne GB, Woods MJ, Williams DC. Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver. Eur J Biochem. 1990 Feb 22;188(1):131-8.

Olson JM, Ciliax BJ, Mancini WR, Young AB. Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. Eur J Pharmacol. 1988 Jul 26;152(1-2):47-53.

Ostuni MA, Iatmanen S, Teboul D, Robert JC, Lacapère JJ. Characterization of membrane protein preparations: measurement of detergent content and ligand binding after proteoliposomes reconstitution. Methods Mol Biol. 2010;654:3-18.

Ostuni MA, Péranzi G, Ducroc RA, Fasseu M, Vidic B, Dumont J, Papadopoulos V, Lacapere JJ. Distribution, pharmacological characterization and function of the18 kDa translocator protein in rat small intestine. Biol Cell. 2009 Jul 31;101(10):573-86.

Ostuni MA, Marazova K, Peranzi G, Vidic B, Papadopoulos V, Ducroc R, Lacapere JJ. Functional characterization and expression of PBR in rat gastric mucosa: stimulation of chloride secretion by PBR ligands. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Jun;286(6):G1069-80.

Ostuni MA, Tumilasci OR, Peranzi G, Cardoso EM, Contreras LN, Arregger AL, Papadopoulos V, Lacapere JJ. Effect of translocator protein (18 kDa)-ligand binding on neurotransmitter-induced salivary secretion in rat submandibular glands. Biol Cell 2008;100: 427-439.

Ozaki H, Zoghbi SS, Hong J, Verma A, Pike VW, Innis RB, Fujita M. In vivo binding of protoporphyrin IX to rat translocator protein imaged with positron emission tomography. Synapse. 2010 Aug;64(8):649-53.

P

Palmer I, Wingfield PT. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. Curr Protoc Protein Sci. 2012 Nov.

Papadopoulos V. On the role of the translocator protein (18-kDa) TSPO in steroid hormone biosynthesis. Endocrinology. 2014 Jan;155(1):15-20.

Papadopoulos V, Nowzari FB, Krueger KE. Hormone-stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors. Tropic hormone action on steroid biosynthesis is inhibited by flunitrazepam. J Biol Chem. 1991 Feb 25;266(6):3682-7.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. Trends Pharmacol Sci. 2006 Aug;27(8):402-9. Epub 2006 Jul 5. Review.

Park SH, Das BB, Casagrande F, Tian Y, Nothnagel HJ, Chu M, Kiefer H, Maier K, De Angelis AA, Marassi FM, Opella SJ. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. Nature. 2012 Nov 29;491(7426):779-83.

Parsy CB, Chapman CJ, Barnes AC, Robertson JF, Murray A. Two-step method to isolate target recombinant protein from co-purified bacterial contaminant SlyD after immobilised metal affinity chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Jun 15;853(1-2):314-9.

Péranzi G, Messaoudi C, Issop L, Lacapère JJ. Electron microscope tomography f native membranes. Methods Mol Biol. 2010;654:221-35.

Privé GG. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. Methods. 2007 Apr;41(4):388-97. Review.

R

Rigaud JL, Mosser G, Lacapere JJ, Olofsson A, Levy D, Ranck JL. Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. J Struct Biol. 1997 Apr;118(3):226-35.

Rigaud JL. Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. Braz J Med Biol Res. 2002 Jul;35(7):753-66.

Robert JC, Lacapère JJ. Bacterial overexpressed membrane proteins: an example: the TSPO. Methods Mol Biol. 2010;654:29-45.

Rampon C, Bouzaffour M, Ostuni MA, Dufourcq P, Girard C, Freyssinet JM, Lacapere JJ, Schweizer-Groyer G, Vriz S. Translocator protein (18 kDa) is involved in primitive erythropoiesis in zebrafish. FASEB J. 2009 Dec;23(12):4181-92.

Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, Ye X, Blonder J, Veenstra T, Papadopoulos V. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. Mol Endocrinol. 2012 Nov;26(11):1868-82.

Rukmini R, Rawat SS, Biswas SC, Chattopadhyay A. Cholesterol organization in membranes at low concentrations: effects of curvature stress and membrane thickness. Biophys J. 2001 Oct;81(4):2122-34.

S

Sagan S, Bolbach G (2009) Analyse des protéines membranaires par spectrométrie de masse : toujours un amour impossible ? Spectra Analyse 270: 19-21.

Scarf AM, Luus C, Da Pozzo E, Selleri S, Gaurino C, Martinin C, Ittner LM, Kassiou M. Evidence for complex binding profiles and species differences at the translocator protein (TSPO) (18 kDa). Curr Mol Med. 2012 May;12(4):488-93.

Schmidt-Krey I, Lundqvist G, Morgenstern R, Hebert H. Parameters for the two-dimensional crystallization of the membrane protein microsomal glutathione transferase. J Struct Biol. 1998 Oct;123(2):87-96.

Schröder-Tittmann K, Bosse-Doenecke E, Reedtz-Runge S, Ihling C, Sinz A, Tittmann K, Rudolph R. Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the human glucagon-like peptide-1 receptor. Biochemistry. 2010 Sep 14;49(36):7956-65.

Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 3;1666(1-2):105-17. Review.

Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. Mitochondrion. 2012 Jan;12(1):24-34.

Sileikyte J, Petronilli V, Zulian A, Dabbeni-Sala F, Tognon G, Nikolov P, Bernardi P, Ricchelli F. Regulation of the inner membrane mitochondrial permeability transition by the outer membrane translocator protein (peripheral benzodiazepine receptor). J Biol Chem. 2011 Jan 14;286(2):1046-53.

Sileikyte J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabo R, Di Lisa F, Ricchelli F, Bernardi P, Forte M. Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by the Outer Membrane does not Involve the Peripheral Benzodiazepine Receptor (TSPO). J Biol Chem. 2014 Apr 1.

Slobodyansky E, Guidotti A, Wambebe C, Berkovich A, Costa E. Isolation and characterization of a rat brain triakontatetraneuropeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site. J Neurochem. 1989 Oct;53(4):1276-84.

Sreerama N, Woody RW. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. Protein Sci. 2004 Jan;13(1):100-12.
Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986 May 5;189(1):113-30. PubMed PMID: 3537305.

T

Taketani S, Kohno H, Furukawa T, Tokunaga R. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. J Biochem. 1995 Apr;117(4):875-80.

Taskinen JP, van Aalten DM, Knudsen J, Wierenga RK. High resolution crystal structures of unliganded and liganded human liver ACBP reveal a new mode of binding for the acyl-CoA ligand. Proteins. 2007 Jan 1;66(1):229-38.

TEALE FW, WEBER G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. Biochem J. 1957 Mar;65(3):476-82.

Teboul D, Beaufils S, Taveau JC, Iatmanen-Harbi S, Renault A, Venien-Bryan C, Vie V, Lacapere JJ. Mouse TSPO in a lipid environment interacting with a functionalized monolayer. Biochim Biophys Acta. 2012 Nov;1818(11):2791-800.

Tu LN, Morohaku K, Manna PR, Pelton SH, Butler WR, Stocco DM, Selvaraj V. Peripheral Benzodiazepine Receptor/Translocator Protein Global Knockout Mice are Viable with no Effects on Steroid Hormone Biosynthesis. J Biol Chem. 2014 Jun 16.

V

Vanhee C, Batoko H. Arabidopsis TSPO and porphyrins metabolism: a transient signaling connection? Plant Signal Behav. 2011 Sep;6(9):1383-5.

Veenman L, Shandalov Y, Gavish M. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. J Bioenerg Biomembr. 2008 Jun;40(3):199-205.

Veenman L, Gavish M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. Pharmacol Ther. 2006 Jun;110(3):503-24.

Vénien-Bryan C, Lenne PF, Zakri C, Renault A, Brisson A, Legrand JF, Berge B. Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy. Biophys J. 1998 May;74(5):2649-57.

Verma A, Nye JS, Snyder SH. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Apr;84(8):2256-60.

Verma A, Snyder SH. Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors. Mol Pharmacol. 1988 Dec;34(6):800-5.

W

Warne T, Serrano-Vega MJ, Tate CG, Schertler GF. Development and crystallization of a minimal thermostabilised G protein-coupled receptor. Protein Expr Purif. 2009 Jun;65(2):204 13.

Wendler G, Lindemann P, Lacapère JJ, Papadopoulos V. Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Nov 28;311(4):847-52.

Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal Biochem. 1984 Apr;138(1):141-3.

Woods MJ, Zisterer DM, Williams DC. Two cellular and subcellular locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor in rat liver. Biochem Pharmacol. 1996 May 17;51(10):1283-92.

Woody RW. Circular dichroism. Methods Enzymol. 1995;246:34-71. Review.

Wright G, Reichenbecher V. The effects of superoxide and the peripheral benzodiazepine receptor ligands on the mitochondrial processing of manganese-dependent superoxide dismutase. Exp Cell Res. 1999 Feb 1;246(2):443-50.

Y

Yeliseev AA, Kaplan S. A novel mechanism for the regulation of photosynthesis gene expression by the TspO outer membrane protein of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. J Biol Chem. 1999 Jul 23;274(30):21234-43.

Yeliseev AA, Kaplan S. TspO of rhodobacter sphaeroides. A structural and functional model for the mammalian peripheral benzodiazepine receptor. J Biol Chem. 2000 Feb 25;275(8):5657-67.

Z

Zeno S, Veenman L, Katz Y, Bode J, Gavish M, Zaaroor M. The 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) prevents accumulation of protoporphyrin IX. Involvement of reactive oxygen species (ROS). Curr Mol Med. 2012 May;12(4):494-501.

Listes des figures

VI. LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure I. 01 : Schéma des différentes protéines formant le transduceosome et le metabolon, complexes impliqués dans la régulation de la stéroidogenèse……...….p14

Figure I. 02: Schéma illustrant l'implication hypothétique de la TSPO dans la Biosynthèse de l'hème……...…….…..p16

Figure I. 03 : Schéma des différentes protéines interagissant avec la TSPO…….p18

Figure I. 04 : DBI Humain…….p20

Figure I. 05 : Eléments structuraux du cholestérol……p21

Figure I. 06 : Illustration du modèle de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson (1972)……...……..p21

Figure I. 07 : Trafic et produits dérivés du cholestérol……...…...p23

Figure I. 08 : Formule chimique de la protoporphyrine IX et de ses dérivés biologiquement actifs……p24

Figure I. 09 : Structure moléculaire de 3 différentes benzodiazépines…….……p26

Figure I. 10 : Formule chimique représentant le PK 11195…….……...……...p27

Figure I. 11 : Modèle hypothétique des différents états de la TSPO…….p28

Figure I. 12 : Conservation de la séquence en acides aminés de TSPO chez certains mammifères…….……...……p29

Figure I. 13 : structure des cinq peptides synthétiques recouvrant les cinq domaines hydrophobes de la mTSPO…….....p29

Figure I. 14 : Modèle de TspO de Rhodobacter Sphaeroïdes obtenu par l'analyse des données de cryomicroscopie électronique……p30

Figure I. 15 : Structure haute résolution de la mTSPO de souris en complexe avec le PK 11195……..……...…….p31

Matériels et Méhodes

Figure II. 01 : Représentation du plasmide pET-15b……....p38

Figure II. 02 : Spectres HSQC ^{1}H-^{15}N de la TSPO obtenue par culture des bactéries avec une source d'azote ^{15}N mais en présence de tryptophane non marqué……...…….……..p45

Figure II. 03 : La biosynthèse des acides aminés dans E. coli……...p46

Figure II. 04 : Mutagenèse dirigée par PCR……..p49

Figure II. 05 : L'acide nitrilotriacétique (NTA)……p51

Figure II. 06 : Courbe d'étalonnage du SDS……..……..……..p54
Figure II. 07 : Courbe d'étalonnage du DPC……..……...p54
Figure II. 08 : Illustration du phénomène de polarisation circulaire droite et gauche……...p57
Figure II. 09: Illustration des différents spectres caractéristiques de chaque type de structure secondaire……p58
Figure II. 10 : Schéma du principe de la DSC……...……p69
Figure II. 11 : Microcalorimètre ITC……p62
Figure II. 12 : Données microcalorimétriques caractéristiques d'une interaction ligand / macromolécule……p62
Figure II. 13 : Les spectres d'absorbance de la mTSPO, la PPIX, le PK11195 et le tampon phosphate……...……p63
Figure II. 14 : Principe de la filtration……...p66

Résultats et discussion
Figure III. 01 : Courbe de la croissance bactérienne de E Coli lors de la culture en milieu LB……p70
Figure III. 02 : Photographie prise au microscope électronique en coloration négative d'une culture de *E. coli* BL21……...p71
Figure III. 03 : Chromatogramme de purification de la mTSPO sur colonne NTA-Ni……p72
Figure III. 04 : Gel (SDS-PAGE) acrylamide 12 % coloré à l'argent représentant les différentes étapes de purification de la mTSPO……..p73
Figure III. 05 : Digestion trypsine de la mTSPO/SDS……..p74
Figure III. 06 : Spectre de dichroïsme circulaire de la mTSPO/SDS dans différents détergents……p75
Figure III. 07 : Fluorescence intrinsèque de la mTSPO/SDS……...p76
Figure III. 08 : Fluorescence intrinsèque de la TSPO en fonction du détergent……...p76
Figure III. 09 : Caractérisation du comportement de la mTSPO dans un milieu dénaturant……..……...p78
Figure III. 10 : Digestion trypsine de la TSPO/SDS…..……p81
Figure III. 13 : Effet du PK 11195, ligand specifique de la TSPO, sur la digestion trypsine de la mTSPO/DPC……...p81
Figure III. 12 : Spectre de dichroïsme circulaire de la mTSPO/SDS dans différents détergents……..……..……..p82

Figure III. 13 : Caractérisation du comportement de la mTSPO dans un milieu dénaturant……..……...p83
Figure III. 14 : Changement de fluorescence intrinsèque de la mTSPO induits par le PK 11195……...……p85
Figure III. 15 : Titrage isotherme des interactions de la mTSPO avec le PK 11195……...p86
Figure III. 16 : Données intégrées en kcal/mol de PK11195 en fonction du rapport molaire PK11195/mTSPO……p86
Figure III. 17 : Mesure de liaison de ligands par séparation du lié et du libre……..p88
Figure III. 18 : Reconstitution de la mTSPO dans des protéoliposomes……...p90
Figure III. 19 : Liaison de PK 11195……p91
Figure III. 20 : Liaison de Cholestérol…….……...……..p92
Figure III. 21 : Chasse du PK 11195 par la protoporphyrin IX (PPIX)……p92
Figure III. 22 : Stabilisation de la fluorescence de la mTSPO/DPC par des lysodérivés….p93
Figure III. 23 : Stabilisation de la fluorescence de la mTSPO/DPC par des lipides…….p94
Figure III. 24 : Augmentation de la fluorescence de la mTSPO/DDM(SDS) en présence de lipides……p95
Figure III. 25 : Spectres RMN 1D (^{1}H) de la mTSPO/DPC en absence (tracé inférieur) ou en présence de lipides (tracé supérieur)……..p95
Figure III. 26 : Images de la mTSPO……....p98
Figure III. 27 : Courbe de croissance bactérienne lors de la culture en milieu minimum...p101
Figure III. 28 : Courbe de croissance bactérienne en milieu LB et en milieu minimum…p101
Figure III. 29 : SDS-PAGE acrylamide 12 % coloré au bleu de coomassie représentant le contenu en mTSPO des bactéries au cours de la croissance avant et après induction ….....p102
Figure III. 30 : Gels d'électrophorèse SDS-PAGE acrylamide 12% colorés à l'argent représentant les différentes étapes de purification de la mTSPO marquée……..……p103
Figure III. 31 : Gels d'électrophorèse acrylamide 12% colorés à l'argent representant les etapes de purification de la proteine contaminante…….…….……p104
Figure III. 32 : Solubilité du PK 11195……..……p106
Figure III. 33 : Solubilité du PK 11195 en présence de DPC……...…….…. p107
Figure III. 34 : Solubilité du PK 11195 en présence de DPC……..p108
Figure III. 35 : Schéma illustrant le titrage de la TSPO en micelle de DPC par son ligand le plus spécifique, le PK 11195……p109
Figure III. 36 : Alignements de séquence des deux boucles cytoplasmiques de TSPO ……..p110
Figure III. 37 : Liaison du PK 11195…….……...p113

Figure III. 38 : Les spectres HSQC ^{1}H-^{15}N de la TSPO marquée spécifiquement ^{15}N d'un acide aminé……..…….p115

Conclusions et perspectives

Figure IV. 01 : Structure tridimensionnelle de la mTSPO avec son ligand le plus spécifique, le PK11195, résolue par RMN……..……p118
Figure IV. 02 : Structure du cholestérol……..…….p120
Figure IV. 03 : Interactions cholestérol – cholestérol……..……p122

Listes des tableaux

VII. LISTE DES TABLEAUX

Matériels et Méhodes

Tableau II. 01 : Composition du milieu M9……p40

Tableau II. 02 : Structure et caractéristiques des détergents (Sigma-Aldrich) et des lipides (Avanti Polar™) utilisés pour l'étude de la Mtspo……p41

Tableau II. 03 : Concentration en acides aminés pour le marquage sélectif par inhibition dans le milieu de culture……..p46

Tableau II. 04 : Les oligonucléotides utilisés pour la mutation de la mTSPO……..p48

Tableau II. 05 : Caractéristiques des Cycles de PCR……p49

Tableau II. 06 : Acides aminés aromatiques et leurs longueurs d'ondes caractéristiques dans H_2O à pH 7……..p60

Tableau II. 07 : Caractéristiques des différents filtres testés pour la mesure de liaison du ligand radioactif PK 11195 à la mTSPO……p68

Résultats et dicsussion

Tableau III. 01 : Analyse de la structure secondaire de la TSPO/SDS acquise par déconvolution des spectres dichroïques par le logiciel CDPRO……p75

Tableau III. 02 : Analyse de la structure secondaire acquise par déconvolution des différents spectres figurants dans la figure III. 09 (c)……p78

Tableau III. 03 : Rapport détergent/mTSPO……p80

Tableau III. 04 : Analyse de la structure secondaire acquise par déconvolution des différents spectres de DC présentés dans la figure III. 12 par le logiciel CDPRO……p82

Tableau III. 05 : Analyse de la structure secondaire par déconvolution des différents spectres figurant dans la figure 13(a)……p83

Tableau III. 06 : Taux de marquage obtenus par la spectrométrie de masse……..p105

Tableau III. 07 : Le pourcentage de liaison des différents mutants de la TSPO…..……p110

Tableau III. 08 : Les résultats de mesures de liaison du [^{3}H] PK 11195 sur la mTSPO sauvage et des differents mutants……..……p112

Annexes

VIII. ANNEXES

Chapter 1

Characterization of Membrane Protein Preparations: Measurement of Detergent Content and Ligand Binding After Proteoliposomes Reconstitution

Mariano A. Ostuni, Soria Iatmanen, David Teboul, Jean-Claude Robert, and Jean-Jacques Lacapère

Abstract

The study of membrane proteins is a difficult task due to their natural embedding in hydrophobic environment made by lipids. Solubilization and purification from native membranes or overexpressed system involves the use of detergent to make them soluble while maintaining their structural and functional properties. The choice of detergent is governed not only by their ability to reach these goals, but also by their compatibility with biochemical and structural studies. A different detergent can be used during purification, and characterization of the detergent amounts present in each purification step is crucial. To address this point, we developed a colorimetric method to measure detergent content in different preparations. We analyzed detergent present in the collected fractions from the purification of the recombinant membrane translocator protein (RecTSPO). We followed detergent removal during the reconstitution of RecTSPO in liposomes and observed by electron microscopy the formation of proteoliposomes. We addressed the RecTSPO functionality by testing its ability to bind high affinity drug ligand [^{3}H]PK 11195. We described the different parameters that should be controlled in order to optimize the measurement of this ligand binding using a filtration procedure. These protocols are useful to characterize functionality and detergent content of membrane protein, both key factors for further structural studies.

Key words: Detergent, DPC, Mitochondrial membrane protein, Mitochondrial TSPO, PBR, Purification, Reconstitution, SDS

1. Introduction

The quantity and distribution of naturally expressed membrane protein is a limiting step for functional and structural studies, which usually require important amounts of highly purified and concentrated protein (1). Along the past decades, various

Jean-Jacques Lacapère (ed.), *Membrane Protein Structure Determination: Methods and Protocols*,
Methods in Molecular Biology, vol. 654, DOI 10.1007/978-1-60761-762-4_1,
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

strategies have been developed to either purify or overexpress membrane proteins. These strategies include the isolation and enrichment of naturally abundant proteins from their original tissues or the heterologous overexpression production systems and purification protocols (2). In this latter case, several vectors, constructions, and expression systems, including eukaryotes organism and cells, prokaryotes, and acellular systems (see further chapters), have been developed to optimize both expression and purification yields.

Although there are exceptional cases of naturally abundant proteins, which can be highly enriched in a few steps (e.g., sarco–endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) from rabbit fast skeletal muscle or adenine nucleotide transporter (ANT) from heart liver mitochondria), membrane protein production protocols often include numerous purification steps mostly in the presence of a detergent (3). The choice of the detergent is complex since, on one hand, the membrane protein should be solubilized but remaining functional, (4) and on the other hand, the detergent should be compatible with biochemical and structural studies. For instance, noncharged detergents are a requisite for ion desorption experiments (MALDI-TOF), and deuterated detergents are needed for nuclear magnetic resonance (NMR) studies. Furthermore, depending on structural studies performed, additional steps might be needed in order to eliminate, diminish, or replace the detergent used to purify the membrane protein. The other major component of a membrane protein preparation is the lipid environment. Lipids could be present from extraction, or added or even exchanged, depending on the purification process.

Characterization of the various components present in the final membrane protein preparation is required to assure not only the reproductibleness of experiments, but also the knowledge of the structural and the functional states of the protein. Indeed, any additional step in purification protocols implies the possibility of introducing an unexpected structural modification that may lead to misfolding and/or loss of function. This characterization is important to avoid the loss of time and money used in the analysis of improper samples and it may include several measurements: (1) the assessment of protein purity on gels and the characterization of contaminant proteins as well as the polymeric state of the protein of interest; (2) the analysis of the secondary and tertiary folding not only by spectroscopic (circular dichroism (CD)) techniques, but also by other biophysical techniques (5); (3) the determination of the protein, lipid, and detergent ratios that can be gained from the individual measurement of each component; and (4) the functionality of the purified membrane protein. This can be determined in detergent/protein complexes and/or in reconstituted proteoliposomes.

Protein concentration determination may be difficult due to the presence of detergent that perturbs classical colorimetric measurements. However, protein concentration could be easily addressed using a nondestructive method based on the absorbance (in the aromatic region at 280 nm), in the presence of the detergent, and the calculated extinction coefficient (6). Several protocols of lipid extraction, purification, and characterization have been described from thin layer chromatography (7) to more recent mass spectroscopy (8), and they usually enable good lipid content determination. Detergent content measurements are accurately determined when radioactive forms exist. Some other approaches, such as the use of specific electrodes (9) or thin layer chromatography (10), have been described over the last decades to measure detergent content. We present here methods to address this latter point in different specific cases such as the measurement of detergent present in the membrane protein preparation and the following of detergent removal during membrane protein reconstitution in liposomes. The formation of proteoliposomes is a simple method to assess the protein functionality when coupled to ligand binding for a receptor or transport for a translocator. We illustrate the use of these methods taking advantage of the specific case of recombinant TranSlocator PrOtein (RecTSPO). This membrane protein previously named peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) is a transmembrane protein mostly located in mitochondria (11), whose expression and purification will be discussed in another chapter.

2. Materials

1. Absorption measurements: DO and absorption spectra were measured using an UV-300 Unicam UV-visible spectrometer (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France).
2. Phosphate buffer saline (PBS): 50 mM H_2NaPO_4; 150 mM NaCl; pH: 7.6.
3. Bio-Rad Protein assay kit and Bio-Beads SM2 (25–50 mesh) were purchased by Bio-Rad (Marne la Coquette, France).
4. Lipid solution: A mixture of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoyl phosphatidylethanolamine (DMPE) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) at a ratio of 9 to 1 weight/weight were mixed in buffer solution and sonicated in a water bath FB 15049 (Fischer Scientific, Illkirch, France) to remove multilamellar vesicles.
5. Detergents used: Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and dodecylphosphocholine (DPC, COGER, Paris, France).

6. Protein used: RecTSPO (mouse recombinant TSPO) was expressed in *E. Coli Bl21* bacteria (Invitrogen, Paisley, UK), extracted from inclusion bodies with SDS, purified by affinity chromatography on superflow Ni-NTA resin (Qiagen SA, Courtaboeuf, France), and protein concentration was determined from absorption spectra using extinction coefficient of $3.88/(\text{mg/ml})^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.
7. Radioactivity: Labeled PK 11195 ([^{3}H]PK 11195) was purchased by New England Nuclear, NEN Life Science Products (Boston, MA, USA). Whatman Filters GF/C and PK 11195 were purchased by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). BSC liquid scintillation cocktail (GE Healthcare Europe, Saclay, France) and Wallac 1409 liquid scintillation counter (Perkin Elmer, Les Ulis, France).
8. Electron microscopy: JEOL 1200EX Transmission Electron microscope equipped with LaB6 filament operated at 120 kV and a sample holder (JEOL EM-SQH10). Cupper grids (400 mesh, Delta Microscopies, Labege, France) were covered with carbon film and negatively stained with 2% uranyl acetate (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

3. Methods

One of the key components of membrane protein purification is detergent, since its presence makes water soluble a protein naturally embedded in lipid bilayers. During purification process from either naturally abundant membrane protein as well as from overexpression systems, amount of detergent is usually only characterized from the initial detergent concentration in the used solutions. However, centrifugation, affinity column purification or dialysis steps can differentially concentrate detergent and proteins. Thus, quantification of detergent content of membrane protein preparation before structural or functional analysis is crucial (see Chapter 3 by Robert and Lacapere in this book).

3.1. Detergent Concentration Determination

It has been described for a long time that the presence of detergent modifies or impairs the colorimetric dosage of proteins by Bradford-based protein assay kits (Bio-Rad). We take advantage of the detergent interference to directly measure the effect of detergent addition to this colorimetric dye.

1. Standard calibration of sodium dodecyl sulfate (SDS) and dodecylphosphocholine (DPC) in the absence of protein: the Bio-Rad dye reagent was prepared by fivefold dilution in distilled water. 1 ml of diluted reagent was distributed into test tubes, and 0–300 μg of SDS or DPC were added.

Absorption spectra were recorded (from 250 to 800 nm) for each SDS or DPC containing solutions (Figs. 1a and 2a). The spectrophotometer saturation level was around OD value as great as 3 (see left side of the spectra). The spectra exhibit a shift of the peak, and the maximal change of absorbance induced by SDS and DPC was observed at 650 and 600 nm, respectively. Thus, OD for the various concentrations of SDS and DPC was measured at 650 and 600 nm for SDS and

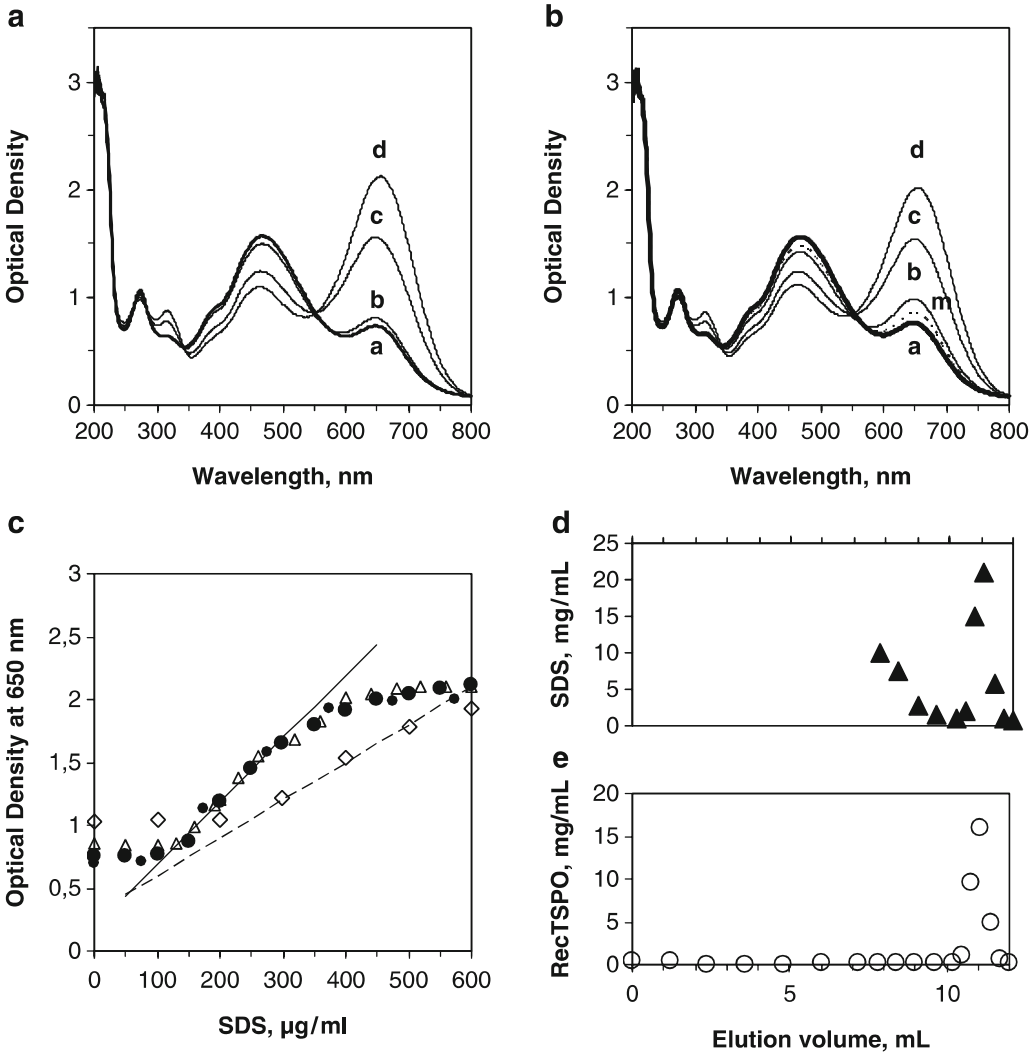


Fig. 1. Effect of SDS on the light absorption of the Bradford-based Bio-Rad dye. Panel (**a**) shows the effect of the addition of different quantities of SDS (traces a, b, c, and d correspond to 0, 75, 125, and 200 µg/ml SDS, respectively) on the Bio-Rad dye absorption spectra. Several peaks could be observed, but largest differences in optical density due to SDS were obtained at 650 nm. Panel (**b**) shows the effect of methanol on the dye spectrum in the presence of different quantities of SDS (trace a, dye solution alone; trace m, in the presence of 3% methanol; traces b, c, d, and e, in the presence of methanol and 75, 125, and 200 µg/ml SDS, respectively). Panel (**c**) shows plotted optical density obtained at 650 nm without (*filled circles*) or with 3 and 7.5% added methanol (*open triangles* and *diamonds*, respectively). *Solid* and *dashed lines* depict the linear portion of the titration curves (100–300 and 200–500 µg/ml). Panels (**d**) and (**e**) show chromatograms of RecTSPO purification in the presence of SDS. Detergent contents in the eluted fractions (*closed triangles* in (**d**)) were measured by precipitating the protein and then mixing an aliquot with Bio-Rad dye to get detergent concentration in the supernatant. Protein contents in the eluted fractions (*opened circles* in (**e**)) were measured by recording absorption spectra of each fraction and calculating protein concentration using extinction coefficient of 3.88/(mg/ml)$^{-1}$ cm^{-1} at 280 nm.

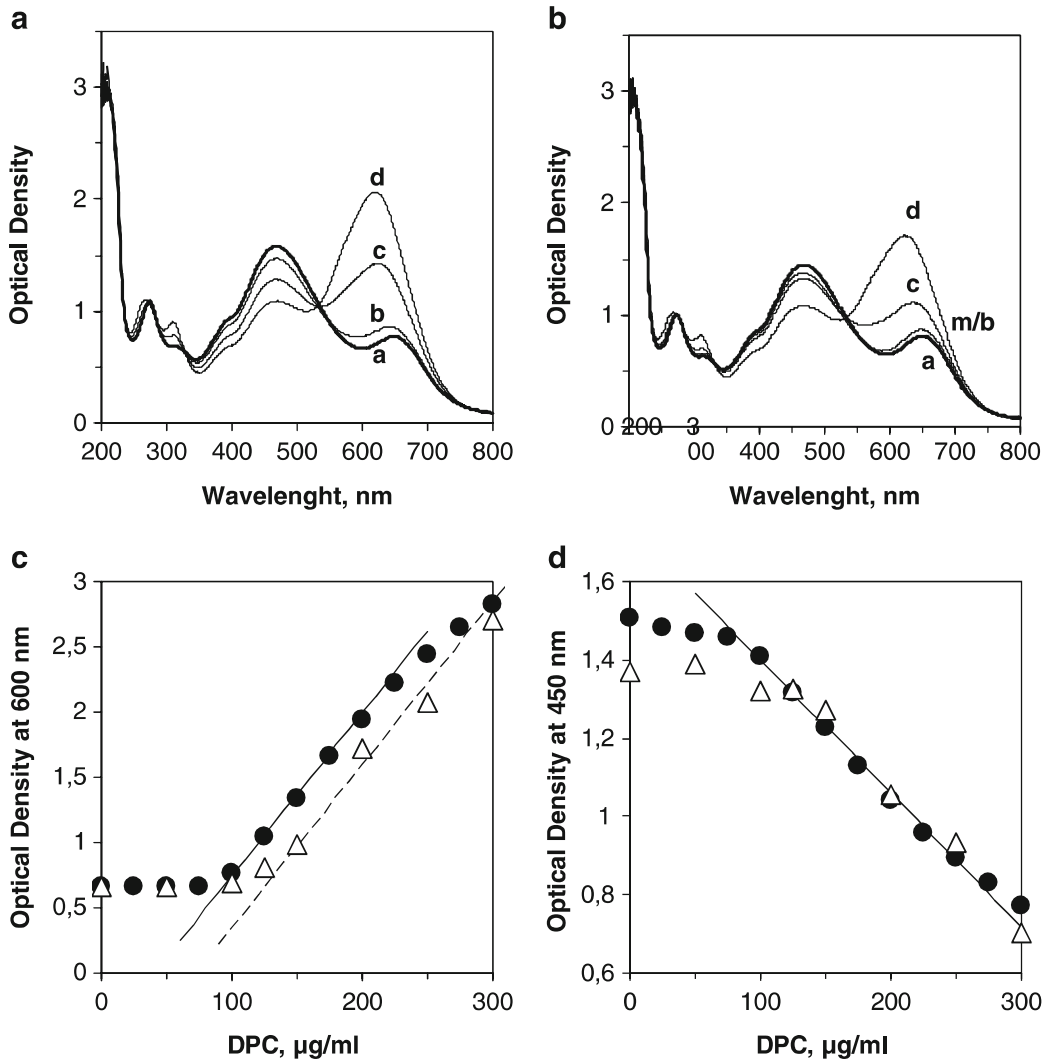


Fig. 2. Effect of DPC on the light absorption of the Bradford-based Bio-Rad dye. Panel (**a**) shows the effect of the addition of different quantities of DPC (traces **a**, **b**, **c**, and **d** correspond to 0, 75, 125, and 200 µg/ml DPC, respectively) on the Bio-Rad dye absorption spectra. Several peaks could be observed but largest differences in optical density were obtained at 600 nm. Panel (**b**) shows the effect of the presence of methanol on the addition of different quantities of DPC (trace a, dye solution alone; trace m, in the presence of methanol; traces b, c, d, and e, in the presence of methanol and 75, 125, and 200 µg/ml DPC, respectively). Panel (**c**) shows plotted optical density obtained at 600 nm without (*filled circles*) or with (*open triangles*) methanol. *Solid* and *dotted lines* depict the linear portion of the titration curve in the absence and in the presence of methanol, respectively. Panel (**d**) shows plotted OD obtained at 450 nm without (*filled circles*) or with (*open triangles*) methanol. *Solid line* depicts the linear portion of the titration curve (100–300 µg/ml).

DPC, respectively, and data were plotted versus standard concentrations (Figs. 1c and 2c). Both curves gained in the presence of SDS and DPC exhibit a linear interval permitting accurate dosages of detergent in the range of 50–200 and 100–250 µg/ml for SDS and DPC, respectively (see Note 1).

2. Assay for protein containing samples: Bio-Rad dye reagent is protein sensitive; thus, to avoid cross-reaction with detergent staining, protein can be precipitated in methanol. One volume of protein samples was added to three volumes of methanol in a 1.5-ml tube and strongly mixed. A white precipitate

is formed and centrifuged for 5 min at 200 × *g*. The amounts of detergents present in the supernatant can be determined using standard curves performed in the presence of methanol, since small amount of methanol (3%, accordingly to final concentration in the spectrometer cell) has a small effect on Bio-Rad dye reagent absorption spectrum (Figs. 1b and 2b). Absorption spectra were recorded (from 250 to 800 nm) for each SDS and DPC containing solutions in the presence of 3% methanol. MeOH shifts the calibration curve of SDS and DPC when looking absorption at 600 nm (Figs. 1c and 2c), but the effect is smaller for SDS than for DPC. Indeed, a clear effect is observed for 7.5% MeOH on the calibration curve of SDS, whereas only 3% has a significant effect on DPC calibration curve (Figs. 1c and 2c). Methanol also induced a small decrease at 450 nm of absorption spectrum of Bio-Rad dye reagent. DPC calibration curves performed at this absorption wavelength (Fig. 2d) shows that methanol has no effect in the linear part of the curve, for 100–250 µg of DPC (see Note 1).

3. Application to membrane protein purification: RecTSPO is overexpressed in *E. coli* cells (see Chapter 3 by Robert and Lacapere in this book), extracted from inclusion bodies with SDS and purified by immobilized metal ion affinity chromatography in the presence of detergent. SDS-solubilized RecTSPO is loaded into Ni-NTA resin, column is washed and protein eluted with imidazole and SDS containing buffer. Collected fractions were analyzed for detergent and protein content and chromatogram drawn (Fig. 1d, e). An aliquot of each fraction was mixed with methanol (see above) and detergent content of the supernatant determined using calibration curves (see Note 2). An absorption spectrum of each fraction (diluted if needed) was recorded and protein contents determined using extinction coefficient of 3.88/(mg/ml)$^{-1}$ cm^{-1} at 280 nm.

3.2. Detergent Removal Using Bio-Beads

Bio-Beads are macroporous polystyrene beads used in hydrophobic interaction chromatography (12). They have a high surface area for adsorbing organics of molecular weight less than 2,000 from aqueous solutions. The Bio-Beads are useful for the adsorption of nonpolar substances or surface active agents such as detergents. Kinetics of detergent removal by theses Bio-Beads are more or less specific for each detergent (13–15). The above described technique can be used to follow detergent removal from a solution by measuring detergent content of aliquots.

1. Bio-Beads preparation: Dry SM2 Bio-Beads were extensively washed before use, firstly with methanol (three times) to eliminate impurities and polystyrene dust and then with water (four times) to hydrate them.

2. Kinetics of detergent removal: 10–15 mg detergents were added to 5 ml solution of PBS. Solution was gently stirred and kept at room temperature (25°C). At various time intervals, weighted amount of wet Bio-Beads were added (see Note 3). Aliquots of 40 µl were removed at several time points and their detergent content was determined by mixing in 1 ml containing Bio-Rad dye solution (1:5 dilution), which OD was measured at the detergent corresponding wavelength (Fig. 3a, b) (see Note 2).
3. Calculation of binding capacity of Bio-Beads: Capacity was defined as the total amount of detergent that was removed by 1 g of Bio-Beads. The amount of detergent removed by each

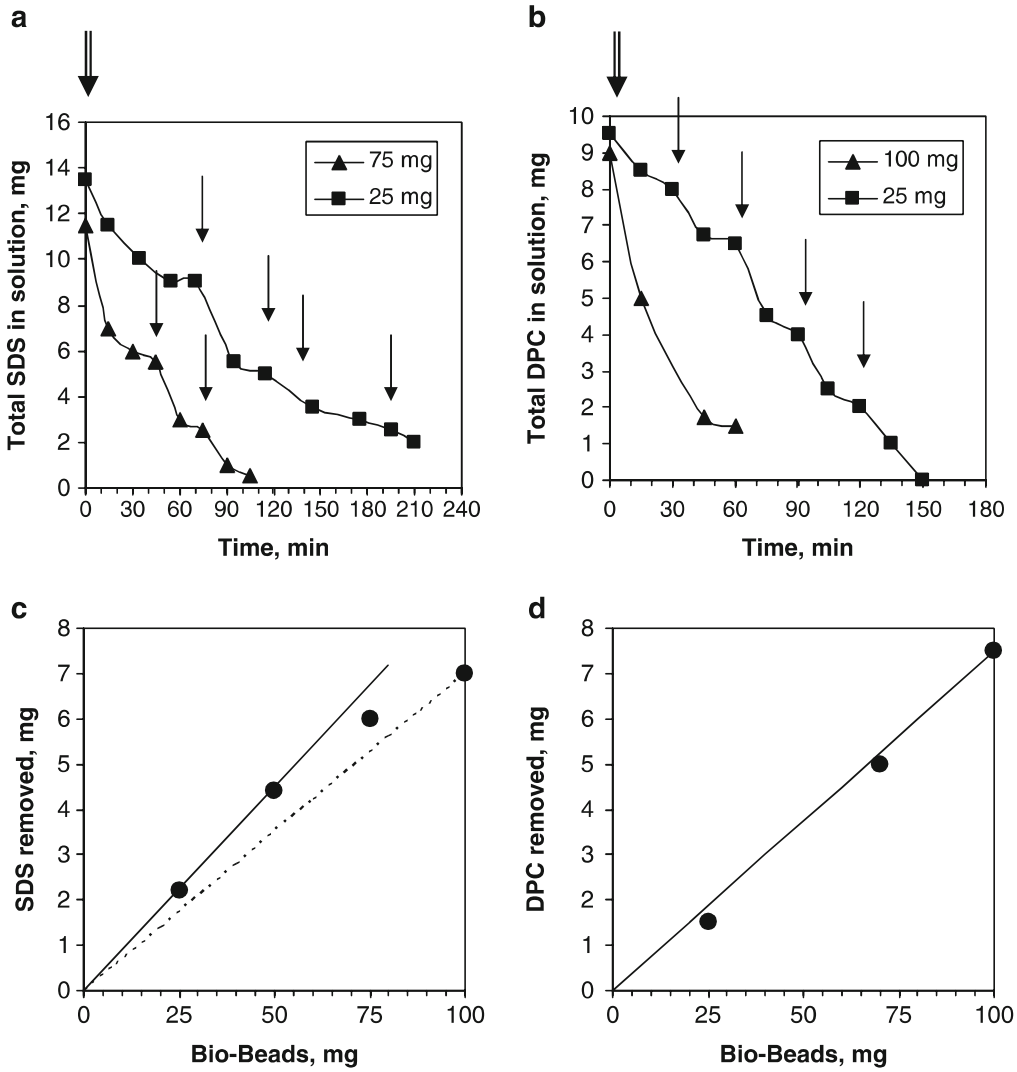


Fig. 3. Detergent absorption by Bio-Beads. Panel (**a**) shows the time course of SDS removal by the repeated addition (*signaled by arrows*) of 25 (*closed squares*) or 75 (*closed triangles*) mg of BB in 6 ml solution containing ~11–13 mg total SDS. Panel (**b**), kinetics of DPC elimination in the presence of two different amounts of Bio-Beads (*closed squares* and *triangles* for 25 and 100 mg, respectively). Panels (**c**) and (**d**) show the quantity of SDS and DPC absorbed as function of amount of wet Bio-Beads added. A binding capacity of 70 mg SDS or DPC per g of Bio-Beads was calculated from respective slopes.

addition of Bio-Beads was measured and data plotted (Fig. 3c, d for SDS and DPC, respectively). The slope of the curves permitted to calculate a value of 70–80 mg SDS or DPC removed by gram of Bio-Beads (in agreement with previously published results for SDS (15).

3.3. Proteoliposomes Formation

Protein incorporation into liposomes is a powerful tool to investigate both functional and structural aspects of membrane proteins. Several strategies have been developed to achieve functional proteoliposomes including the use of organic solvent, mechanical protocols and the use of detergents (16). The latest is the most frequently chosen strategy as detergents are usually present in isolation and purification protocols. Standard procedures to incorporate detergent solubilized membrane protein in lipid bilayer involves different steps: (1) mixing of membrane protein solubilized in detergent with lipids to form a ternary complex, (2) exchange of detergent surrounding protein by lipid detergent, and (3) bilayers formation, mostly vesicle formation. Detergent removal can be followed by the above described method (Fig. 4a, d) and vesicle formation by measuring light scattering changes (Fig. 4b, e). Finally, proteoliposomes formation as well as the evolution in size and shape of the objects present in the solution can be assessed by electron microscopy (Fig. 4c, f).

1. A mixture of DMPC/DMPE (9/1 w/w) lipids at a final concentration of 0.5–1 mg/ml is added to a 6-ml solution of PBS.
2. Membrane protein solubilized in detergent at a final protein concentration of 0.1–0.2 mg/ml is added to the lipid containing solution.
3. OD at 550 nm of the solution is measured before and after the addition of protein. The presence of detergent from the purified membrane protein solution is usually enough to solubilize the lipids and is clearly observed by an important decrease in OD. At this wavelength, most proteins do not absorb and the size of the detergent, protein, lipids complexes are too small to induce large light scattering.
4. Detergent content of the starting solution: Aliquots of 40 µl was removed and mixed in 1 ml containing Bio-Rad dye solution (1:5 dilution). OD was measured at the detergent corresponding wavelength (Fig. 3a, b) and detergent content calculated from calibration curves (Figs. 1c and 2c).
5. For negative staining, 5 µl of the reconstitution samples were applied to carbon-coated grids, blotted, and stained with 1% uranyl acetate and the specimens were observed with an electron microscope (Fig. 4c, f).

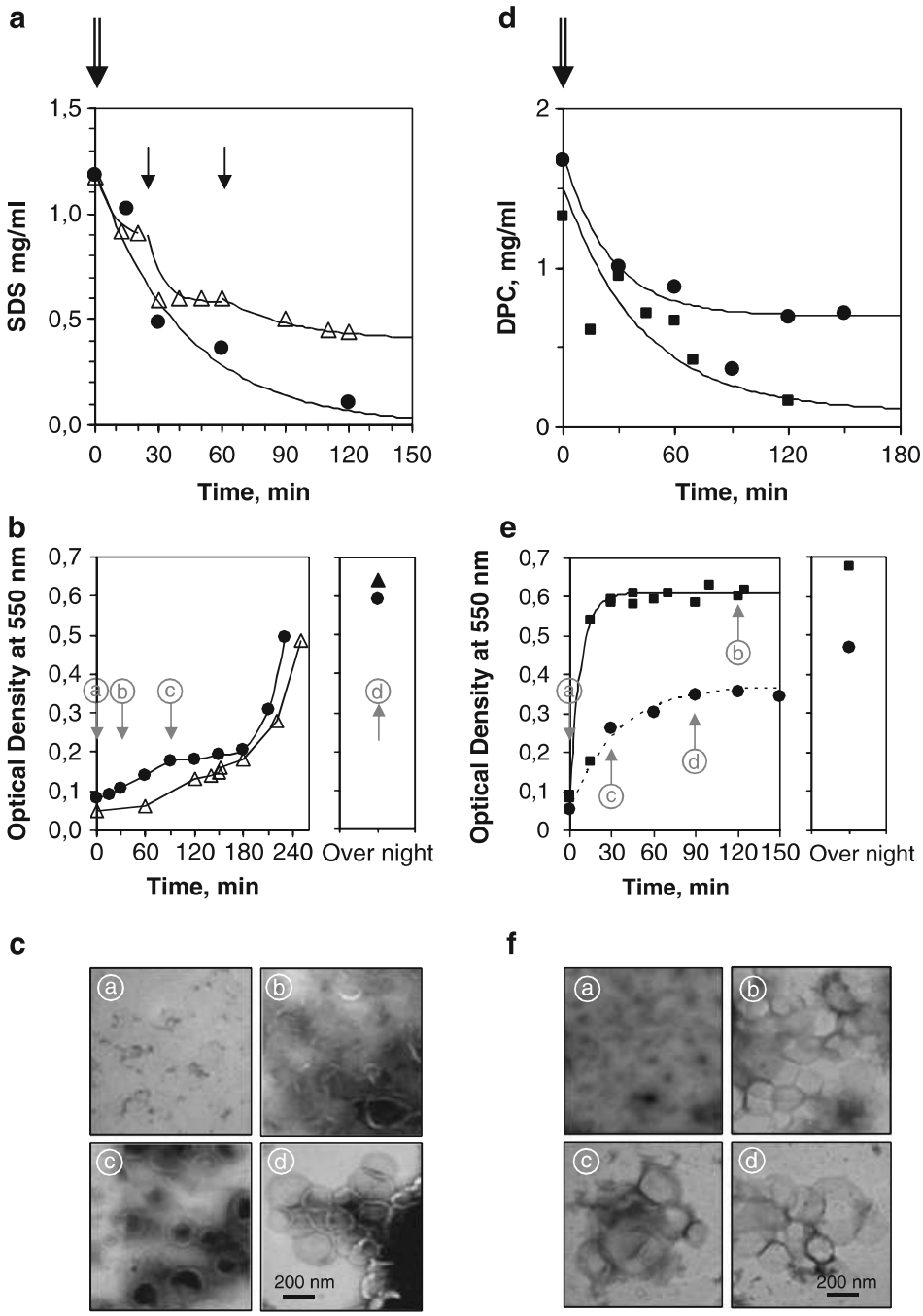


Fig. 4. Formation and characterization of RecTSPO containing proteoliposomes. Reconstitution process was followed by measuring detergent removal and vesicle formations from a solution containing lipids, RecTSPO and detergent (panels (**a–c**) and (**d–f**) for RecTSPO purified in SDS or DPC, respectively). Panel (**a**), time course of SDS removal by a single addition (*signaled by arrows*) of large amount (*closed circles*) or repeated addition of small amounts (*closed triangles*) of Bio-Beads. Panel (**b**), time course of light scattering changes upon SDS removal by a single (*closed circles*) or repeated addition of small amounts (*closed triangles*) of Bio-Beads. Panel (**c**), electron micrographs of negatively stained samples taken at different time of SDS elimination (0, 30, 90 min, and over night, as indicated in panel (**b**)). Panel (**d**), time course of DPC removal by a single addition (*signaled by arrows*) of large (*closed squares*) or small amount (*closed circles*) of Bio-Beads. Panel (**e**), time course of light scattering changes upon DPC removal by a single addition of large (*closed squares*) or small amounts (*closed circles*) of Bio-Beads. Panel (**f**), electron micrographs of negatively stained samples taken at different time of DPC elimination (0, 120 and 30, 90 min from large and small Bio-Beads additions, as indicated in panel (**e**)).

6. Detergent present in the solution is removed by addition of Bio-Beads. The quantity of added Bio-Beads regulates the rate of vesicle formation by controlling the amount of detergent removed (compare Fig. 4a–c for SDS and 4d–f for DPC). Addition of Bio-Beads mass close to the binding capacity can be chosen to get a fast reconstitution, whereas addition of a smaller mass generates a slower reconstitution process.
7. Formation of proteoliposomes is basically correlated to detergent removal, but several remarks should be done. (1) The kinetics of vesicle formation is not exactly parallel with that of the detergent removal as revealed by the difference observed between the measurements of detergent residual (Fig. 4a, d for SDS and DPC, respectively) and the changes in OD_{550} (Fig. 4b, e for SDS and DPC, respectively). (2) The final OD_{550} reached after detergent removal correlates the size of the vesicles formed, but the size of the vesicles seems to vary with the type of detergent used to solubilize the protein (see Note 4). Comparison of Fig. 4c, f shows that vesicles are smaller when SDS was the solubilizing detergent. (3) In some cases, vesicles tend to fuse leading to an increase of OD_{550} well correlated with the observation of vesicle aggregation.

3.4. Ligand Binding

Ligand binding is a useful method to characterize functional state of a membrane protein. Several techniques can be used among which incubation of proteoliposomes in the presence of radioactive ligands is a very sensitive one. Separation of bound and free ligand can be obtained by filtration of proteoliposomes. In this case, the choice of the filter is crucial. In the specific case of TSPO, whose high affinity drug ligands are hydrophobic compounds, preliminary studies have to be performed to optimize the ligand binding experiments.

1. Choice of the filter: They should retain the proteoliposomes and minimize the radioactive background (mostly due to filter dead volume and nonspecific binding on the filter). Different composition and pore size filters are commercially available, and Table 1 shows the characteristics obtained with TSPO proteoliposomes and its high affinity drug ligand, PK 11195. Proteoliposome retention was performed by filtering a solution and measuring the TSPO intrinsic fluorescence of the filtrate compared to the proteoliposmes solution. The radioactive background was calculated by measuring retained radioactivity in the filters in the absence of proteoliposomes. Table 1 shows that the best filters to measure [^{3}H]PK 11195 binding to RecTSPO are the Whatman GF/C and that background can be reduced by washing the filters with buffer.

Table 1
Different filters tested for measuring radioactive ligand binding to TSPO

Filter	Proteoliposomes retention (% of total)	Background radioactivity (% of total)	
		Nonwashed	Washed
Whatman GF/B	74 ± 13	29.4	7.7
Whatman GF/C	62 ± 12	24.1	2.6
Whatman GF/F	60 ± 15	42.9	14.3
Millipore	86 ± 10	94.3	70.5

For proteoliposome retention by the various filters, 1 ml of a solution containing 0.5–10 μg of RecTSPO was filtered and the protein content of the filtrate (i.e., non-retained on the filter) was measured by intrinsic fluorescence of the RecTSPO using a calibration curve. Results are expressed as percentage of total protein filtered. For ligand retention by the various filters, 0.3 ml of a solution containing cold and [^{3}H] PK 11195 was filtered under the same condition of binding experiments, filters were washed or not two times with 4 ml cold PBS, and radioactivity trapped in the filters was measured in a liquid scintillation counter. Retained radioactivity was expressed as a percentage of total sample radioactivity. Based on the results showed in this table, the GF/C grade glass microfiber filters were chosen to perform RecTSPO binding studies

2. Experimental conditions: The signal-to-background ratio can be optimized adjusting protein concentration and incubation time. Figure 5a shows that signal-to-background ratio increases linearly with RecTSPO amounts. For drug ligands, such as PK 11195, the affinity for RecTSPO is in the nanomolar range; thus, the optimal protein concentration used in the experimental condition of ligand binding should be lower to measure affinity constant. Figure 5b shows the incubation time is also important for such hydrophobic ligand such as PK 11195. Indeed, the binding of PK 11195 to the RecTSPO is fast, but the PK 11195 bound and free decreases with time. The optimal signal-to-background ratio is observed for 5–15-min incubation (see Note 5).
3. Direct ligand binding experiments: Proteoliposomes were incubated in the presence of increasing concentration of [^{3}H] PK 11195 and filtered. For each ligand concentration, the specific binding was calculated as the difference between total binding and nonspecific binding (measured in the presence of a large excess of cold PK 11195). Figure 5c shows that [^{3}H] PK 11195 bound increases with the total PK 11195 concentration and reaches a plateau corresponding to the saturation

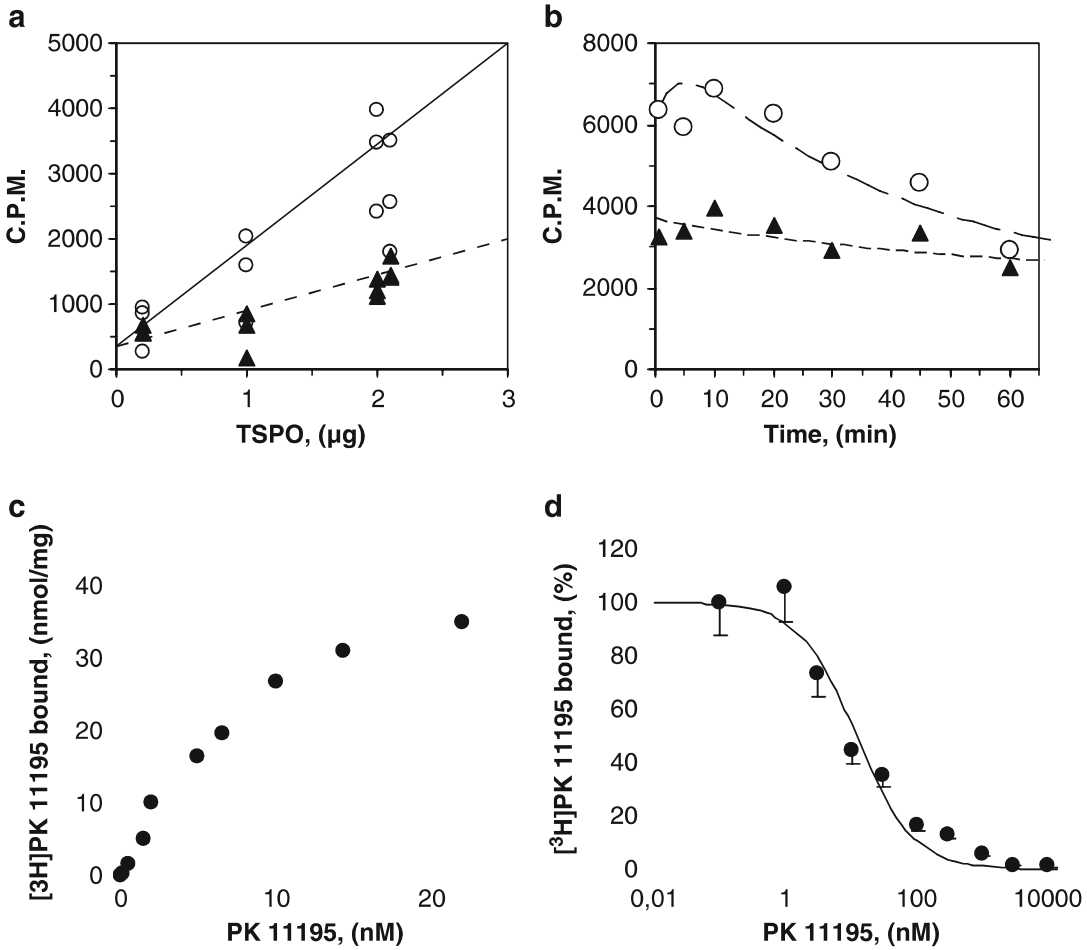


Fig. 5. Control of protein functionality by ligand-binding experiments. Panel (**a**) shows the ligand binding as function of reconstituted RecTSPO quantities incubated for 15 min at 25°C. *Circles* indicate the radioactivity due to total [^{3}H]PK 11195 binding, whereas *triangles* show the nonspecific binding to filters and membranes in the presence of a large excess of nonradioactive PK 11195. Panel (**b**) shows the time course of ligand binding using 2 ng of reconstituted RecTSPO incubated at 25°C. *Circles* and *triangles* indicate the radioactivity due to total PK 11195 bound and nonspecific binding, respectively. Panel (**c**) shows the ligand-binding saturation curve obtained incubating 2 ng of reconstituted RecTSPO for 15 min at 25°C. Binding of [^{3}H]PK 11195 is expressed as nmol of bound ligand per mg of RecTSPO. Panel (**d**) shows [^{3}H]PK 11195 binding of 2 µg of RecTSPO incubated for 30 min at 25°C in the presence of raising concentration of cold PK 11195.

of the RecTSPO binding sites. The binding constants (affinity constant, K_d, and maximal binding value, B_{max}) can be obtained by fitting the saturation curve with the following equation $Y = (B_{max} \times S)/(K_d + S)$, giving a K_d of 6.5 ± 0.5 nM and a B_{max} of 43 ± 8 nmol/mg protein.

4. Competition binding experiments: Proteoliposomes were incubated in the presence of a constant concentration of [^{3}H] PK 11195 and rising concentration of cold PK 11195. The various solutions were filtered and the specific binding was calculated as the difference between total binding and non-specific binding (the asymptotic value observed in the presence of a 1,000-fold excess of cold PK 11195). Figure 5d

shows that [^{3}H]PK 11195 bound decreases with increasing concentration of cold PK 11195. The inhibition constant (IC_{50}) can be obtained by fitting the curve with the following equation $Y = \mathrm{Max} - (\mathrm{Max} \times S)/(K_d + S)$, giving an IC_{50} of 10 ± 2 nM.

3.5. Conclusions

The method presented here permits to reproducibly measure the amount of detergent present in various conditions during the processes leading from the purification, the functional characterization and the structure determination of a membrane protein. It has been characterized for detergent used to purify RecTSPO in SDS or DPC for the reconstitution of this membrane protein in liposomes and the further measurements of ligand binding. The results gained from this method permit to know the detergent at the different steps of sample preparations for functional and structural studies. It permits not only to follow complete detergent removal to form proteoliposomes used for ligand binding experiments but also to control the protein–detergent ratio, which is an important factor in the crystallization process.

4. Notes

1. It should be mentioned that calibration curves adjust to sigmoid function with threshold and saturation levels. The linear part corresponds to a narrow range of detergent concentrations but with an important change in OD giving a very sensitive method in this range of concentration (Figs. 1 and 2). The effect of methanol is small, but calibration curve has to be done taking into account the methanol content in the aliquot from the precipitate membrane protein. Moreover, volume added has to be as small as possible (10–40 µl in 1 ml) to reduce dilution effect.
2. When detergent content was too low to be in the linear part of the calibration curve, a first addition of well-characterized detergent solution was performed to reach the linear region and then an aliquot of the sample is added. The detergent concentration in the sample is finally calculated by difference.
3. Bio-Beads are prepared in aqueous solution, and thus, weighting needs water removal. However, beads also need to be maintained wet to keep their detergent absorption capacity. Real amounts of weighted Bio-Beads might vary from one operator to another since water present with the "wet" Bio-Beads might vary. The best is that each operator performs its own calibration curves.

4. We have no clear explanation for the reasons leading to the formation of different sizes of vesicles when starting from RecTSPO purified in SDS or in DPC. It might be due to different types of interactions between detergent and proteins that either favor or delay lipid–proteins interactions. Different compositions of ternary complexes (protein–lipid–detergent) might be generated as function of the type of used detergent. This might lead to larger or smaller vesicles related to the lipid amounts around the protein.
5. Incubation time should not be extended too long since free PK 11195 diminishes with time. This might be due to non-specific binding of hydrophobic PK 11195 to the glass tube surface.

Acknowledgment

The authors would like to thank Professor V. Papadopoulos for the generous gift of TSPO plasmids, G. Péranzi and A. Letort for their contribution in preliminary experiments. This work was supported by CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and ANR (Agence National pour la Recherche) Grant 06-Blan-0190-01 to JJL.

References

1. Lacapere J-J, Pebay-Peyroula E, Neumann J-M, Etchebest C (2007) Determining membrane protein structures: still a challenge! Trends Biochem Sci 32:259–270
2. Grisshammer R, Tate C (2003) Preface: overexpression of integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta 1610: 1
3. Garavito RM, Ferguson-Miller S (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. J Biol Chem 276:32403–32406
4. LeMaire M, Champeil P, Møller JV (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim Biophys Acta 1508:86–111
5. Pebay-Peyroula E (ed) (2008) Biophysical analysis of membrane protein. Investigating structure and function. Wiley-VCH, Weinheim
6. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res 31:3784–3788
7. Fleischer S, Rouser G, Fleischer B, Casu A, Kritchevski G (1967) Lipid composition of mitochondria from bovin heart, liver, and kidney. J Lipid Res 8:170–180
8. Schiller J, Arnhold J, Benard S, Müller M, Reichl S, Arnold K (1999) Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectroscopy: a methodological approach. Anal Biochem 267:46–56
9. Mokus M, Kragh-Hansen U, Letellier P, le Maire M, Møller JV (1998) Construction and use of a detergent-sensitive electrode to measure dodecyl sulfate activity and binding. Anal Biochem 264:34–40
10. Eriks LR, Mayor JA, Kaplan RS (2003) A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins. Anal Biochem 323:234–241
11. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere J-J, Lindemann P, Noremberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang M-R, Gavish M (2006) Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on

its structure and molecular function. Trends Pharmacol Sci 27:402–409

12. Holloway PW (1973) A simple procedure for removal of triton X-100 from proteins samples. Anal Biochem 53:304–340
13. Rigaud J-L, Mosser G, Lacapere J-J, Olofson A, Levy D, Ranck J-L (1998) Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. J Struct Biol 118:226–235
14. Lacapere J-J, Stokes DL, Olofsson A, Rigaud J-L (1998) Two-dimensional crystallization of Ca-ATPase by detergent removal. Biophys J 75:1319–1329
15. Lacapere J-J, Delavoie F, Li H, Péranzi G, Maccario J, Papadopulos V, Vidic B (2001) Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. Biochem Biophys Res Commun 284:536–541
16. Rigaud J-L, Pitard B, Levy D (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. Biochim Biophys Acta 1231:223–246

Biochimica et Biophysica Acta 1818 (2012) 2791–2800

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Mouse TSPO in a lipid environment interacting with a functionalized monolayer

David Teboul [a], Sylvie Beaufils [b], Jean-Christophe Taveau [c,d], Soria Iatmanen-Harbi [a], Anne Renault [b], Catherine Venien-Bryan [e], Véronique Vie [b], Jean-Jacques Lacapere [a,*]

[a] Unité INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Université Paris 7 Denis Diderot, BP 416, F-75018 Paris, France
[b] Institut de Physique de Rennes, UMR-CNRS 6251 Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France
[c] Univ. Bordeaux, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France
[d] CNRS, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France
[e] Université Pierre et Marie Curie, IMPMC UMR-CNRS 7590, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 January 2012
Received in revised form 11 June 2012
Accepted 26 June 2012
Available online 4 July 2012

Keywords:
Membrane protein
Electron microscopy
Protein structure
Lipid membrane

ABSTRACT

Translocator protein TSPO is a membrane protein highly conserved in evolution which does not belong to any structural known family. TSPO is involved in physiological functions among which transport of molecules such as cholesterol to form steroids and bile salts in mammalian cells. Membrane protein structure determination remains a difficult task and needs concomitant approaches (for instance X-ray- or Electron-crystallography and NMR). Electron microscopy and two-dimensional crystallization under functionalized monolayers have been successfully developed for recombinant tagged proteins. The difficulty comes from the detergent carried by membrane proteins that disrupt the lipid monolayer.

We identified the best conditions for injecting the histidine tagged recombinant TSPO in detergent in the subphase and to keep the protein stable. Reconstituted recombinant protein into a lipid bilayer favors its adsorption to functionalized monolayers and limits the disruption of the monolayer by reducing the amount of detergent. Finally, we obtained the first transmission electron microscopy images of recombinant mouse TSPO negatively stained bound to the lipid monolayer after injection into the subphase of pre-reconstituted TSPO in lipids. Image analysis reveals that circular objects could correspond to an association of at least four monomers of mouse TSPO.

The different amino acid compositions and the location of the polyhistidine tag between bacterial and mouse TSPO could account for the formation of dimer versus tetramer, respectively. The difference in the loop between the first and second putative transmembrane domain may contribute to distinct monomer interaction, this is supported by differences in ligand binding parameters and biological functions of both proteins.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Translocator protein (18 kDa, TSPO), previously known as the peripheral-type benzodiazepine receptor [1] is a transmembrane protein that is evolutionarily conserved from bacteria to humans [2,3]. TSPO is expressed in almost all mammalian tissues and is mostly located in the outer mitochondrial membrane [3]. TSPO is involved in a wide range of physiological functions and the best established molecular one is the translocation of cholesterol from the cytosol to the mitochondrial matrix, the first step of steroids or bile salts formation in steroidogenic tissues and liver, respectively [4]. However, little is known about its three-dimensional atomic structure, oligomeric state, and its molecular mechanism. Initial hydropathy analysis suggested five transmembraneous domains for TSPO that were confirmed by topological studies [5]. Further, biophysical studies of peptides encompassing putative transmembrane domains and recombinant mouse TSPO demonstrated the five-helix fold of TSPO [6]. More recently, the first three-dimensional structure of TSPO from *R. sphaeroides* was obtained by electron cryomicroscopy of helical crystals [7]. From a functional point of view, the minimal unit for mammalian TSPO seems to be a monomer since recombinant mouse TSPO binds high affinity drug ligand PK 11195 and cholesterol [8]. However, several data suggest that TSPO is associated with other proteins either from the cytosol or from the mitochondrial membranes in the steroid biosynthesis for instance [9,10]. Moreover, it has been suggested that, in response to reactive

Abbreviations: PK 11195, N-butan-2-yl-1-(2-chlorophenyl)-N-methylisoquinoline-3-carboxamide; TSPO, 18 kDa translocator protein; DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOGS-NTA-Ni, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentanyl)iminodiacetic acid)succinyl] (Nickel salt); DMPC, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DMPE, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3phosphoethanolamine; BAM, Brewster Angle Microscopy; TEM, Transmission Electron Microscopy; BB, BioBead; PPIX, Protoporphyrin IX; PET, Positron Emission Tomography

* Corresponding author. Tel.: +33 01 57 27 74 80; fax: +33 01 57 27 74 85.
E-mail address: jean-jacques.lacapere@inserm.fr (J.-J. Lacapere).

0005-2736/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbamem.2012.06.020

oxygen species TSPO can form covalent polymers which can have functional properties [11]. Another possibility is the transient association of TSPO to form non-covalent polymers and this would be an explanation for the dimers observed in the tubular crystals of TSPO from bacteria [7]. Nevertheless, differences between species cannot be excluded. Thus, characterization of structural differences between mammalian and bacteria TSPO is an important issue.

Structural studies of membrane protein are intricate and several approaches are possible [12]. Among them, electron microscopy can be used to study membrane protein organization within the artificial membranes either by two-dimensional crystallization in solution or by reorganization of adsorbed proteins under a lipid monolayer at the air/water interface [13–15]. The latter has the advantage of concentrating tagged recombinant proteins under functionalized monolayers and in some case, allows to analyze isolated particles. The main difficulty to solve is the solubilizing effect of the detergent associated to the protein. Indeed, the detergent is necessary to stabilize the recombinant membrane protein, but it also solubilizes the lipid monolayer which is actually the matrix on which the protein in solution will interact. In this paper, we present a new strategy to overcome this problem by injecting pre-reconstituted membrane protein in lipid bilayer under the functionalized lipid monolayer. In this study, we show for the first time an image of a mammalian TSPO which suggests a different oligomeric state compared to bacterial orthologue described in a previous work using image analysis from an electron micrograph. Mammalian and bacterial TSPO have different number and composition of amino acids, their recombinant forms have a polyhistidine tag located in the C-terminus versus N-terminus, respectively. These differences may account for different polymeric associations. The loop between the first and the second putative transmembrane domains may be crucial in protein–protein association since it has been proposed to participate in bacterial TSPO dimer formation. In addition distinct ligand binding and transported molecules have been reported between mammalian and bacterial TSPO, giving different biological functions for these two proteins.

2. Material and methods

Lipids, detergent and protein: all lipids used in this study were purchased from Avanti Polar Lipids. Monolayer lipid ligand and diluting lipid are 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentanyl) iminodiacetic acid)succinyl] (Nickel salt) later named DOGS-NTA-Ni, and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC). These lipids were prepared in an organic solvent mixture chloroform/methanol (v/v) and stored at −20 °C. Lipids used for proteoliposomes were 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE) mixed in organic solvent at a DMPC/DMPE ratio of 9/1 (w/w), then solvent was removed and lipids resuspended in water and stored at −20 °C.

Detergent: sodium dodecylsulfate (SDS) was purchased from Sigma-Aldrich (France).

TSPO protein: His-tagged mouse recombinant TSPO was overexpressed in *E. coli* bacteria and purified in SDS as described [16,17].

TSPO reconstitution: DMPC/DMPE lipid mixture was added to mouse recombinant TSPO purified in SDS to full solubility and SDS was removed by incubation with Bio-beads SM2 (BioRad, France) as described [8,18].

SDS removal was followed using a homemade protocol previously described [18].

TSPO intrinsic fluorescence was performed using a PTI spectrophotometer (Serlabo Technology, France) equipped with a stirrer and a temperature-controlled cell. Excitation and emission wavelengths were set at 290 and 340 nm, respectively. The slits were set at 2 and 4 nm for excitation and emission, respectively. Experiments were performed at room temperature, 20 °C.

TSPO high affinity ligand binding was measured using proteoliposomes and radioactive [^{3}H] PK 11195 as described [18]. The Kd value for PK 11195 was determined by curve fitting using the following equation:

$$\text{PK 11195 bound to TSPO protein}(\%) = 100 * [\text{PK 11195}]/(Kd + [\text{PK 11195}])$$

In our data, 100% of binding was measured to be equal to 25 ± 2 nmol PK 11195 bound per milligram of TSPO.

Monolayers: monolayers were prepared in a 8 mL Teflon trough (S = 20 cm^2) filled with buffer (50 mM, Tris–HCl at pH 8). Surface pressure was measured using the Wilhelmy method (Nima Technology, Coventry, UK).

Ellipsometry measurements were carried out with an in-house automated ellipsometer [19,20] in a "null ellipsometer" configuration [21]. He–Ne laser beam (λ = 632.8 nm, Melles Griot) was polarized with a Glan–Thompson polarizer and reflected on the surface of the trough (incidence angle of 52.12°). After reflection on the liquid surface, the laser light passed through a λ/4 retardation plate, a Glan–Thompson analyzer and a photomultiplier. The analyzer angle, multiplied by two, yielded the value of the ellipsometric angle (Δ) i.e., the phase difference between parallel and perpendicular polarization of the reflected light. The laser beam probed a surface of 1 mm^2 and a depth in the order of 1 μm. Initial values of the ellipsometric angle (Δ_0) and surface tension of pure buffer solutions were recorded on the subphase for at least half an hour. These values have been subtracted from all data presented below. Values of Δ were stable and recorded every 4 s with a precision of ± 0.5°.

Brewster Angle Microscopy (BAM) [22] observations were carried out with a device mounted on the ellipsometer apparatus, allowing the visualization of the surface during protein adsorption. The interface is illuminated at the air–water Brewster incidence (53.1°) with He\Ne laser (λ = 632.8 nm, Melles-Griot, France) and the reflected beam is captured by a CCD video camera giving an image of the monolayer. The contrast is due to a change in the reflexion coefficient of the polarized incident light on the surface due to a change in the refractive index of the interface upon adsorption of molecules. If the molecules are not adsorbed at the interface, the grey level is equal to the background level and the picture is dark. On contrary, when the molecules are adsorbed at the interface, the induced modification of the refractive index changes the reflexion coefficient of the incident polarized light and the gray level is higher than the background level in all places where molecules are present. Hence, domains appear as bright regions on a dark background while a homogeneous layer appears as a homogeneous bright picture. Our device does not allow to quantify the exact amount of molecules present at the interface but the comparison between gray levels gives an indication on the relative amount of molecules. The resolution of the system is a few μm.

Transmission Electron Microscopy (TEM): solution samples were deposited on carbon-coated grids (400 mesh, EMS); monolayers were picked up by placing a carbon-coated grid either on the surface of the monolayer through or on top of the well for several minutes. In all cases, grids were blotted with filter paper and negatively stained with 2% (w/w) uranyl acetate for 30 s. Images were recorded with a JEOL 1200EX operated at 80 kV or a FEI Philips CM120 operating at 100 kV.

Image analysis: selected electron micrographs were digitized with a Nikon film scanner (Super cool scan 9000 ED) at 2000 pixels/in. Digitized images were first treated to increase contrast and to perform object picking using IMOD program [23]. Then, subimages were aligned rotationally and translationally generating an averaged image. Briefly, all images were compared by cross correlation, rotated and translated to get the best match using classical protocol available in SPIDER program [24].

Finally, correspondence analysis was followed by hierarchical ascendant classification using SPIDER program [25] leading to homogeneous

classes which then were compared to classes obtained by neural network classification using the Xmipp program [26].

3. Results and discussion

3.1. Monolayer stability

An amount of 6 nmol of DOGS-NTA-Ni/DOPC 1/6 mol/mol in organic solvent (chloroform/methanol 1/1 v/v) was spread at the interface air/Tris–HCl (50 mM, pH = 8) at an initial surface pressure of 26 mN/m. This value of surface pressure ensures that the monolayer maintains its fluidity allowing the subsequent reorganization of the complex lipid protein at the interface after protein injection [27]. The corresponding value of the ellipsometric angle is around 6.5°, as shown in Fig. 1A and B before SDS injection, which is typical for lipid monolayers with this composition [28]. As purified recombinant TSPO (at 15×10^{-3} g/L) is associated with SDS at 45×10^{-3} g/L, the stability of the lipid monolayer is tested in the presence of pure SDS, for two SDS subphase concentrations (60×10^{-3} g/L and 160×10^{-3} g/L) well below the micellar concentration which is 1000×10^{-3} g/L.

Fig. 1A shows that the injection of SDS, at a subphase concentration of 60×10^{-3} g/L induces a biphasic kinetics: a fast increase of the surface pressure of up to 40 mN/m, followed by a slow continuous decrease of ca. 4 mN/m over 6 h after SDS injection. The ellipsometric angle follows a similar transient increase followed by an overall decrease of 1.5° over 6 h after SDS injection, reaching finally the value of 5°. An injection of SDS at a concentration three times higher (160×10^{-3} g/L) but still lower than the micellar concentration induces the same effects, with however, somewhat faster kinetics (Fig. 1B). A fast increase of the surface pressure up to 41 mN/m is followed by a slow decrease of roughly 6 mN/m over 6 h after injection, correlated in the same time with a decrease of the ellipsometric angle of 2.5° leading to a final value of 4° after 7 h.

Both effects result from the initial insertion of SDS in the lipid monolayer, inducing a fast increase in the surface pressure. Then, SDS progressively replaces the lipids resulting in the decrease of the ellipsometric angle since the SDS molecule is smaller than the lipid molecule as reflected by the difference of the ellipsometric angle for a pure lipid monolayer (6.5°) compared to a pure SDS monolayer (1.8°) as shown by the dashed line on Fig. 1A and B.

These results provide information on lipid monolayer stability in the presence of SDS: a perturbing effect of SDS on DOGS-NTA-Ni/DOPC cannot be excluded (even at the lowest SDS concentrations) resulting in the progressive removal of lipid from the interface to the subphase.

However, these results also show that a high amount of ligand lipid remains at the interface for 6 h after SDS injection. Indeed, the ellipsometric value of this layer (around 5-6°) remains closer to the value expected for a pure lipid than for a pure SDS monolayer (6.5° and 1.8°, respectively). Hence, it can be considered that the removal of lipids from the interface towards to the subphase, due to SDS, is a phenomenon which takes place in a period of several hours and has little impact on the lipid monolayer stability on the first hour. Hence, if TSPO is injected during the first hour after the lipid monolayer spreading, it will interact with a dense lipid monolayer.

3.2. Comparison between injection of TSPO/SDS and of TSPO/SDS/lipids

23 μL of the binary mixture—histidine tag recombinant TSPO (5.23 g/L) purified in SDS (15.7 g/L)—was injected in the buffer subphase (8 mL), below the functionalized monolayer DOGS-NTA-Ni/DOPC prepared under the same conditions as described above, with an initial surface pressure of 25 mN/m and an ellipsometric angle of approximately 6.5°. The dilution factor is then 348.8 and the final concentrations of TSPO and SDS are respectively, equal to 15×10^{-3} g/L and 45×10^{-3} g/L. As in the case of pure SDS injection, a fast increase of the surface pressure of up to 36 mN/m is observed, followed after ca. 4 h by stabilization around 32 mN/m (Fig. 2A). The corresponding ellipsometric kinetics shows a scattered behavior around 6° during the first hour, corresponding to the sharp increase of the surface pressure, followed by stabilization around 6° over 7 h after injection.

The Brewster Angle Microscopy (BAM) observation of the interface at 13 h after injection, (shown in Fig. 2B; See Material and methods for the interpretation of BAM pictures) reveals the heterogeneity of the surface at the micrometric scale. This interfacial layer was subsequently transferred to electron microscopy grids. The observations of the grids with Transmission Electron Microscopy (TEM) show the presence of TSPO on the grids and therefore highlights the adsorption of TSPO to the monolayer (Fig. 2C).

Hence, the high increase in surface pressure from 25 mN/M to 32 mN/m and the constant value around the initial value of 6° of the ellipsometric angle suggest that TSPO is inserted in the lipid monolayer, which is not a favorable configuration to obtain organized structures at the interface.

A control experiment, where the monolayer is made only of DOPC (no DOGS-NTA-Ni present) and the TSPO is injected as described above does not show any heterogeneity on BAM pictures (data not shown). In this control case, the kinetics is similar to that previously observed in Fig. 1A when pure SDS is injected: a fast increase of surface pressure and of ellipsometric angle, followed by a slow decrease of these two parameters. These results suggest that TSPO does not adsorb to the monolayer in the absence of ligand lipid and that the pure

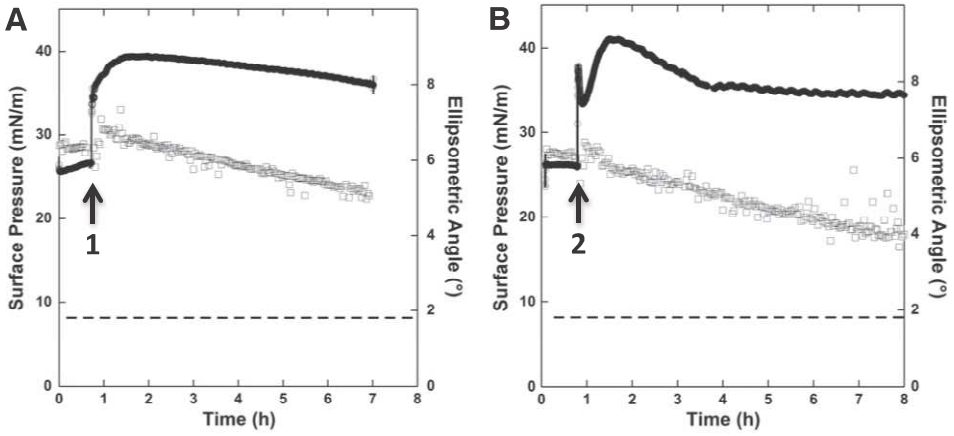


Fig. 1. Effect of SDS on DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer. Surface pressure (dark circles) and ellipsometric angle (open square) of DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer are recorded while SDS is injected in the subphase beneath the lipid monolayer. A) Final SDS concentration of 60×10^{-3} g/L (injection in arrow 1) and B) final SDS concentration of 160×10^{-3} g/L (injection in arrow 2). In both graphs, dashed line corresponds to the ellipsometric angle of the pure SDS saturated monolayer.

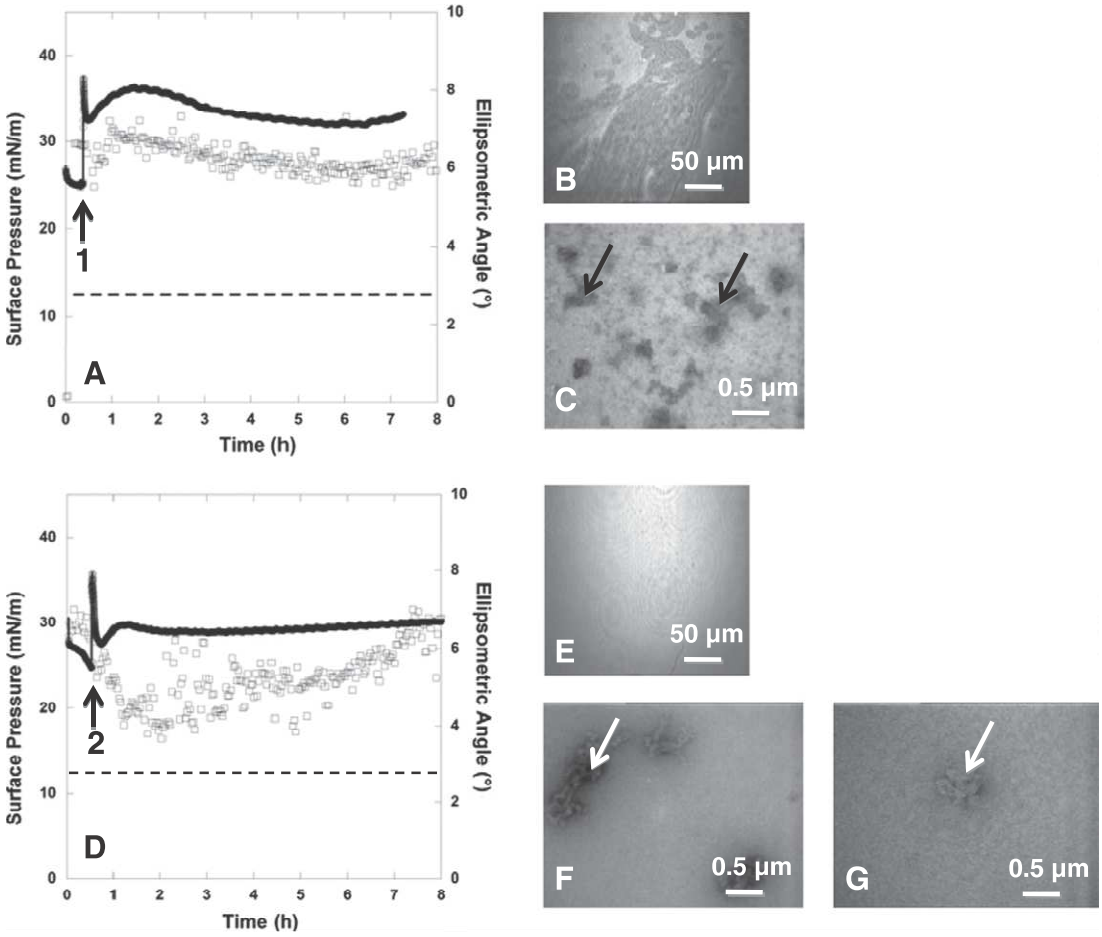


Fig. 2. Adsorption of TSPO injected beneath DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer alone or in presence of lipids. A) Surface pressure (dark circles) and ellipsometric angle (open square) are recorded when a binary mixture of final concentration TSPO (15×10^{-3} g/L) and 45×10^{-3} g/L SDS (injection in arrow 1) is injected in the subphase below the DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer. B) BAM picture taken 13 h after binary mixture injection, showing bright domains attributed to protein adsorption. C) TEM picture taken 13 h after binary mixture injection (TSPO, SDS), showing stained patches corresponding to adsorbed TSPO "aggregates" (white arrow). D) Surface pressure and ellipsometric angle are recorded when a ternary mixture of a final concentration TSPO (15×10^{-3} g/L), lipids (10.5×10^{-3} g/L DMPC/DMPE) and SDS (160×10^{-3} g/L) (injection in arrow 2) is injected in the subphase below DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer. E) BAM picture taken 17 h after injection of the ternary melt (TSPO, lipids and SDS), the bright homogeneous image indicates that the amount of adsorbed molecules is higher than in the previous (binary mixtures F,G) TEM pictures taken 17 h after injection, showing worm like stained patches (F, white arrow) and sheets surrounded by a dense material corresponding to proteolipidic objects. On both graphs (A and D), the dotted line shows the ellipsometric angle of a SDS monolayer formed from a solution at 2 g/L.

DOPC monolayer and the DOPC/DOGS-NTA-Ni monolayer have the same behavior towards SDS.

In order to increase the amount of protein adsorbed to the monolayer, a possibility is to inject a mixture of TSPO/SDS and lipids, since the best environment for membrane proteins is lipids. Hence, 120 µL of the ternary mixture TSPO (1 g/L), SDS (10 g/L) and lipids (0.7 g/L DMPC/DMPE) was injected in the buffer subphase (8 mL), below the functionalized monolayer DOGS-NTA-Ni/DOPC prepared under the same conditions as described above with an initial surface pressure of 25 mN/m and an ellipsometric angle of approximately 6.5°. The dilution factor is then 67.7 and the final concentration for each constituent of the ternary mixture is: TSPO (15×10^{-3} g/L), SDS (160×10^{-3} g/L) and lipids (10.5×10^{-3} g/L DMPC/DMPE).

In that case, the surface pressure shows a smaller initial increase than previously, reaching a value of 30 mN/m that remains stable over all the kinetics. During the same time, the ellipsometric angle is highly scattered, it decreases from 6.5° to an average value of 4.5° during the initial first 2 h after the injection, probably due to the removal of lipid from the interface by SDS, and subsequently shows an increase of 2.5° (i.e. up to 7°) following 6 h (Fig. 2D). The moderate increase of surface pressure from 25 mN/m to 30 mN/m and the higher relative increase of the ellipsometric angle from 4.5° to 7° suggest that TSPO molecules injected in a ternary mixture TSPO/SDS/(DMPC/DMPE) are adsorbed beneath the lipid monolayer in a higher amount compared to TSPO injected in a binary mixture TSPO/SDS. This is confirmed by the homogeneous and brighter BAM picture compared to Fig. 2B, taken 17 h after injection (Fig. 2E; See Material and methods for the interpretation of BAM pictures). Furthermore, TEM images reveal the presence of small proteolipidic objects (Fig. 2F and G). However, these objects were not organized at the interface. The smaller increase of surface pressure also shows that, although the final SDS concentration in the ternary mixture is higher (160×10^{-3} g/L against 45×10^{-3} g/L) than in previous experiments with identical TSPO concentration (15×10^{-3} g/L), the presence of DMPC/DMPE lipids reduces the impact of SDS on lipid monolayer. Indeed, the increase of surface pressure is smaller, probably due to a smaller insertion of SDS in the lipid monolayer. This suggests that SDS interacting also with the DMPC/DMPE lipids reduces the free SDS in the subphase.

These results show that the presence of lipids (DMPC/DMPE) with the TSPO protein in the injection promotes the adsorption of TSPO as proteolipidic objects at a functionalized monolayer (DOGS-NTA-Ni/DOPC). Thus, TSPO tends to remain in solution when

associated with SDS alone and, on the contrary, to be preferentially located at the functionalized monolayer when associated with lipids and SDS in ternary complexes. This could be explained by the combined effects of DMPC/DMPE and TSPO that, by reducing the concentration of free SDS, influence the action of SDS on the lipid monolayer. We hypothesize that SDS could hinder the interaction between lipid ligand and TSPO either by masking the NTA-Ni of lipid or the histidine tag of TSPO, whereas the presence of DMPC/DMPE lipids could favor this interaction by reducing the free SDS interaction.

We never observed large bilayers under the monolayer, suggesting that the fusion between several proteolipidic objects does not occur and might be prevented by the presence of too much of SDS. The lower concentration of SDS could promote the fusion process or the adsorption of larger preformed objects. We suggest that this could be achieved by controlling the SDS concentration in the TSPO-DMPC/DMPE lipids mixture before the injection.

3.3. Use of pre-reconstituted proteolipidic objects

It has been previously described that detergent removal from a mixture of protein, lipids and detergent leads to the formation of proteoliposomes with different intermediate states including sheets and batonnets [29–31]. Controlling how the detergent is removed from the solution allows to obtain a proteolipidic object of a different size [32]. This controlled removal can be achieved using hydrophobic Bio-beads™ that adsorb detergents [33].

Fig. 3A shows that SDS removal from a mixture of TSPO, lipids (DMPC/PE) and SDS can be controlled by the amount of Bio-beads added in the medium. At a Bio-beads to SDS ratio of 17 w/w (corresponding to 100 mg added to 5 mL solution containing 1.2 mg/mL SDS), 75% of the detergent is removed in less than 1 h. Complete detergent removal can be achieved either by increasing the initial amount of Bio-beads added (circles in Fig. 3A, final Bio-beads to SDS ratio of 24), or by a second addition (100 mg at the arrow in Fig. 3A, final Bio-beads to SDS ratio of 33). Detergent removal around TSPO and its substitution by lipids induces a large change in intrinsic fluorescence of the protein (Fig. 3B). This process is much slower than the detergent removal suggesting a structural reorganization of the protein. Previous data using circular dichroism showed that the secondary structure of TSPO was slightly different in the presence of various detergents surrounding the protein [34]. This transition seems important for the functionality of TSPO since TSPO reincorporation in liposomes enables the measurement of high affinity drug ligand binding, PK 111195 (Fig. 3C) as previously described [8]. Affinity constant (6±3 nM) that can be deduced by data fitting with saturation curve, is close to that measured in vivo [1,3].

We incubated the ternary monodispersed mixture of TSPO (1 g/L), SDS (10 g/L) and lipids (0.7 g/L DMPC/DMPE) for 1 h in the presence of two different Bio-beads to SDS ratios (3.6 w/w and 20 w/w, named BB3.6 and BB20, respectively). Following incubation, TEM images taken for each specimen allow to characterize the kind of reconstitution state of TSPO in DMPC/DMPE. The initial state, before the addition of Bio-beads is shown in Fig. 4A. No structure was observable since in the absence of Bio-beads, the mixture contains ternary complexes of TSPO–lipids–detergent too small to be seen. Two different degrees of reconstitution of TSPO into DMPC/DMPE were reached upon addition of the two Bio-beads ratios: BB3.6 was giving intermediate state where proteolipidic sheets are seen (Fig. 4B) whereas when BB20 was used, proteoliposomes were observable (Fig. 4C).

As described in the previous paragraph, the injection of the ternary preparations in the 8 mL buffer in the trough was expected to dilute of a factor of 67.7 the pre-reconstituted objects. Therefore, we tested the consequence of this dilution on these objects formed upon incubation with a Bio-beads ratio of 20 w/w.

Fig. 4D shows a MET observation of the same preparation but after a dilution of 67.7 corresponding to the dilution induced by the injection in the larger volume of the trough. Note that proteolipidic objects are still present although fewer in number and with a smaller size.

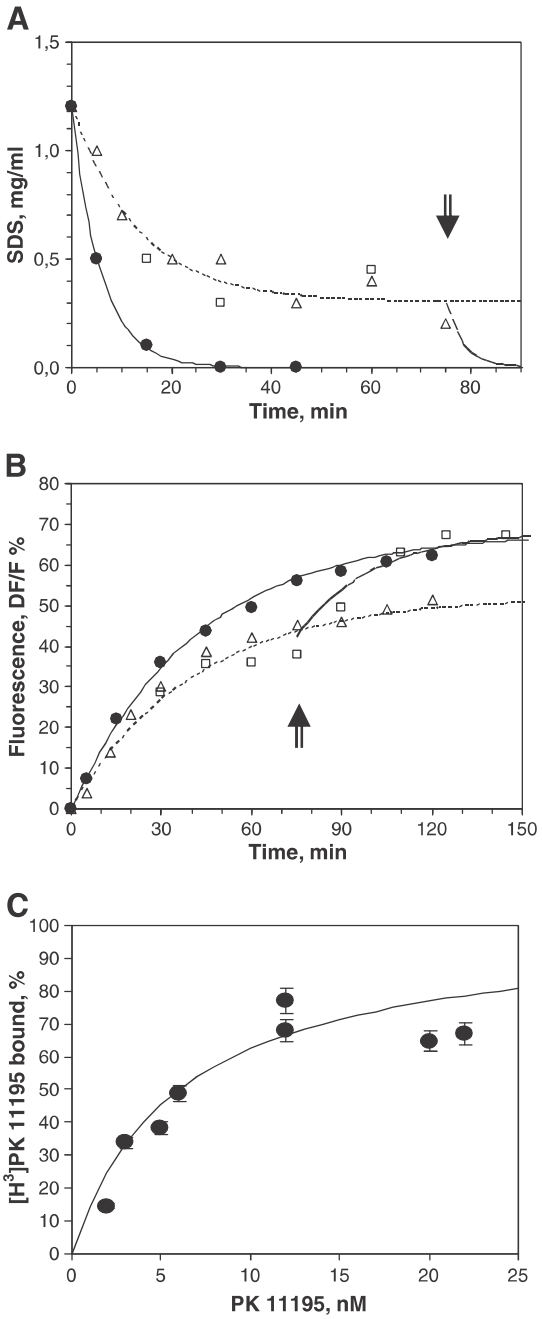


Fig. 3. (A) Time course of SDS removal by Bio-bead addition. At time zero, 100 mg (open symbols) or 145 mg (closed symbols) of Bio-beads was added to a mixture of TSPO (0.1 mg/mL), lipids (0.1 mg/mL (open triangles and closed circles) or 0.5 mg/mL (open squares) DMPC/DMPE, 9/1) and SDS (1.2 mg/mL). A second addition of 100 mg of Bio-beads was performed (arrow) 75 min after the first addition to completely remove SDS from the mixture of TSPO and lipids (open squares). (B) Time course of intrinsic fluorescence changes. A sample of the different mixtures of TSPO, lipids and SDS (same symbols as in panel A) was taken at different times of incubation with Bio-beads and fluorescence measured with excitation and emission wavelengths set at 290 nm and 340 nm, respectively. Data were plotted as a ratio of fluorescence changes upon initial fluorescence. (C) PK 11195 ligand binding saturation curve. Proteoliposomes of mouse TSPO reconstituted in DMPC/PE at a lipid over protein ratio of 5 (w/w) were incubated in the presence of increasing concentration of radioactive PK 11195, filtered and radioactivity retained in the filter measured. Non-specific binding measured with an excess of non-radioactive PK 111195 was subtracted. Affinity constant (Kd = 6±3 nM) was estimated by fitting the curve with saturation curve described in Material and methods.

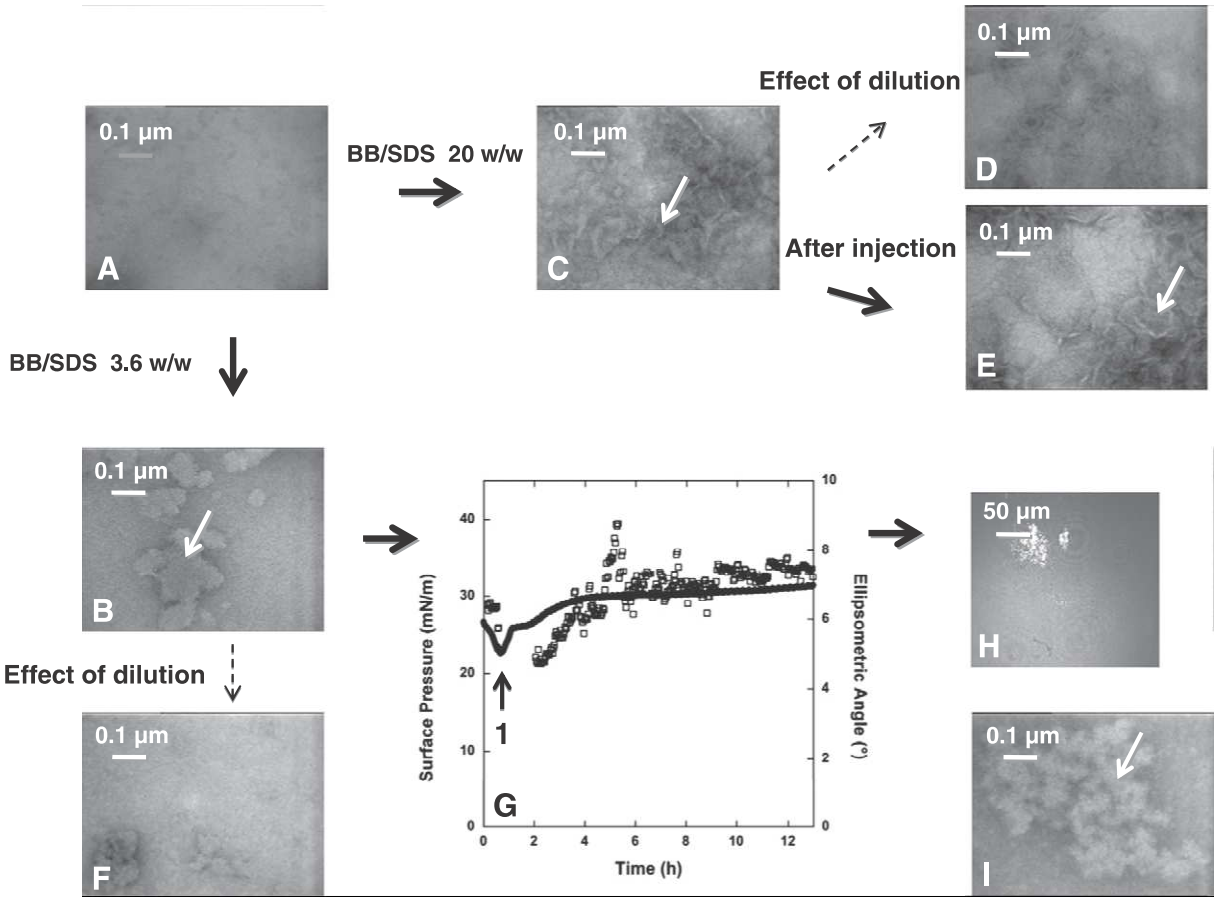


Fig. 4. Effect of preliminary elimination of SDS with Bio-beads on the adsorption of TSPO associated with lipids on DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer. A) TEM picture of the ternary monodispersed mixture TSPO/SDS/(DMPC/DMPE) showing homogenous background with no object clearly visible, B,C) TEM pictures of the same ternary mixture as in A after reduction of SDS content following incubation for 1 h with different Bio-beads to SDS ratios (3.6 and 20 w/w, named BB3.6 and BB20, respectively) leading to intermediate reconstituted state (B) characterized by grey objects in the background corresponding to sheets (arrows), and proteoliposomes (C) characterized by rounded objects with white edge (arrows), D,F) TEM pictures showing the effect of the dilution (×67.7) occurring on the ternary mixture obtained after incubation at BB3,6 and BB20 when injected in the trough. E) TEM picture of grids taken at the interface after injection in the trough of ternary mixture incubated at BB20 showing the presence of vesicles (arrow). G) Surface pressure (dark circles) and ellipsometric angle (open square) of DOGS—NTA—Ni/DOPC monolayer recorded with time when BB3.6 solution shown in (B) is injected in the subphase (injection in arrow 1), H) BAM picture taken 18 h after injection. The bright homogeneous picture indicates that adsorbed molecules are present at the interface and I) TEM picture of grids taken at the interface after18 h following the injection of ternary mixture incubated at BB3.6. Patches (arrow) are more dense and larger than those observed in the initial solution injected (B) and many more are present compared to those observed upon dilution (4F).

The injection of the BB20 reconstituted solution (shown in Fig. 4C) below the DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer induces minor modifications of the surface pressure (except for an initial increase which is relaxed after 2 h) and induces an increase of the ellipsometric angle of 1.5°, revealing the fixation of molecules from the subphase at the interface (the data are not shown since the kinetics has the same shape that the one shown below on Fig. 4G).

TEM observations from the interface transferred to grids after 20 h of incubation (Fig. 4E) show vesicles resembling to those seen in Fig. 4C. Accordingly, the proteoliposomes are spread at the interface after injection, but these conditions do not favor the redistribution of TSPO on the lipid monolayer.

At this stage, we show that the injection of reconstituted complex with a Bio-beads ratio of 20 w/w does not lead to organized TSPO structures at the lipid interface. Then we decreased the Bio-beads ratio and we incubated the TSPO ternary mixture during 1 h with BB3.6 giving an intermediate reconstituted state.

Then, 120 µL of this preparation was injected into the 8 mL subphase buffer, below the functionalized monolayer DOGS-NTA-Ni/DOPC prepared under the same conditions as described above with an initial surface pressure of 25 mN/m and an ellipsometric angle of approximately 6.5°. Thus, the injected solution is diluted by a factor of 67.7. The final concentration of TSPO and DMPC/DMPE is the same as previously (respectively 15×10^{-3} g/L and 10.5×10^{-3} g/L) while SDS concentration has been lowered by the presence of Bio-beads and dilution. The amount of SDS is not know precisely, but can be estimated to be close to 0.1 g/L i.e. below critical micellar concentration (this estimation was obtained by an interpolation at 1 h from Fig. 3A and dilution factor).

Fig. 4B shows the preparation, using TEM, before injection into the trough (similar to conditions described Fig. 4A). Fig. 4F shows the same preparation but at a dilution of 67.7 mimicking the dilution that occurs when injected in the larger volume trough. No vesicles were detected, suggesting that a lower ratio of Bio-beads does not remove as much SDS as in the case of BB20, thereby preventing the formation of proteoliposomes. Indeed, large detergent removal is needed to get the closure of vesicules containing proteins and thus formation of proteoliposomes. The injection of the BB3.6 solution (shown Fig. 4B) under the DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer (Fig. 4G arrow 1) shows a similar kinetic to that observed for the BB20 preparation after injection to the subphase. The surface pressure increases slowly up to 30 mN/m while the ellipsometric angle decreases during 1 h after injection and increases subsequently up to 3.5 in the following 10 h before stabilization. This observation supports the idea that patches of TSPO–lipid–detergent from the subphase binds to the monolayer at the air–water interface. BAM pictures taken 18 h after

injection (Fig. 4H) shows a homogeneous bright background, revealing that the binding of these patches to the lipid monolayer is rather homogeneous. However, BAM pictures do not allow to identify the nature of the adsorbed objects. TEM observations of the monolayer transferred onto electron microscopic grids after 18 h incubation after injection (Fig. 4I) reveal the presence of objects of the same nature as those present in the preparation ternary mixture (TSPO/DMPC-DMPE/SDS) before injection (Fig. 4B), i.e. patches. Furthermore, we can see that patches of sheets form larger objects than in solution forming patchwork-like structure. This could be explained by the fact that the dilution reduces the detergent concentration which induces fusion-aggregation of adsorbed patches.

These results show that the controlled removal of SDS before injection of the ternary mixture (TSPO/DMPC-DMPE/SDS) in the subphase under a functionalized monolayer prevents the insertion of the SDS into the monolayer. The TSPO reconstituted into lipid bilayers (intermediate states of proteoliposome formation) can interact with the Ni^{2+}—lipid monolayer through their His-tag, then the proteins bound to the lipids are free to reorganize at the air/lipid interface.

Similar experiments were done using Teflon wells of 4 mm diameter and containing a very small amount of solution, about 50 μL. These smaller wells are designed to allow easy transfer of the monolayer onto an electron microscopic grid and allow to use only a small amount of protein [13–15].

The same preparation as before (ternary mixture of TSPO (1 g/L), SDS (10 g/L) and lipids (0.7 g/L DMPC/DMPE) incubated with BB3.6 as described above was injected at the same final TSPO concentration TSPO (15×10^{-3} g/L) under a DOGS-NTA-Ni/DOPC monolayer previously stabilized at the interface. The system was incubated overnight with a glass cover over the wells in order to prevent the evaporation of the liquid contained in the Teflon well.

A TEM picture of grids after transfer of the monolayer (Fig. 5A) shows the binding of the TSPO complex to the lipid layer and the reorganization of the adsorbed molecules into the interfacial layer of

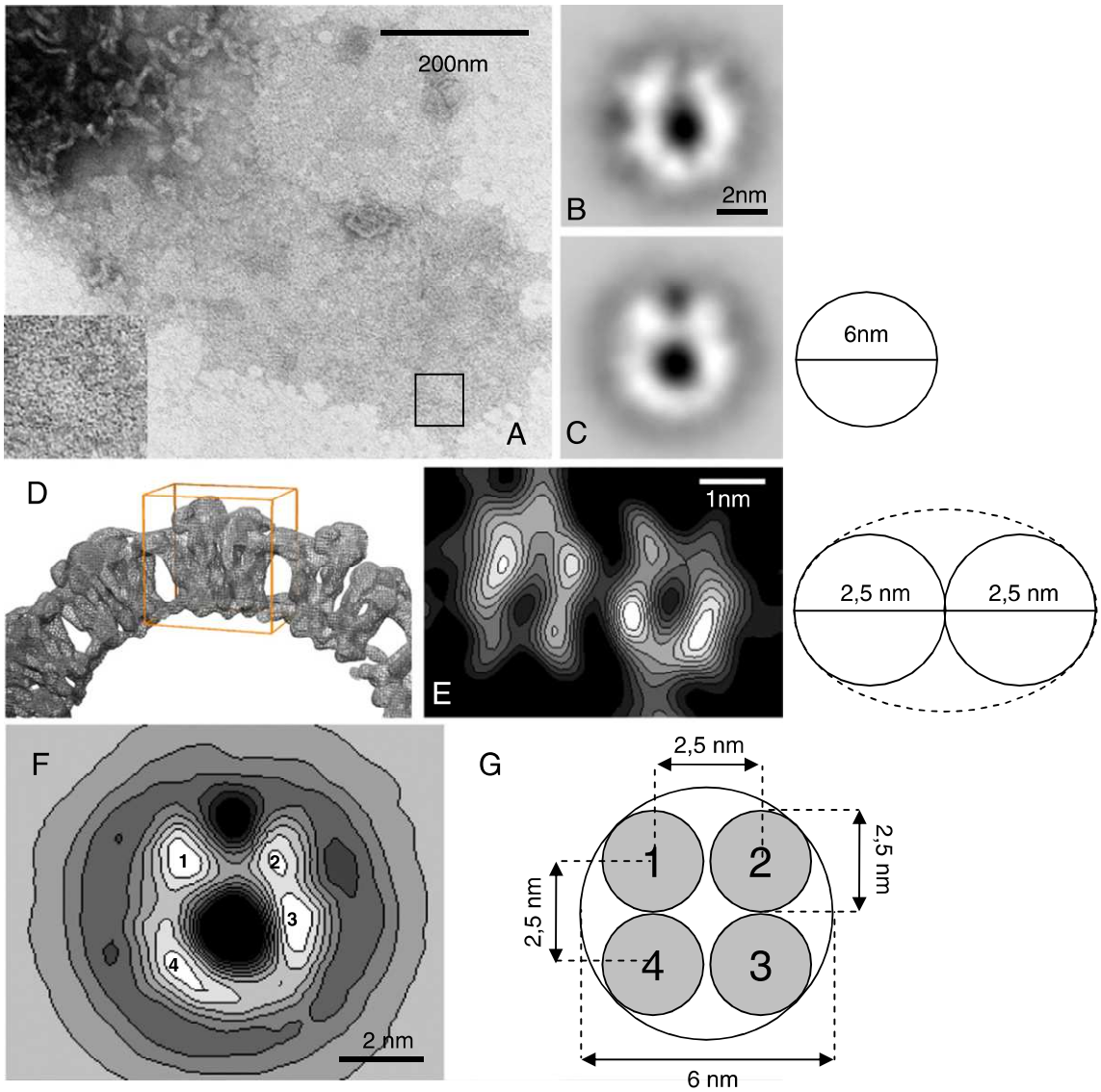


Fig. 5. Images of TSPO. (A) TEM picture of intermediate state of mouse TSPO and DMPC/DMPE injected under DOGS-NTA-Ni/DOPC. Insert shows enlargement of the particles contained in the black box. (B,C) Averages of two subclasses obtained after correspondence analysis containing respectively 114 and 403 images (B and C, respectively). The scheme on the right of panel C depicts overall size of average image of mouse TSPO which has a diameter of 6 nM. (D) Cryo TEM density map of bacterial TSPO [6] used to compute projection of a dimer (E) corresponding to the densities enclosed by the orange box shown in (D). The two monomers of the bacterial TSPO are presented as contour level with a "hole" in the middle. Scheme on the right of panel E, depicts the overall size of the dimer of bacterial TSPO represented by two circles (2.5 nm diameter) enclosed in an ellipse. (F) contour level of average image of mouse TSPO (C) with four internal density peaks indicated by numbers (1 to 4). (G) Scheme depicting the putative location of four mouse TSPO monomers in the average image (F). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the BB3.6 reconstituted state at the interface. The center of the picture shows a region enriched in TSPO (dark grey area). Intermediate reconstituted states are present in the upper right corner (worm-like object on a black background). The brightest region (light grey), at the edge of the picture is the carbon alone, without any bound TSPO. Fig. 5A, inset reveals numerous circular objects with a black dot in the center. 838 individual particles were manually picked. These particles were aligned in rotation and translation followed by correspondence analysis (SPIDER program, [25]) leading to 800 particles correctly aligned among the 838 selected. Homogeneous classes were generated according to the procedure described under Material and methods [26,27] Only two classes contained enough particles to get reliable images and to continue the image analysis (Fig. 5B and C). The diameter of these averaged particles is about 6 nm and is greater than the 3.5 nm previously measured for a monomer of TSPO protein in reconstituted proteoliposomes using freeze fracture [9]. However, a value of 7 nm was measured for dimers of mouse TSPO in the same work [9]. A slightly smaller value was measured for bacterial dimers of TSPO from two dimensional tubular crystals studied in cryo TEM [6].

As part of our comparison, we used the calculated 3D density map of bacterial TSPO calculated from cryo-TEM images (emdb entry: 1698). The latter appears as a cylinder formed of stacked disks containing each twelve TSPO homo-dimers. Fig. 5D shows an orange box including one dimer—windowed from an isolated disk. The selected area was subsequently projected in 2D in order to compare it with our 2D class averages. Cryo-TEM images allow observing the full transmembrane TSPO densities whereas negatively stained TEM images usually allow the visualization of the stain corresponding to accessible parts of the proteins. Projecting all the densities corresponding to the cryo TEM map enclosed in the orange box leads to the contour-level image shown in Fig. 5E. The dissymmetry observed between the two monomers in the dimer is explained by the curvature of the disk (due to the cylindrical nature of the organization of the complex) therefore, the projection on a plane of each monomer is not identical. However, both monomers clearly show a horseshoe-like shape lacking density in the center that are much smaller (2.5 nm) than our averages lacking also density in the center (6 nm). Moreover, the bacterial dimer (Fig. 5E) has an ovoid shape (see scheme on the right of Fig. 5E) whereas our averages show more round shapes (see scheme on the right of Fig. 5C) with no central density. Thus, our average images of mouse TSPO cannot be a monomer, neither a dimer.

Isodensity contour level of average image presented in panel C of Fig. 5 reveals the presence of four densities (numbered in Fig. 5F) suggesting a possible tetramer for mouse TSPO. Careful analysis of this image shows that distances between these densities (2.5 nm) are compatible with those observed between two monomers of bacterial TSPO confirming the possible presence of four monomers. A global scheme mimicking a tetramer (Fig. 5G) has overall dimensions (6 nm) in agreement with the arrangement of four monomers within a circle. However, we cannot conclude about the internal arrangement of the four monomers, since mouse TSPO monomers appear as a single density. Obviously, negative staining does not allow to reach high resolution like cryo-TEM, where two densities can be observed for bacterial TSPO (Fig. 5E).

The four observed densities can be obtained by several monomer arrangements (16 in total). Some combinations can be excluded since mouse TSPO should interact via its his-tag with the functionalized

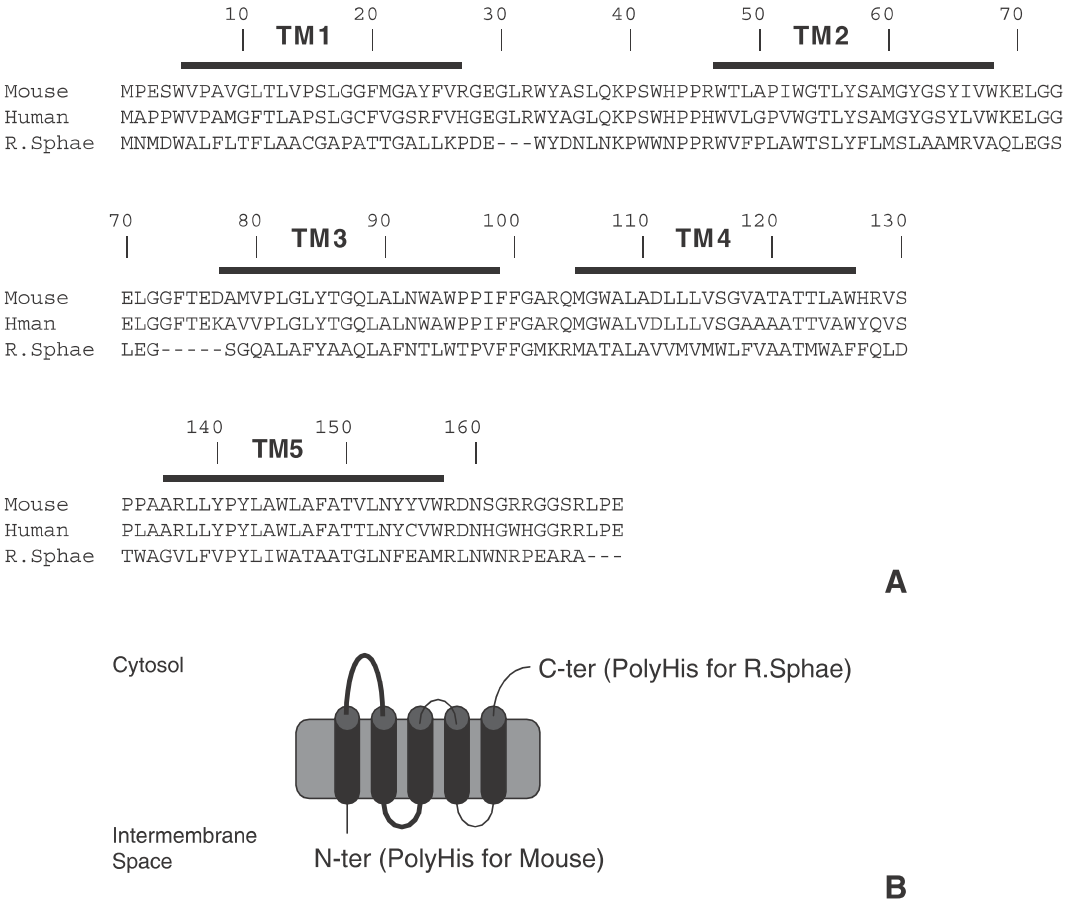


Fig. 6. (A) Alignment of mouse, human and *Rhodobacter sphaeroides* TSPO. Bars above the sequences represent putative transmembrane domains (labeled TM1 to TM5). (B) Scheme of the predicted topology of TSPO. Loops with thick dark black lines show the main differences in sequence between mammalian and bacterial TSPO. Position of the polyhistidine tag for mouse and bacterial *Rhodobacter sphaeroides* are located.

monolayer. Up and down orientations of the TSPO in the lipid bilayer where the protein is inserted are possible because of sample preparation. Indeed, insertion of membrane protein into liposomes occurs with both orientations and in our case we have injected TSPO in a prereconstituted state below the monolayer. A consequence will be that in this case only some TSPO would interact by its his-tag with the monolayer. We cannot exclude that different types of oligomeric states of TSPO coexist in our samples preventing the formation of large two-dimensional crystals in agreement with recent studies showing that the oligomeric state of a membrane protein can depend of its environment [35]. Finally, our particles show the first images of mouse TSPO and even though the tetramer is most compatible with our data, further work is needed to fully distinguish between a tetramer or dimer of dimers.

Bacterial and mammalian TSPO have different amino acid sequences (Fig. 6A). TSPO from *Rhodobacter sphaeroides* has only 158 residues, whereas mouse or human TSPO has 169. The C-terminus and two loops of bacterial TSPO are reduced compared to mammalian TSPO (Fig. 6B). It is not clear if such differences have functional consequences and many points can be discussed. (i) The loop connecting the first two transmembrane helices of bacterial TSPO has been described to participate in tetrapyrrol transport [36], but molecular mechanism involved in the transport remains unclear. (ii) Mammalian TSPO is also able to transport protoporphyrin (PPIX), a tetrapyrrol [1], but PPIX is a competitive inhibitor of PK 11195 binding [1,36]. (iii) It has been proposed that PK 11195 binding involves cytosolic loops of mammalian TSPO [16] and acts as an "activator" of cholesterol transport [1,3]. However, bacterial TSPO seems unable to bind PK 11195, this might be due to the reduction of loop connecting the first two transmembrane helices (Fig. 6).

Finally, it has been demonstrated that this loop connecting the first and the second transmembrane helices might be involved in the dimerization process of bacterial TSPO [37]. We may hypothesize that the addition of 3 residues in this loop as well as some other in the loop connecting the second and the third transmembrane helices might be at the origin of the different states of oligomerization observed between bacterial [7,37] and mammalian TSPO [11,38].

4. Conclusion

In this work, the method applied to produce intermediate reconstituted state of TSPO in the DMPC/DMPE by lowering the detergent concentration seems to favor adsorption of proteins to functionalized monolayers avoiding deleterious effects of detergents on the lipid monolayer.

In addition, single particle analysis of TSPO protein observed by TEM reveals a circular pattern for mouse TSPO distinct to the bacterial orthologue where dimers have an ovoid shape. Image analysis suggests the presence of four monomers for mammalian TSPO distinct to dimer for bacterial TSPO. Several evidences have been reported for a functional dimer for bacteria [7,37] whereas monomers and polymers have been described for functional units for mammalian species [8,11]. In vivo, studies with Positron Emission Tomography (PET) ligands have given significantly different results that have analyzed as single or multiple sites, mixed-affinity binding site, allosteric effects [39] suggesting that atomic structure determination of TSPO remains a goal to reach for describing its structure and function.

Acknowledgements

We thank Olivier Lambert for helpful discussions.

This work was supported by grants from the French National Center for Scientific Research (CNRS), the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the French National Agency for Research (ANR BLAN-0190-01 to JJL), the French Ministry of Research (Universités Denis Diderot-Paris7, Pierre et Marie Curie-Paris6, Victor Segalen-Bordeaux and Rennes1).

References

[1] V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte, T.B. Knudsen, J.-J. Lacapère, P. Lindemann, M.D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M.R. Zhang, M. Gavish, Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function, Trends Pharmacol. Sci. 27 (8) (2006) 402–409.
[2] J. Fan, M.B. Rone, V. Papadopoulos, Translocator protein 2 is involved in cholesterol redistribution during erythropoiesis, J. Biol. Chem. 284 (44) (2009) 30484–30497.
[3] M. Gavish, I. Bachman, R. Shoukrun, Y. Katz, L. Veenman, G. Weisinger, A. Weizman, Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor, Pharmacol. Rev. 51 (1999) 629–650.
[4] J.-J. Lacapère, V. Papadopoulos, Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis, Steroids 68 (7–8) (2003) 569–585.
[5] E. Joseph-Liauzun, P. Delmas, D. Shire, P. Ferrara, Topological analysis of the peripheral benzodiazepine receptor in yeast mitochondrial membranes supports a five-transmembrane structure, J. Biol. Chem. 273 (4) (1998) 2146–2152.
[6] S. Murail, J.C. Robert, Y.M. Coïc, J.M. Neumann, M.A. Ostuni, Z.X. Yao, V. Papadopoulos, N. Jamin, 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 1778 (6) (2008) 1375–1381.
[7] V.M. Korkhov, C. Sachse, J.M. Short, C.G. Tate, Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals, Structure 18 (6) (2010) 677–687.
[8] J.-J. Lacapère, F. Delavoie, H. Li, G. Péranzi, J. Maccario, V. Papadopoulos, B. Vidic, Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor, Biochem. Biophys. Res. Commun. 284 (2) (2001) 536–541.
[9] M.B. Rone, J. Liu, J. Blonder, X. Ye, T.D. Veenstra, J.C. Young, V. Papadopoulos, Targeting and insertion of the cholesterol-binding translocator protein into the outer mitochondrial membrane, Biochemistry 48 (29) (2009) 6909–6920.
[10] L. Veenman, Y. Shandalov, M. Gavish, VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis, J. Bioenerg. Biomembr. 40 (3) (2008) 199–205.
[11] F. Delavoie, H. Li, M. Hardwick, J.C. Robert, C. Giatzakis, G. Péranzi, Z.X. Yao, J. Maccario, J.-J. Lacapère, V. Papadopoulos, In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding, Biochemistry 42 (15) (2003) 4506–4519.
[12] J.-J. Lacapère, E. Pebay-Peyroula, J.M. Neumann, C. Etchebest, Determining membrane protein structures: still a challenge! Trends Biochem. Sci. 32 (6) (2007) 259–270.
[13] C. Vénien-Bryan, F. Balavoine, B. Toussaint, C. Mioskowski, E.A. Hewat, B. Helme, P.M. Vignais, Structural study of the response regulator HupR from *Rhodobacter capsulatus*. Electron microscopy of two-dimensional crystals on a nickel-chelating lipid, J. Mol. Biol. 274 (1997) 687–692.
[14] D. Levy, M. Chami, J.L. Rigaud, Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy, FEBS Lett. 504 (3) (2001) 187–193.
[15] S. Courty, L. Lebeau, L. Martel, P.F. Lenne, F. Balavoine, W. Dischert, O. Konovalov, C. Mioskowski, J.F. Legrand, C. Vénien-Bryan, Two-dimensional crystallization of a histidine-tagged protein on monolayers of fluidity-enhanced Ni2+-chelating lipids, Langmuir 18 (2002) 9502–9512.
[16] H. Li, V. Papadopoulos, Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern, Endocrinology 139 (12) (1998) 4991–4997.
[17] J.C. Robert, J.-J. Lacapère, Bacterial overexpressed membrane proteins: an example: the TSPO, Methods Mol. Biol. 654 (2010) 29–45.
[18] M.A. Ostuni, S. Iatmanen, D. Teboul, J.C. Robert, J.-J. Lacapère, Characterization of membrane protein preparations: measurement of detergent content and ligand binding after proteoliposomes reconstitution, Methods Mol. Biol. 654 (2010) 3–18.
[19] B. Berge, A. Renault, Ellipsometry study of 2D crystallization of 1-alcohol monolayers at the water surface, EPL 21 (1993) 773–777.
[20] C. Vénien-Bryan, P.F. Lenne, C. Zakri, A. Renault, A. Brisson, J.F. Legrand, B. Berge, Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy, Biophys. J. 74 (1998) 2649–2657.
[21] R.M.A. Azzam, N.M. Bashara, in: North-Holland Pub. Co. (Ed.), Ellipsometry and polarized light, 1977, p. 529.
[22] S. Henon, J. Meunier, Microscope at the Brewster angle, direct observation of the first order phase transitions in monolayers, Rev. Sci. Instrum. 62 (1991) 936–939.
[23] J.R. Kremer, D.N. Mastronarde, J.R. McIntosh, Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD, J. Struct. Biol. 116 (1996) 71–76.
[24] J. Frank, M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj, A. Leith, SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields, J. Struct. Biol. 116 (1996) 190–199.
[25] J. Franck, Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies: visualization of biological molecules in their native state, In: Second ed., Oxford University Press, 2006, pp. 91–115.
[26] C.O.S. Sorzano, R. Marabini, J. Velazquez-Muriel, J.R. Bilbao-Castro, S.H.W. Scheres, J.M. Carazo, A. Pascual-Montano, XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy, J. Struct. Biol. 148 (2004) 194–204.
[27] L. Lebeau, F. Lach, C. Vénien-Bryan, A. Renault, J. Dietrich, T. Jahn, M.G. Palmgren, W. Kühlbrandt, C. Mioskowski, Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer, J. Mol. Biol. 308 (4) (2001) 639–647.

[28] L. Chièze, V.M. Bolanos-Garcia, M. Pinot, B. Desbat, A. Renault, S. Beaufils, V. Vié, Fluid and condensed ApoA-I/phospholipid monolayers provide insights into ApoA-I membrane insertion, J. Mol. Biol. 410 (1) (2011) 60–76.
[29] M.T. Paternostre, M. Roux, J.L. Rigaud, Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate, Biochemistry 27 (8) (1988) 2668–2677.
[30] J.L. Rigaud, M.T. Paternostre, A. Bluzat, Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin, Biochemistry 27 (8) (1988) 2677–2688.
[31] J.L. Rigaud, D. Lévy, Reconstitution of membrane proteins into liposomes, Methods Enzymol. 372 (2003) 65–86.
[32] J.-J. Lacapère, D.L. Stokes, A. Olofsson, J.L. Rigaud, Two-dimensional crystallization of Ca-ATPase by detergent removal, Biophys. J. 75 (3) (1998) 1319–1329.
[33] J.L. Rigaud, G. Mosser, J.-J. Lacapere, A. Olofsson, D. Levy, J.L. Ranck, Bio-beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins, J. Struct. Biol. 118 (3) (1997) 226–235.
[34] N. Jamin, J.-J. Lacapere, Cicular dichroism: folding and conformational changes of membrane proteins, In: in: E. Pebay-Peyroula (Ed.), Biophysical Analysis of Membrane Proteins, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weiheim, 2008, pp. 243–258.
[35] M.R. Dorwart, R. Wray, C.A. Brautigam, Y. Jiang, P. Blount, S. Aureus, MscL is a pentamer in vivo but of variable stoichiometries in vitro: implications for detergent-solubilized membrane proteins, PLoS Biol. 8 (12) (2010) e1000555.
[36] M.A. Ostuni, G. Péranzi, R.A. Ducroc, M. Fasseu, B. Vidic, J. Dumont, V. Papadopoulos, J.-J. Lacapere, Distribution, pharmacological characterization and function of the 18 kDa translocator protein in rat small intestine, Biol. Cell 101 (10) (2009) 573–586.
[37] A.A. Yeliseev, S. Kaplan, TspO of rhodobacter sphaeroides. A structural and functional model for the mammalian peripheral benzodiazepine receptor, J. Biol. Chem. 275 (8) (2000) 5657–5667.
[38] N. Boujrad, B. Vidic, V. Papadopoulos, Acute action of choriogonadotropin on Leydig tumor cells: changes in the topography of the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor, Endocrinology 137 (12) (1996) 5727–5730.
[39] A.M. Scarf, M. Kassiou, The translocator protein, J. Nucl. Med. 52 (5) (2011) 677–680.

Metadata of the chapter that will be visualized online

Book Title		Membrane Proteins Production for Structural Analysis
Chapter Title		Structural Studies of TSPO, a Mitochondrial Membrane Protein
Copyright		Springer Science+Business Media New York 2014
Corresponding Author	Family name	**Lacapere**
	Particle	
	Given name	**Jean-Jacques**
	Suffix	
	Division	Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3
	Organization	INSERM UMRS 773, Université Paris Diderot-Paris 7
	Address	BP 416, 75018 Paris, France
	email	jean-jacques.lacapere@inserm.fr
Author	Family name	**Iatmanen-Harbi**
	Particle	
	Given name	**Soria**
	Suffix	
	Division	Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3
	Organization	INSERM UMRS 773, Université Paris Diderot-Paris 7
	Address	BP 416, 75018 Paris, France
Author	Family name	**Senicourt**
	Particle	
	Given name	**Lucile**
	Suffix	
	Division	Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3
	Organization	INSERM UMRS 773, Université Paris Diderot-Paris 7
	Address	BP 416, 75018 Paris, France
Author	Family name	**Lequin**
	Particle	
	Given name	**Olivier**
	Suffix	
	Division	Laboratoire des BioMolécules
	Organization	CNRS UMR 7203, Ecole Normale Supérieure, Université Pierre et Marie Curie
	Address	75005 Paris, France
Author	Family name	**Tekely**
	Particle	
	Given name	**Piotr**
	Suffix	
	Division	Laboratoire des BioMolécules
	Organization	CNRS UMR 7203, Ecole Normale Supérieure, Université Pierre et Marie Curie
	Address	75005 Paris, France
Author	Family name	**Purusottam**
	Particle	
	Given name	**Rudra N.**
	Suffix	
	Division	Laboratoire des BioMolécules
	Organization	CNRS UMR 7203, Ecole Normale Supérieure, Université Pierre et Marie Curie
	Address	75005 Paris, France
Author	Family name	**Hellwig**

	Particle	
	Given name	**Petra**
	Suffix	
	Division	Laboratoire de Spectroscopie Vibrationnelle et Électrochimie des Biomolécules
	Organization	CNRS UMR 7177, Université de Strasbourg
	Address	67000 Strasbourg, France
Author	Family name	**Kriegel**
	Particle	
	Given name	**Sebastien**
	Suffix	
	Division	Laboratoire de Spectroscopie Vibrationnelle et Électrochimie des Biomolécules
	Organization	CNRS UMR 7177, Université de Strasbourg
	Address	67000 Strasbourg, France
Author	Family name	**Ravaud**
	Particle	
	Given name	**Stephanie**
	Suffix	
	Division	Institut de Biologie Structurale (IBS)
	Organization	Université de Grenoble Alpes, CNRS, CEA DSV
	Address	38027 Grenoble, France
Author	Family name	**Juillan-Binard**
	Particle	
	Given name	**Céline**
	Suffix	
	Division	Institut de Biologie Structurale (IBS)
	Organization	Université de Grenoble Alpes, CNRS, CEA DSV
	Address	38027 Grenoble, France
Author	Family name	**Peyroula**
	Particle	
	Given name	**Eva Pebay**
	Suffix	
	Division	Institut de Biologie Structurale (IBS)
	Organization	Université de Grenoble Alpes, CNRS, CEA DSV
	Address	38027 Grenoble, France
Author	Family name	**Papadopoulos**
	Particle	
	Given name	**Vassilios**
	Suffix	
	Division	Department of Medicine, The Research Institute of the McGill University Health Center
	Organization	McGill University
	Address	H3H 2R9 Montreal, QC, Canada

Abstract

The 18-kDa translocator protein (TSPO) is evolutionarily conserved from bacteria to humans. TSPO expression has been observed in essentially all mammalian tissues, with a preferential localization in the outer mitochondrial membrane. TSPO is involved in various physiological functions. The evidence suggests that TSPO may function in different protein complexes. In mammalian cells, the best-characterized activity of TSPO is the transport of cholesterol from the cytosol to the mitochondrial matrix, where cholesterol is converted to a precursor of steroids or bile salts. No atomic structure of TSPO is currently available. TSPO does not belong to any known membrane protein structural family. It has five transmembrane domains containing α-helices that are involved in the transport of cholesterol. Cytosolic loops are involved in ligand binding and the activation of transport. It has been suggested that TSPO could form homopolymers within heteropolymer complexes. Because of the low native abundance of TSPO, production of recombinant TSPO is a first step for any structural study. In this chapter, we present the current understanding of TSPO overexpression studies in bacteria, purification of functional TSPO, and different approaches to solve TSPO structure.

Author's Proof !

Chapter 14
Structural Studies of TSPO, a Mitochondrial Membrane Protein

Jean-Jacques Lacapere, Soria Iatmanen-Harbi, Lucile Senicourt, Olivier Lequin, Piotr Tekely, Rudra N. Purusottam, Petra Hellwig, Sebastien Kriegel, Stephanie Ravaud, Céline Juillan-Binard, Eva Pebay Peyroula and Vassilios Papadopoulos

14.1 Introduction

The 18-kDa translocator protein (TSPO) is a membrane protein (MP) that was previously named peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) because of the binding of diazepam, a well-known benzodiazepine, which was initially observed in the kidney (Papadopoulos et al. 2006). Numerous studies show that this MP is involved in various physiological functions such as the transport of cholesterol, which is a rate-limiting step in the synthesis of steroids and bile salts (Lacapere and Papadopoulos 2003). TSPO transports cholesterol through the external mitochondrial membrane and transfers it to the inner membrane with the assistance of the outer mitochondrial membrane voltage-dependent anion channel (VDAC) and ATPase family AAA domain-containing protein 3 (ATAD3 A), which is an integral MP of the inner mitochondrial membrane crossing the outer

J.-J. Lacapere (✉) · S. Iatmanen-Harbi · L. Senicourt
Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, INSERM UMRS 773, Université Paris Diderot-Paris 7, BP 416, 75018, Paris, France
e-mail: jean-jacques.lacapere@inserm.fr

O. Lequin · P. Tekely · R. N. Purusottam
Laboratoire des BioMolécules, CNRS UMR 7203, Ecole Normale Supérieure, Université Pierre et Marie Curie, 75005, Paris, France

P. Hellwig · S. Kriegel
Laboratoire de Spectroscopie Vibrationnelle et Électrochimie des Biomolécules, CNRS UMR 7177, Université de Strasbourg, 67000, Strasbourg, France

S. Ravaud · C. Juillan-Binard · E. P. Peyroula
Institut de Biologie Structurale (IBS), Université de Grenoble Alpes, CNRS, CEA DSV, 38027, Grenoble, France

V. Papadopoulos
Department of Medicine, The Research Institute of the McGill University Health Center, McGill University, H3H 2R9, Montreal, QC, Canada

I. Mus-Veteau (ed.), *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*,
DOI 10.1007/978-1-4939-0662-8_14, © Springer Science+Business Media New York 2014

UNCORRECTED PROOF

Book ID: 310972_1_En ChapterID: 14 Dispatch Date: 25/04/2014 ProofNo: 1

Author's Proof !

membrane (Rone et al. 2012; Papadopoulos and Miller 2012). TSPO associates within different protein complexes that perform different physiological functions (Papadopoulos et al. 2006; Rone et al. 2012; Issop et al. 2012). TSPO is highly conserved from bacteria to humans (Fan et al. 2012), but the ancestral role of TSPO is unknown because bacteria do not have cholesterol and do not synthesize steroids. Recent work shows that bacterial TSPO can rapidly catalyze porphyrin degradation (Ginter et al. 2013), which is consistent with previous reports that TSPO can bind porphyrins (Verma et al. 1987; Wendler et al. 2003; Yeliseev and Kaplan 1999)

Few structural studies have been performed on TSPO, in contrast to the numerous physiological and physiopathological studies. Hydrophobicity plots show that all members of the TSPO family have five conserved hydrophobic domains (Fan et al. 2012). Initial analysis suggested a hemi-membrane insertion of the protein because of the small number of amino acids that were predicted to be involved in hydrophobic domains (Bernassau et al. 1993). Further topological analysis using epitope insertion clearly showed that TSPO has a five-transmembrane (TM) structure (Joseph-Liauzin et al. 1998). Synthetic TSPO peptides encompassing the five putative TM domains were studied by ^{1}H-NMR (nuclear magnetic resonance) and that revealed helical structures (Murail et al. 2008). The five helix-fold structure of TSPO was confirmed by circular dichroism (CD) of the entire protein (Jamin and Lacapere 2007; Murail et al. 2008) and also was observed in two-dimensional (2D) crystals of bacterial TSPO (Korkhov et al. 2010). The first atomic model of TSPO was based on the only available MP structure at the time, the G protein-coupled receptor (GPCR) family member protein bacteriorhodopsin (Bernassau et al. 1993). It is now well established that TSPO belongs to another MP family (Punta et al. 2012), but no structure of any member of this protein family has been obtained. Thus, the determination of the atomic structure of TSPO remains a challenge.

Because of its low natural abundance and association with various protein complexes (Papadopoulos et al. 2006; Rone et al. 2012; Issop et al. 2012), purification of large amounts of TSPO from native cells is a very challenging task. Therefore, overexpression of recombinant TSPO in heterologous cells was developed to produce the large amounts of protein required for structural and functional studies (Sprengel et al. 1989; Parola et al. 1991; Riond et al. 1991; Garnier et al. 1994; Joseph-Liauzin et al. 1998). There are currently many different approaches to obtain the 3D structures of MPs (Lacapere et al. 2007; Lacapere 2010). In this chapter, we present an overview of the structural results obtained for TSPO. A crucial step in structure determination is the stabilization of protein conformation. This can be achieved by different strategies such as protein engineering (Tate and Schertler 2009) and by adding specific ligands. TSPO has different ligands endowed with different functions, including ligands that are transported such as cholesterol or protoporphyrin, and ligands that activate or inhibit transport such as the isoquinoline PK 11195 (Papadopoulos et al. 2006).

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

14.2 Production, Purification, and Characterization of Recombinant TSPO

14.2.1 Overexpression System

Among the various overexpression systems for producing large quantities of recombinant proteins, bacteria are an easy and inexpensive system when the intracellular abundance of recombinant protein is low. However, heterologous expression systems in bacteria often result in recombinant protein accumulation in inclusion bodies (IBs). This can be prevented by the expression of a fusion protein that directs the insertion of the recombinant MP into the bacterial membrane. Early work on TSPO overexpression was performed using a construct fused to maltose-binding protein (Garnier et al. 1994). In some cases, the formation of IBs can be advantageous because the overexpressed protein will not affect bacterial growth (Mouillac and Baneres 2010).

AQ2

14.2.2 Plasmid Choice

Expression plasmids that contain a poly-histidine tag are very efficient for protein purification using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The presence of a proteolytic cleavage site between the protein and the tag enables the tag to be removed so that it will not interfere with functional protein domains. The location of the tag at the N- or C-terminus is important, because the latter enables purification of full-length recombinant protein. However, the C-terminus of TSPO is involved in cholesterol binding; thus, a tag in this region alters TSPO function (Li and Papadopoulos 1998).

The first TSPO complementary DNA (cDNA) used for the expression of recombinant protein was that of rat (Sprengel et al. 1989), which was followed by other mammalian TSPO cDNAs such as that of bovine (Parola et al. 1991), human (Riond et al. 1991), and mouse (Garnier et al. 1994). Most of the data presented in this chapter were obtained with mouse TSPO (Fig. 14.1). It has to be reminded that there is a very high degree of identity between all mammalian TSPOs (Fan et al. 2012). Nonmammalian TSPOs, such as those of bacteria (Yeliseev and Kaplan 1995; Ginter et al. 2013) and plants (Guillaumot et al. 2009), also have been overexpressed.

14.2.3 Protein Extraction

When an overexpressed protein is incorporated into IBs, it can be extracted using strong denaturing agents such as urea or guanidinium chloride or strong detergents like sodium dodecyl sulfate (SDS). Protein extraction with SDS is an advantage

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

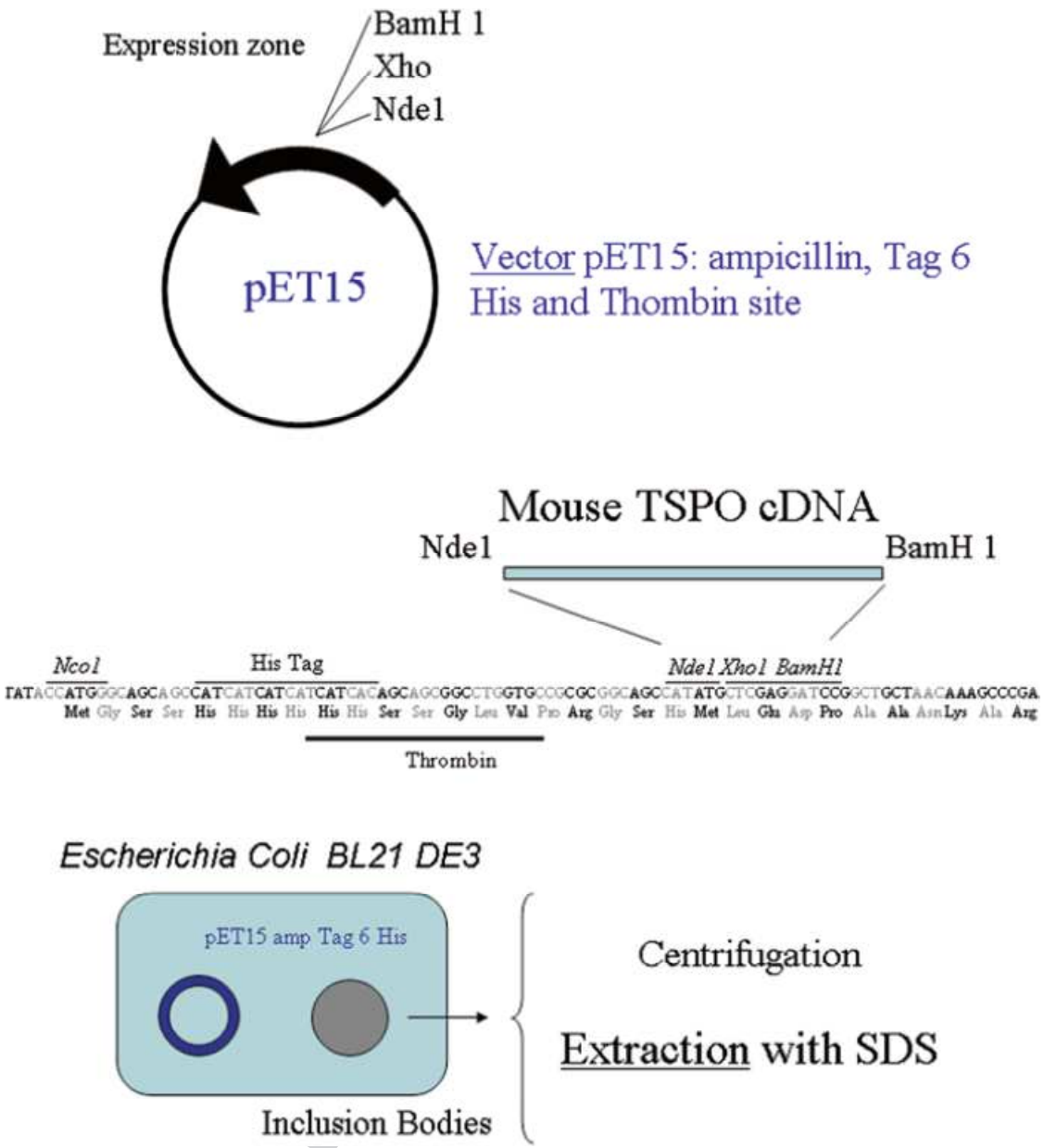


Fig. 14.1 *TSPO* overexpression. Mouse *TSPO* cDNA was inserted in a *pET15* vector containing T7 promoter, ampicillin resistance, six histidine tags, and a thrombin cleavage site. Plasmid was transfected into *Escherichia coli BL21 DE3* bacteria. IPTG induction of *TSPO* overexpression leads to accumulation of *TSPO* in inclusion bodies, which were collected by centrifugation after bacterial disruption

for MPs, which are often purified with detergent. However, SDS also is used by biochemists for denaturation of proteins in SDS-PAGE gels.

IBs are storage repositories for waste in bacteria, and they contain high levels of nucleotides. Protein extraction with SDS yields a viscous solution that can be treated with benzonase to increase the fluidity of the solution. An absorption spectrum of this solution shows a peak at approximately 260 nm that is characteristic of nucleotides (Fig. 14.2).

UNCOR

Author's Proof !

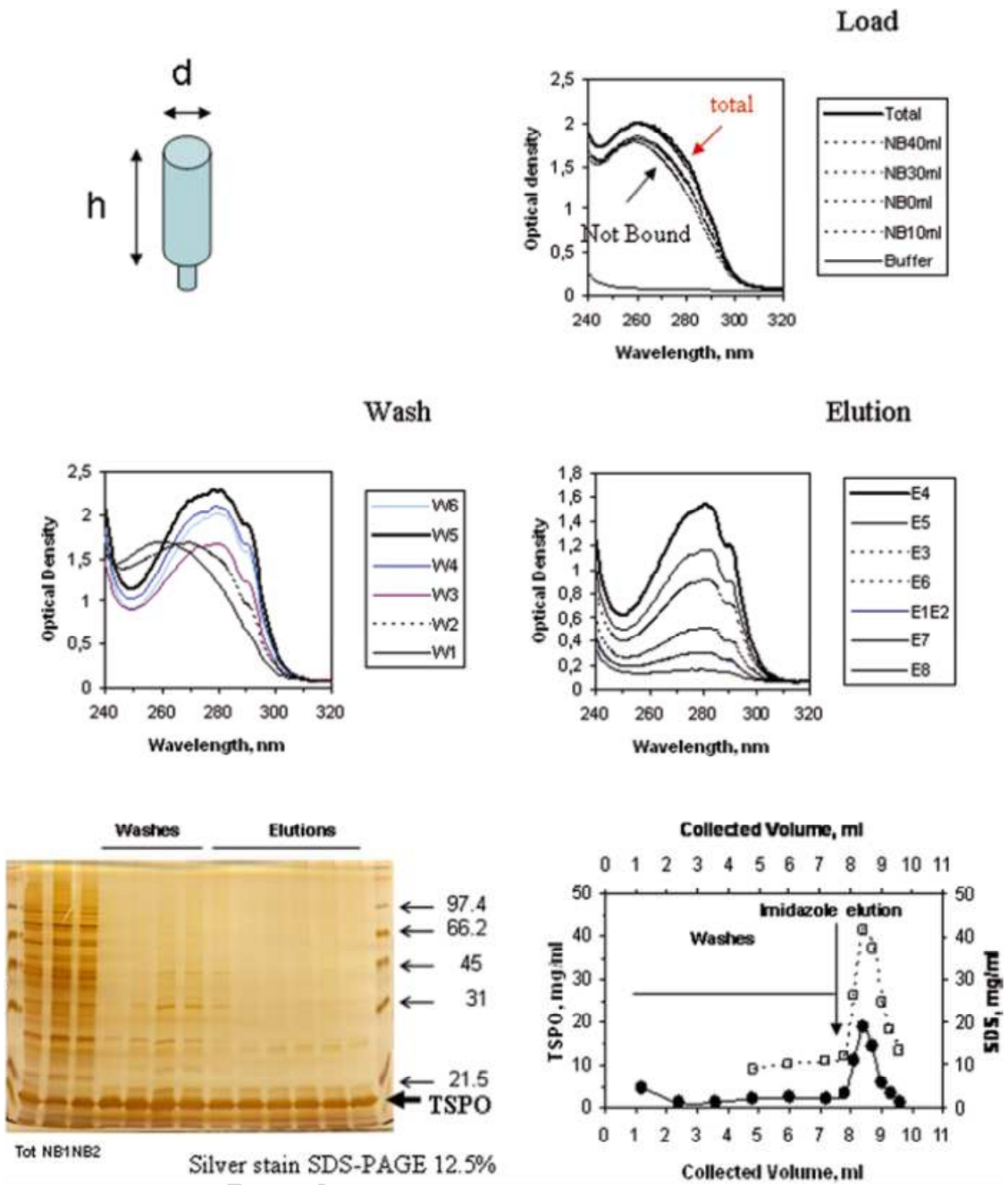


Fig. 14.2 TSPO purification. Solution of SDS-solubilized inclusion bodies from *E. coli* was layered on top of a column filled with NiNTA-agarose resin. Absorption spectra of loaded material (*total*) and collected fractions passing through (*not bound*) were first recorded (*load*). Solution containing SDS (CMC) and low-concentration imidazole (5 mM) were used to remove nontightly bound material, and spectra of the successive wash fractions were recorded (*wash*). Solution containing high-concentration imidazole (250 mM) was used to elute the bound TSPO, and the spectra and the successive collected fractions were recorded (*elution*). Silver-stained gel of the fractions (*load, wash,* and *elution,* 0.5 µg per well) shows that the collected fractions were highly pure with a major band below 21.5 kDa corresponding to TSPO. Purification chromatogram was obtained by converting optical densities of collected fractions into TSPO concentration using an extinction coefficient of 3.88 mg mL^{-1} cm^{-1}.This coefficient was calculated for the recombinant mouse TSPO (sequence including the added amino acids from the plasmid) using the ProtParam tool of the ExPAsy server (Gasteiger et al. 2005)

Book ID: 310972_1_En ChapterID: 14 Dispatch Date: 25/04/2014 ProofNo: 1

Author's Proof !

14.2.4 TSPO Purification

The solubilized extract from bacterial IBs was purified by IMAC using homemade columns that permit adaptation of the amount of resin used in the column to the amount of protein obtained from the bacterial culture. The geometry of the column (Fig. 14.2) is important to produce highly concentrated fractions. A small volume on a thin column will encounter protein all along the length of the column, and thereby yield a concentrated fraction. It is possible to follow the loading of the column by recording the absorption spectra of fractions of column eluates. Similarly, recording the spectra of the washing fractions revealed the change from nucleotide-rich fractions to protein-rich fractions (Fig. 14.2), which was observed by the change in peaks of maximal absorption. Ultimately, the fractions eluted with imidazole exhibit $OD_{280/250}$ absorbance ratios that are characteristic of protein. The presence of TSPO can be assessed by the silver-stained gel, which shows the unique band of TSPO in the elution fractions (Fig. 14.2). The protein content of each pure fraction can be determined by measuring the OD_{280} absorbance, which can be converted into TSPO concentration using an extinction coefficient of 3.88 mg mL^{-1} cm^{-1}.

14.2.5 Protein Characterization

After MP has been purified, several parameters have to be measured before starting structural studies. The detergent content of each fraction can be measured as previously described (Ostuni et al. 2010) using dye spectroscopy (Fig. 14.2). In the washed fractions, the measured detergent corresponds to the SDS added (1 mg mL^{-1}) in the washing buffer, whereas the detergent concentration in the eluted fractions increases as the protein becomes more concentrated in the eluted fractions. The detergent associated with the protein can be measured in the eluted fractions and used to calculate a SDS:TSPO ratio of approximately 2 (w/w). Pooled fractions of purified TSPO can be analyzed using various biophysical techniques to check structural and functional characteristics. The intrinsic fluorescence of TSPO is highly dependent on its detergent environment (Fig. 14.3). Addition of dodecylmaltoside (DDM) induces a 40 % increase in fluorescence, and a subsequent addition of dodecylphosphocholine (DPC) induces a further 40 % increase in fluorescence. These changes in fluorescence are completely reversible by SDS at a sufficient concentration (Fig. 14.3). Intrinsic fluorescence is mostly due to the tryptophan environment, which changes from one detergent to another.

We suspected a change in TSPO secondary structure that could be evaluated by CD. Indeed, TSPO displays different spectra depending on the detergent (Fig. 14.4), which was previously described (Jamin and Lacapere 2007). Spectral deconvolution (Sreerama and Woody 2004) enabled an estimation of the secondary structure of TSPO in different detergents (Table in Fig. 14.4). The percentage of α-helix structure is increased when TSPO is in DDM or DPC compared to that in SDS. The presence of the high-affinity drug ligand PK 11195 also has an important effect

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

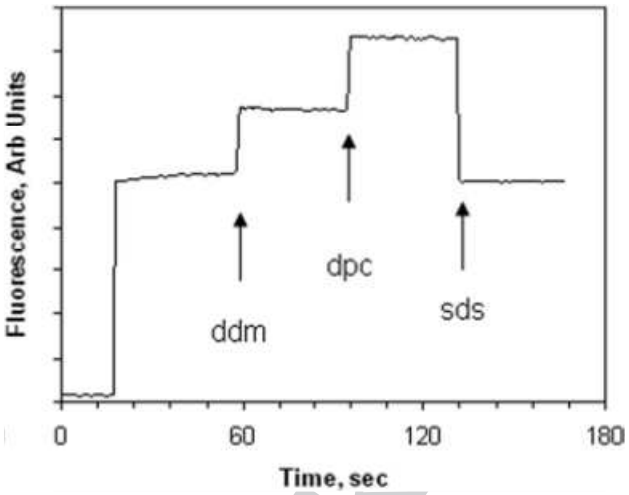
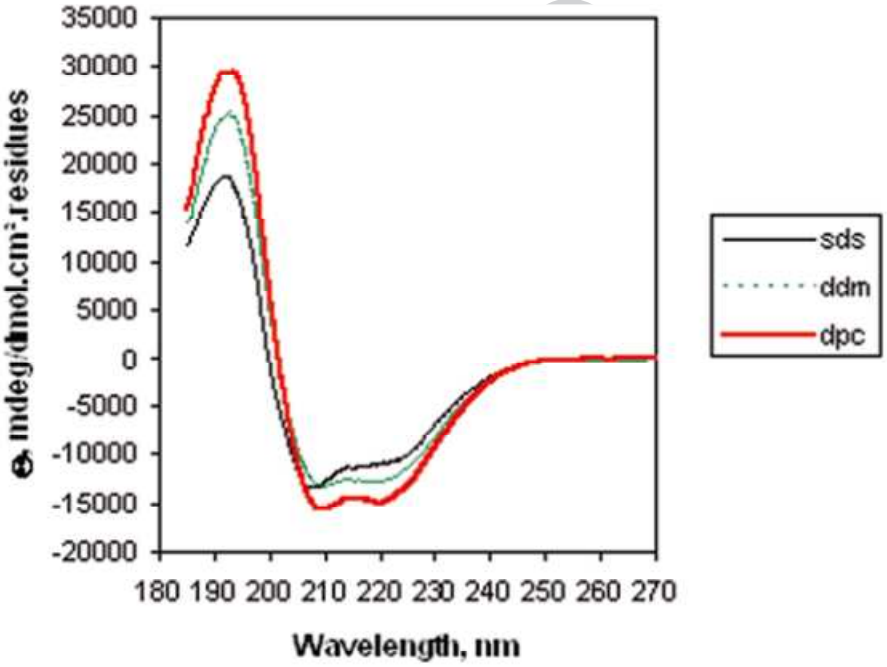


Fig. 14.3 TSPO intrinsic fluorescence. Signal was recorded with excitation and emission wavelengths of 290 and 330 nm, respectively. TSPO (0.5 μM) was added in a buffer (Hepes pH 7.5) containing SDS (CMC). At *arrows*, DDM (2 CMC) was added first, followed by the addition of DPC (4 CMC), and finally an excess of SDS (5 CMC) was added



Detergent	% α-helix	% β-strand	% turn	% unordered
SDS	36 ± 4	14 ± 4	21 ± 6	28 ± 7
DDM	40 ± 5	15 ± 4	19 ± 4	26 ± 5
DPC	45 ± 7	13 ± 9	18 ± 5	24 ± 9

Fig. 14.4 TSPO circular dichroism spectra and secondary structure analysis. *Upper panel* shows spectra of TSPO (0.1 mg mL^{-1}) recorded with a 200-μL cell containing phosphate buffer supplemented by 2 CMC of SDS, DDM, or DPC. *Lower panel* shows table of secondary structure analysis gained from deconvolution of the various CD spectra. (CDPro software, Sreerama and Woody 2004)

Author's Proof !

on TSPO secondary structure as described previously (Murail et al. 2008). If an increase in helical content is clearly observed using CD, and an impressive spreading is clearly observed in 2D NMR spectra (see below), nothing is observed using intrinsic fluorescence. This can be due to a compensatory effect of the fluorescence increase and decrease of the numerous tryptophans of TSPO. The β-sheet content is very difficult to estimate by CD, whereas it is better resolved by infrared spectroscopy (Goormaghtigh et al. 2009). The infrared absorption spectra of TSPO in DDM, SDS, and DPC show that the protein structure is dominated by a high content of α-helices found at 1,654 cm^{-1} (Fig. 14.5a–c). This is in agreement with CD data (Fig. 14.4). The fitting curves enable full secondary structure analysis to be performed (Table I in Fig. 14.5). The β-sheet and β-turn content was fitted at 1,620, 1,630, and 1,676 cm^{-1} and shows that it is far more affected by the change of detergent than α-helix content. In conclusion, TSPO may have distinct conformations of secondary structure in different detergents.

Large conformational changes in MPs can be studied by recording the exchange kinetics of hydrogen and deuterium (H/D) at the level of the amide proton in the mid-infrared spectral range (Vigano et al. 2004; Hielscher et al. 2011; Neehaul et al. 2013). Three different types of exchangeable residues can be distinguished. (1) Fast-exchange residues correspond to those that are located at the protein surface or within a channel. (2) Slow-exchange residues correspond to those that are less accessible and/or located in the hydrophobic part of the protein. (3) Nonexchangeable residues are typically found in the hydrophobic core of MPs. Amide hydrogen exchange of TSPO in DDM (Fig. 14.5d, e) with or without PK 11195 shows that proton accessibility is reduced by the presence of the ligand (Table II, Fig. 14.5). Nonexchangeable residues increase from 18 to 25 %, whereas those in the hydrophobic part of the protein remain constant at 16–18 % (slow-exchange residues), and fast-exchange residues greatly decrease from 70 to 57 %. Exchange rates are significantly increased in the presence of PK 11195, which suggests that ligand binding generates a more compact structure for TSPO. These data suggest that PK 11195 binding induces a conformational change in TSPO, which is consistent with data gained from CD and NMR studies (Murail et al. 2008).

The measurement of stoichiometry and ligand-binding affinity with solubilized protein is a difficult task, particularly when using radioactive ligands to identify bound and free ligand. Isothermal titration calorimetry (ITC) is a good alternative because it measures the heat generated or absorbed when a ligand binds. We performed ITC experiments with TSPO solubilized in different detergents and observed that PK 11195 binding to DPC-solubilized TSPO generates heat with an apparent affinity of 0.6 μM (Fig. 14.6a). However, the stoichiometry is high (approximately 8–10), which suggests multiple binding sites on the protein or nonspecific binding in the detergent surrounding TSPO. No measureable heat was either generated or absorbed when TSPO was solubilized in SDS, which suggests that PK 1195 cannot bind to TSPO in this detergent. Similarly, no change in heat was observed after adding PK 11195 when TSPO was solubilized in DDM (Fig. 14.6b).

To characterize the folding of TSPO in different detergents, trypsin digestion was performed. Mouse recombinant TSPO contains 11 arginines and 2 lysines that

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

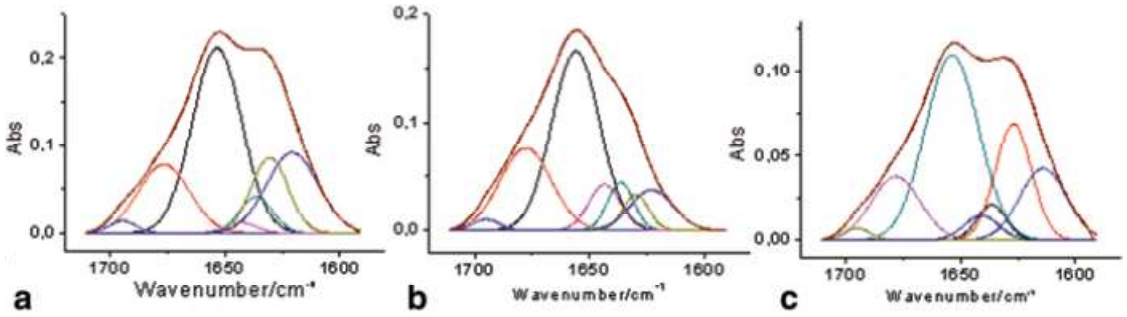


Table I

Detergent	% α-helix	% β-strand	% turn	% random/water
DDM	44 ±7	29 ± 5	17 ± 5	10 ± 7
SDS	51 ± 7	26 ± 5	16 ± 5	7 ± 5
DPC	47 ± 7	15 ± 5	22 ± 5	16 ± 7

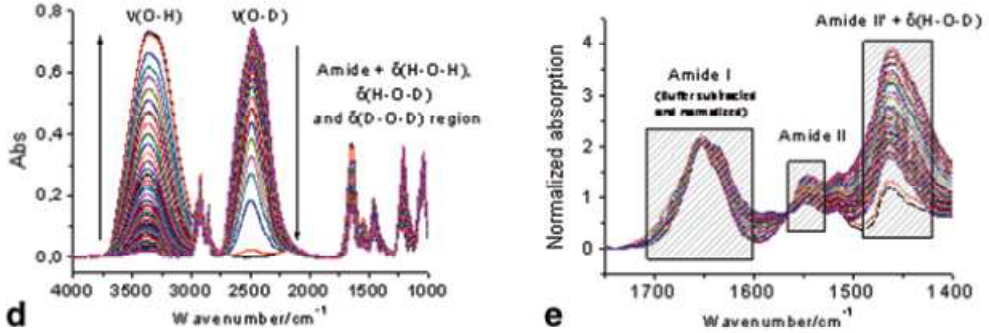


Table II

sample	a_1 %	τ_1 min	a_2 %	τ_2 min	a_3 %
DDM	70	5.5	16	53.9	18
DDM+PK 11195	57	8.3	18.3	70.8	24.8

Fig. 14.5 TSPO infrared spectra (a–c), secondary structure analysis of TSPO in DDM (**a**), in DPC (**b**), and in SDS (**c**). The α-helix structure is found at 1,654 cm^{-1}; the β-sheet and β-turn are observed at 1,620, 1,630, and 1,676 cm^{-1}. *Table I* summarizes values of secondary structure gained from deconvolution of spectra recorded for TSPO in the presence of different detergents. Typical time course of a $^1H/^2H$ (hydrogen/deuterium, H/D) exchange on TSPO (**d**). The initial spectra are characterized by an intense absorption band at 1,650 cm^{-1}, called amide I band, which includes ν(C=O; 70–85 %) and ν(C=N; 15–20 %) vibrational modes. The amide II band is localized near 1,550 cm^{-1}. On H/D exchange, the amide II band intensity decreases and a new band, called amide II′, appears near 1,450 cm^{-1} (**e**). Data after buffer subtraction are used for kinetic analysis. *Table II* summarizes amplitudes and rates of H/D in the presence and absence of PK 11195

are the major cleavage sites for trypsin. All these residues are located in loops connecting TM domains and are therefore putatively accessible to proteolytic cleavage. However, Fig. 14.7 shows that TSPO in SDS is not digested after 120 min at 37 °C with a trypsin to TSPO ratio of 1:30 (w/w), whereas TSPO in DPC or DDM is fully digested under similar experimental conditions. This indicates that TSPO loops are

UNCORRECTED

Author's Proof !

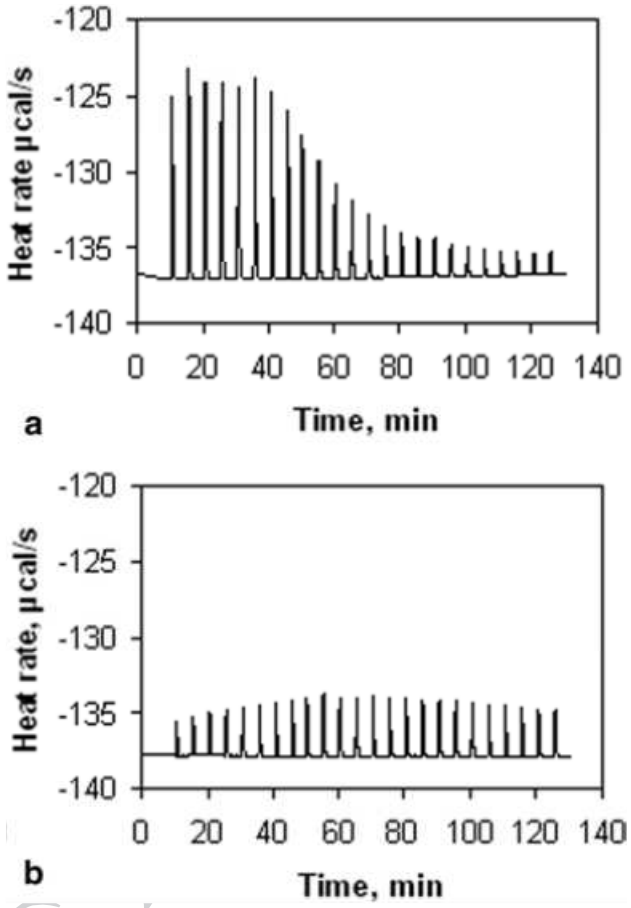


Fig. 14.6 TSPO ligand binding in detergent was measured using isothermal titration calorimetry. TSPO (2 µM) in DPC (**a**) or DDM (**b**) buffer was titrated with a solution of PK 11195 (0.2 mM)

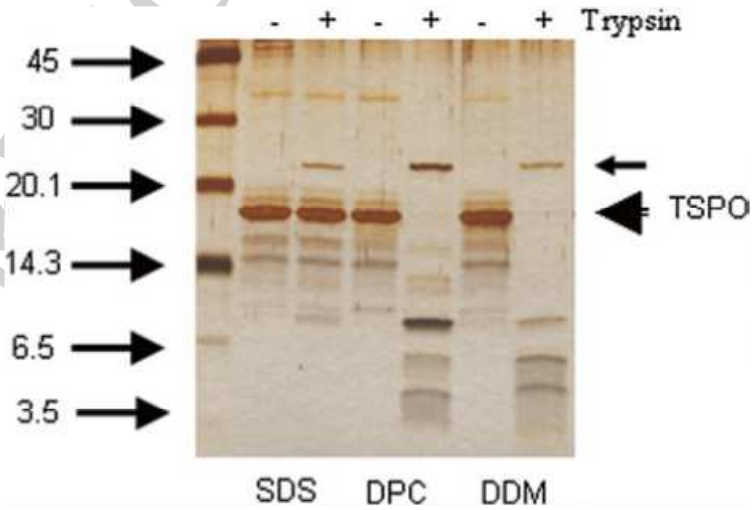


Fig. 14.7 TSPO trypsin digestion. TSPO was resuspended in 10 mM MOPS–Tris buffer pH 7 in the presence of CMC of SDS, DDM, or DPC, and incubated for 2 h at 37 °C in the presence of trypsin at a TSPO-to-trypsin ratio of 30 (w/w)

not as accessible in the presence of SDS detergent and confirms that the global folding of TSPO is different in different detergents, as previously shown by CD and fluorescence studies. The binding of PK 11195 occurs in between cytosolic loops (Li and Papadopoulos 1998), and so the loops have to be accessible for binding. We showed that PK 11195 does not bind to TSPO in SDS, whereas it does bind to TSPO in DPC, which is in agreement with the trypsin digestion experiments.

UNCORRECTED

Author's Proof !

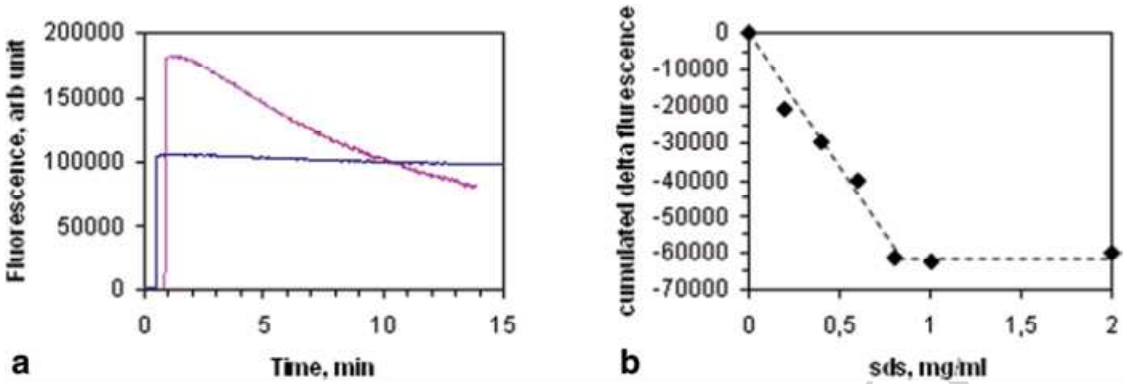


Fig. 14.8 Stability of TSPO in SDS. **a** Kinetics of change of intrinsic fluorescence of TSPO (excitation and emission wavelength set at 290 and 30 nm, respectively) recorded in a buffer in the absence (*upper curve*) or presence of SDS (CMC). **b** Titration of initial intrinsic fluorescence change as a function of SDS content of the buffer

193 ### *14.2.6 Protein Stabilization*

194 MPs in their native environment are surrounded by lipids and cofactors that are es-
195 sential to maintain their active conformation. During protein purification, the deter-
196 gent concentration above the critical micellar concentration (CMC) is used to avoid
197 MP aggregation. Structural contacts between protein and lipids can be destabilized
198 if the protein is extracted from membrane or can be absent if the protein is extracted
199 from IBs (Baneres et al. 2011). Exposure to detergent can lead to protein denatur-
200 ation. Intrinsic fluorescence can be used to check the stability of TSPO. Addition
201 of SDS-purified TSPO to a buffer without detergent yields a characteristic protein
202 fluorescence that slowly decreases with time (Fig. 14.8a). However, addition of
203 SDS-purified TSPO to a buffer that contains a CMC of SDS yields very stable
204 protein fluorescence. Titration of the SDS concentration required to achieve this
205 protein stabilization gives the CMC value of SDS (Fig. 14.8b). Addition of SDS-
206 purified TSPO to DPC-containing buffer yields a high protein fluorescence that
207 remains relatively stable over time.
208 Among the different strategies for stabilizing an MP (Tate and Schertler 2009;
209 Baneres et al. 2011, Chaps. 1, 7, 8, 9 in this volume), a simple one is to reincorporate
210 detergent-solubilized protein into liposomes (Rigaud et al. 1995). TSPO was incu-
211 bated with detergent and lipids, and the detergent was removed by the addition of
212 Bio-Beads (Lacapere et al. 2001; Ostuni et al. 2010; Teboul et al. 2012). Formation
213 of proteoliposomes can be followed using light scattering because small protein–
214 detergent complexes do not diffuse light, whereas proteoliposomes are large objects
215 that diffuse light (Ostuni et al. 2010). Reincorporation of TSPO into a lipid environ-
216 ment induces a large increase in intrinsic fluorescence (Teboul et al. 2012), which
217 indicates that the tryptophan environment is changed (Fig. 14.9a, b). The emission
218 spectra of TSPO show a blue shift, which indicates another reorganization of the
219 tryptophan environment (Fig. 14.9a). We monitored changes in the protein second-
220 ary structure by recording CD spectra at different times during TSPO reconstitution

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

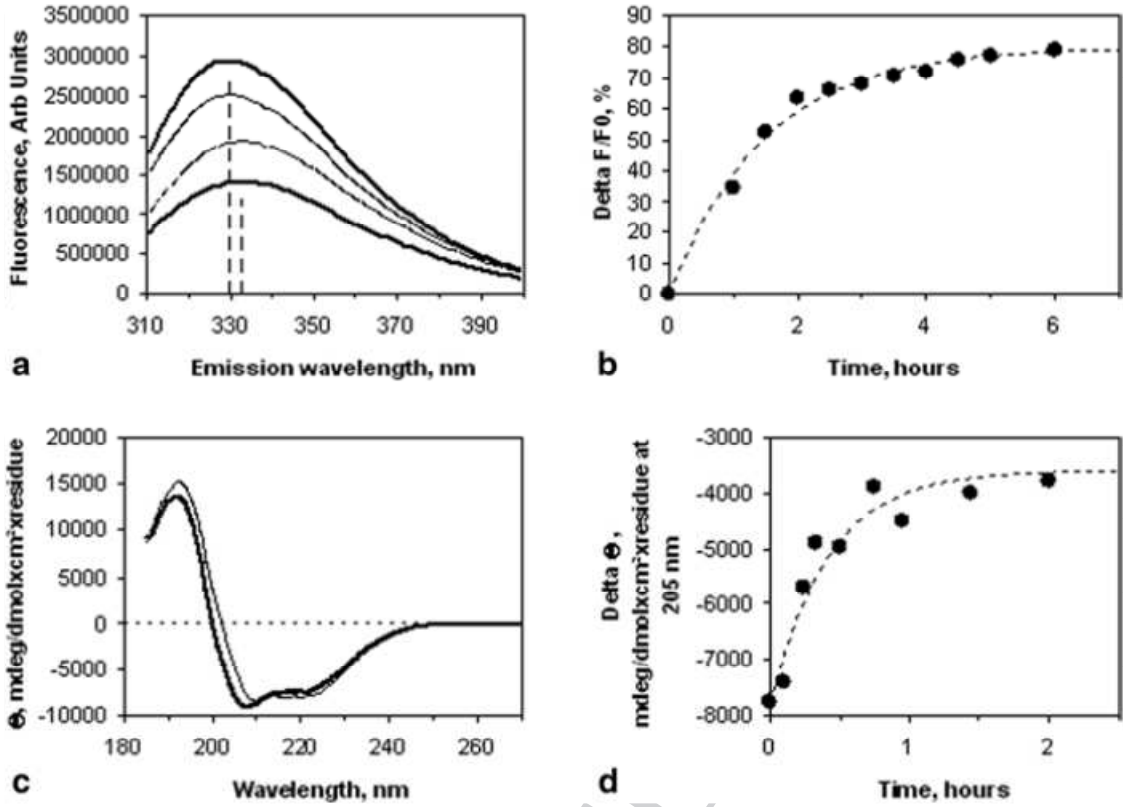


Fig. 14.9 Reconstitution of TSPO into proteoliposomes. **a** Intrinsic fluorescence spectra of TSPO (excitation wavelength set at 290 nm) recorded at different times of incubation of a mixture of TSPO, SDS, and lipids in the presence of Bio-Beads. *Vertical dotted lines* depict blue shift of the maxima of spectra. **b** Time course of intrinsic fluorescence changes plotted as a ratio of fluorescence increase to initial fluorescence. **c** Circular dichroism spectra of TSPO recorded at the beginning and the end of the early steps of reconstitution. **d** Time course of circular dichroism increase observed at 205 nm

(Fig. 14.9c). The spectra show both a shift and a decrease of the 205-nm minimum (Fig. 14.9d). The precise interpretation of these results is difficult, but they do reflect a change in the TSPO environment. The most accurate method to monitor the formation of proteoliposomes is electron microscopy (EM) imaging.

The reconstitution of TSPO into proteoliposomes stabilizes the protein structure and enables the recovery of high-affinity ligand binding (Lacapere et al. 2001; Teboul et al. 2012). PK 11195 binds to reconstituted TSPO proteoliposome with a nanomolar affinity, which is similar to that measured in vivo (Ostuni et al. 2009). However, proteoliposomes are not suitable for many structural studies. Ternary complexes of protein–lipid–detergent are better samples for crystallization and solution NMR. We observed that it was impossible to form ternary complexes of SDS-purified TSPO by adding lipids. This can be understood from solubilization experiments, which show that SDS tends to stick to the MP and strongly remove lipids (Kragh-Hansen et al. 1998). By contrast, we observed that addition of lipids to DDM-solubilized TSPO induces a large increase in intrinsic fluorescence for a

UNCORRECTED

Author's Proof !

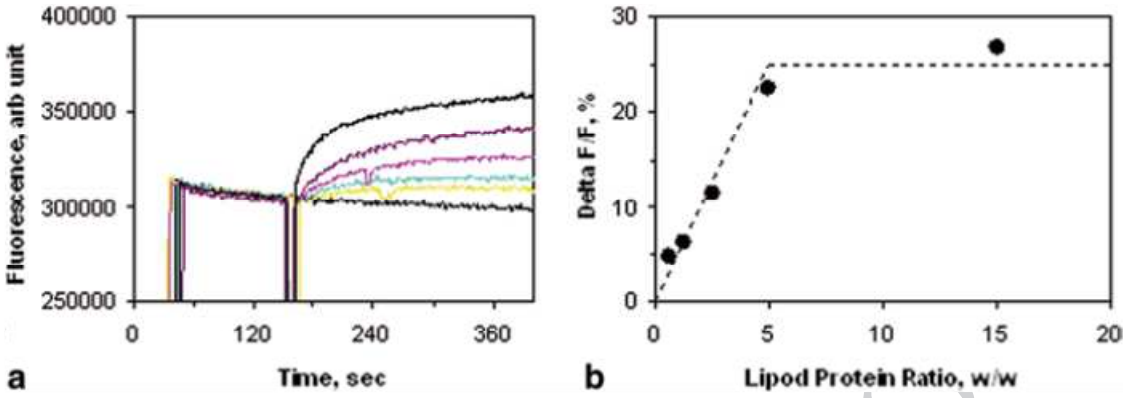


Fig. 14.10 Stability of TSPO in DDM. **a** Kinetics of intrinsic fluorescence change of TSPO (excitation and emission wavelength set at 290 and 30 nm, respectively) recorded in a DDM (CMC)-containing buffer. Repeated experiments were performed with addition of increasing amounts of lipids (DMPC:DMPE, 9:1), giving a lipid-to-protein ratio (LPR) ranging from 0 to 15 (w/w). **b** Titration of initial intrinsic fluorescence changes as a function of LPR content of the solution. Saturation observed at 5 (w/w) gives a value of 100 mol of lipids per mol of TSPO

saturating lipid-to-protein ratio (Fig. 14.10). The addition of lipids to DPC-solubilized TSPO does not produce any change in intrinsic fluorescence, which suggests that TSPO might be well structured in this detergent. This could be due to the choline head group of the DPC detergent, which could mimic the polar head group of phospholipids.

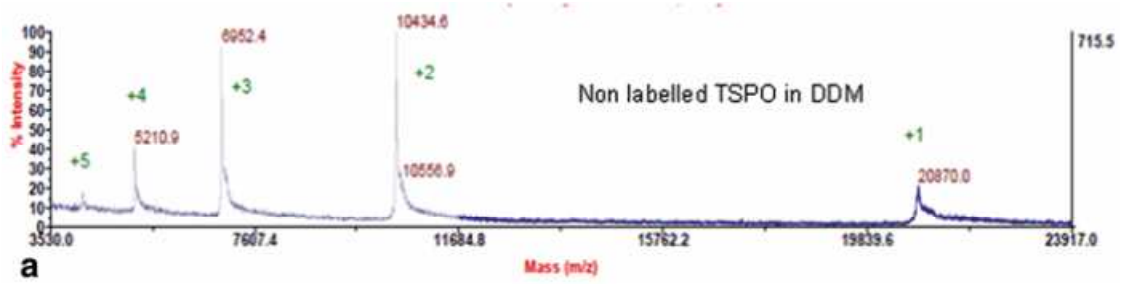
14.2.7 Production of Labeled TSPO for Structural Studies

3D analysis of protein crystals requires the presence of heavy atoms for phase determination when no previous structure is available to perform molecular replacement. Single- or multiple-anomalous dispersion (SAD or MAD) near the absorption edge of selenium can be efficiently used for phase determination (Pebay-Peyroula 2007). Replacement of methionines (Met) by selenomethionines (SeMet) can be achieved by overexpressing TSPO in bacteria cultured in a minimum medium complemented with SeMet (Guerrero et al. 2001).

NMR studies of large proteins require isotopic enrichment (Montaville and Jamin 2010) for the acquisition of multiple dimension spectra needed for 3D structure determination. Bacteria are a good system for isotopic enrichment because the addition of nitrogen- and carbon-enriched sources ($^{15}NH_4Cl$ or $(^{15}NH_4)_2SO_4$; ^{13}C-glucose or ^{13}C-glycerol) leads to the production of isotopically enriched proteins. The growth of cells in media containing D_2O leads to the high level of deuteration required for aliphatic detection. Bacterial overexpression of uniformly ^{15}N- and ^{13}C-labeled TSPO, and partially deuterated TSPO, has been performed, and enriched TSPO has been purified in sufficient amounts for NMR analysis (Robert and Lacapere 2010).

UNCORRECTED PRO

Author's Proof !



a

b

	SeMet	^{15}N	^{15}N, ^{13}C	^{15}N, ^{13}C, ^{2}H
% labelling	100	94	90	80

Fig. 14.11 Mass spectroscopy of TSPO. **a** MALDI-TOF spectrum of TSPO in DDM shows peaks corresponding to the different charges and enables calculation of the molecular mass of recombinant TSPO (20,870 Da). This corresponds to the full-length mouse TSPO containing the tag and omitting the first methionine. **b** Table presents the labeling percentage of recombinant mouse TSPO produced by bacterial overexpression in minimum medium supplemented with isotopically labeled sources

Mass spectroscopy is a perfect technique to measure protein labeling because the replacement of Met by SeMet and the replacement of ^{14}N or ^{12}C by ^{15}N and ^{13}C induces an increase in protein mass. However, it is difficult to perform mass spectroscopy with MPs due to the presence of detergent. The use of nonionic detergents such as DDM enabled MALDI-TOF analysis to be performed (Barrera et al. 2008; Sagan and Bolbach 2009). We exchanged the SDS surrounding TSPO with DDM (Fig. 14.3), and then obtained mass spectra of TSPO (Fig. 14.11a) that permitted to characterize the labeled TSPOs. We showed that all Met of TSPO were replaced by SeMet, and the incorporation of ^{15}N, ^{13}C, and ^{2}H isotopes was very good (Fig. 14.11b).

14.3 Structural Studies of TSPO

14.3.1 Three-Dimensional Crystals

3D crystallization of MPs still remains challenging. The first bottleneck usually encountered is the quantity and quality of the available sample. In these studies of TSPO, the yield and concentration that were obtained were suitable for crystallization trials. The protein characterization (described in Sect. 14.2.5) was indicative of a well-folded and rather stable protein. The TSPO crystallization method utilized stand crystallization techniques called vapor diffusion.

UNCORRECTED PR

Author's Proof !

14.3.1.1 Initial Crystallization Trials

The crystallization experiments were initially performed using the SDS-purified protein, but no protein crystals were obtained. Subsequently, crystallization trials were performed with DPC-purified TSPO, with protein and detergent concentrations estimated at 13 and 30 mg mL^{-1}, respectively. Conformational stability is an essential parameter for successful crystallization (see Sect. 14.2.6). Therefore, we tried from the beginning to add the specific ligand PK 11195 to the protein sample. Therefore, for comparison, only half of the sample contained 5 mM of the ligand. Screening of crystallization conditions was performed using the nanodrop HTX robot at EMBL (PSB Platform, Grenoble, France) and a sparse matrix approach, by testing approximately 400 commercial screen conditions from Qiagen. Several conditions that contained a PEG (polyethylene glycol)/salt mixture as precipitant led to phase separation or crystalline precipitates. No obvious difference was observed whether the ligand was present or not.

These conditions were further explored and refined using homemade screens combining different concentrations of PEG, salt, and different pH. A few crystals were obtained and investigated at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). Some crystals showed a diffraction pattern that was typical for salt crystals; for others, no diffraction pattern was observed. Therefore, it was not possible to conclude whether the obtained crystals were protein or detergent crystals.

14.3.1.2 Exploring the Effects of Different Protein Concentrations and Ligands

Following the same strategy described above, different TSPO batches purified in DPC at protein concentrations ranging from 8 to 56 mg mL^{-1} were subjected to crystallization trials. Crystallization in the presence of the PK 11195 ligand was explored. The addition of lipids (9:1 dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC to phosphatidylethanolamine, PE) was tested for a stabilizing effect (see Sect. 14.2.6). We also performed the production and crystallization of the SeMet-labeled protein (see Sect. 14.2.7) concentrated to 18 mg mL^{-1}.

Phase separations, crystalline precipitates, and urchins or microcrystals were observed in some drops by days or weeks after the initial setup (Fig. 14.12a–f). Typically, the most favorable precipitants contained PEG (with different molecular masses) and different salts. Objects of sufficient size were tested at the ESRF. All crystals obtained with the protein–lipid complex were lipid crystals. For others, diffraction spots that could be characteristic of protein crystals were observed. The best crystals showed diffraction patterns up to a resolution of 20 Å (Fig. 14.12g).

Extensive optimization of setup parameters around the best conditions was conducted using commercial additives, detergents, screens, and homemade plates. Although some conditions could be reproduced, it was not possible to improve the diffraction quality.

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

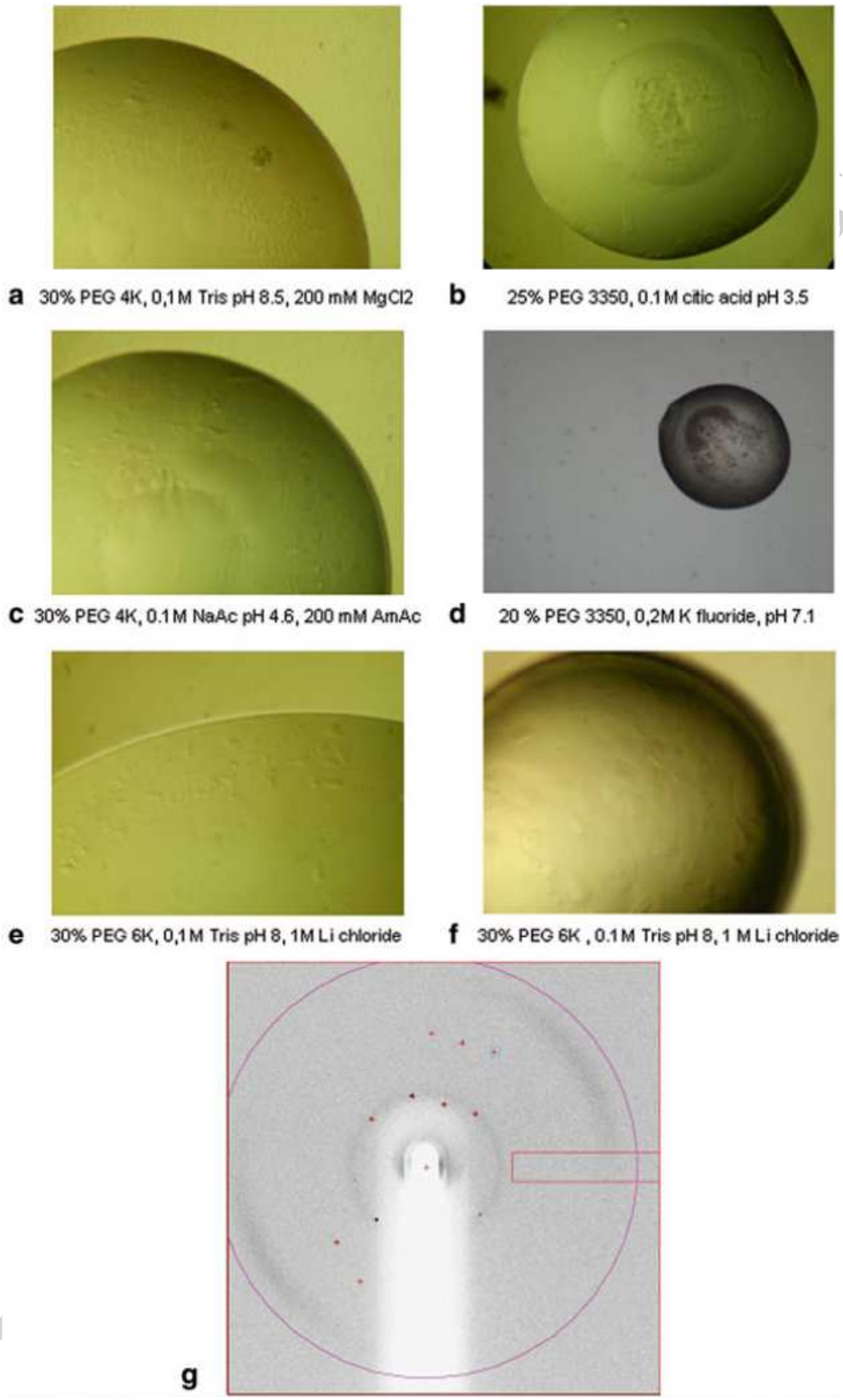


Fig. 14.12 Three-dimensional crystallization of TSPO. **a**–**e** Hits obtained for native TSPO purified in DPC, except **d**, where TSPO was purified in DDM, and **f** for TSPO in the presence of 5 mM PK 11195. Experimental conditions are described in each figure. **g** Typical diffraction pattern obtained for a crystal grown in the conditions shown on panel **e**. Data were collected on ID23-2 at the ESRF. The cell parameters predicted from the diffraction images are compatible with protein crystals and the presence of several TSPO molecules per asymmetric unit

Author's Proof !

14.3.1.3 Exploring the Effects of Other Detergents

Choosing the right detergent for protein crystallization is an essential key to success. Although some crystals can be obtained using various detergents, the diffraction quality is usually highly dependent on the detergent used. Therefore, in an effort to increase the success rate of the TSPO crystallization, alternative detergents were considered. Because the protein was purified and characterized in DDM, a detergent that has been successful for MP crystallization (more successful than DPC), new crystallization experiments were performed in this detergent. The protein and detergent concentrations were estimated at 12 and 30 mg mL^{-1}, respectively. Screening with the robot and the commercial kits yielded promising hits, but they could not be reproduced (e.g., Fig. 14.12d).

Crystallization is an empirical technique, especially for MPs, and it is not standardized. Important parameters include protein stability, homogeneity, and detergent properties. The crystallization trials performed with TSPO generated promising results and low-diffracting protein crystals. The optimization parameters, screening additives, protein concentration, and detergent were not sufficient to improve the diffraction quality of the protein crystals. Many other factors could be explored, including other types and concentrations of detergent. The control of protein purity, homogeneity, and stability is crucial for protein crystallization. *In meso* crystallization could offer an interesting alternative to approach TSPO crystallization.

In the meantime, another group working on TSPO of *Rhodobacter sphaeroides* reported that protein purified in DDM was able to crystallize in a vapor diffusion and bicelle setup (Li et al. 2012). This suggested that the use of bacterial TSPO for 3D crystallization could be a better choice than the use of mammalian TSPO. However, no diffraction data on the protein structure of *Rhodobacter* TSPO crystals have been published yet.

14.3.2 NMR Studies

Early NMR structural studies of TSPO were performed on protein fragments because of the high molecular weight of TSPO (18 kDa). TSPO is a mitochondrial MP that functions in the transport of cholesterol. A cholesterol-recognition amino acid consensus sequence (CRAC) has been identified (Li and Papadopoulos 1998) and observed in other proteins that interact with cholesterol. A solution ^{1}H-NMR study of a synthetic peptide corresponding to the C-terminus of TSPO containing the CRAC domain suggested that a binding site for cholesterol was in a groove made by aromatic residues (Jamin et al. 2005). This was confirmed by site-directed mutagenesis of the entire TSPO, and docking of cholesterol in the peptide structure was consistent with cholesterol bound in the groove and capped by an arginine (Jamin et al. 2005). Another solution ^{1}H-NMR study was performed on synthetic peptides corresponding to the five TM domains of TSPO (Murail et al. 2008). It clearly revealed that these peptides form helical structures. Recently, the production of a recombinant fragment containing a double-TM domain with its connecting loop

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

(TM4TM5) was successfully performed by overexpression in bacteria (Galvagnion et al. 2013). Optimization of the solubilization conditions for NMR enabled the 1D ^{1}H-NMR and well-resolved 2D ^{1}H–^{15}N HSQC (heteronuclear single quantum correlation) of the recombinant double TM domain fragment.

For the entire TSPO solubilized in SDS, the solution 1D ^{1}H-NMR spectrum shows peaks in the backbone amide protons, tryptophan side chain indole NH groups, and upfield methyl region (Fig. 14.13a). These results suggest that the TSPO is at least partially structured. A solution 2D ^{1}H–^{15}N HSQC spectrum of TSPO solubilized in SDS exhibits poorly resolved peaks especially in the central region at approximately 8 ppm (Fig. 14.13f). The 12 expected indole NH resonances (δ^{1}H and δ^{15}N at approximately 10 and 128 ppm, respectively) are not well separated, whereas the glycine region (δ^{15}N at approximately 106 ppm) shows more resolved peaks. The solution 2D ^{1}H–^{13}C HSQC spectrum of TSPO solubilized in SDS shows poor chemical shift dispersion. In particular, the methyl groups of the five expected methionines (δ^{1}H at approximately 2 ppm) are not resolved (Fig. 14.13i).

To analyze the effect of detergents on the NMR spectra of TSPO, protein purified in SDS was added to solutions containing CMC of SDS, DDM, or DPC. The presence of DDM induces only minor modifications of the TSPO spectrum, such as a small low-field displacement of tryptophan indole NH protons (Fig. 14.13b). By contrast, the presence of DPC induces a notable low-field shift of tryptophan indole NH of TSPO (Fig. 14.13b). No modifications are observed in the upfield region of the 1D ^{1}H spectrum of TSPO irrespective of the detergent (Fig. 14.13c). SDS can be fully exchanged by DPC, and this exchange induces modifications of the 1D ^{1}H spectrum of TSPO both in the tryptophan indole NH (Fig. 14.13d) and in the upfield (Fig. 14.13e) regions. However, the 1D ^{1}H, 2D ^{1}H–^{15}N HSQC, and 2D ^{1}H–^{13}C HSQC spectra are not well resolved and show broadening of some peaks, which suggests conformational exchange.

The addition of the high-affinity drug ligand PK 11195 leads to a spectacular improvement of NMR spectral quality (Murail et al. 2008). The 1D ^{1}H spectrum of TSPO shows numerous resolved peaks for the tryptophan indole NH (Fig. 14.13d) and in the upfield region of methyl resonances (Fig. 14.13e). Similarly, solution 2D ^{1}H–^{15}N (Fig. 14.13h) and 2D ^{1}H–^{13}C (Fig. 14.13k) HSQC of TSPO solubilized in DPC exhibit large chemical shift dispersion. In particular, the expected 12 side chain tryptophan NH groups are well differentiated, which suggests distinct local environments in the PK 11195-bound TSPO structure. A similar observation can be drawn for the five expected methionine methyl groups (δ^{1}H and δ^{13}C at approximately 2 and 13 ppm, respectively), the three isoleucine methyl resonances (δ^{13}C at approximately 14 ppm), and the alanine resonances (δ^{1}H and δ^{13}C at approximately 1.6 and 18 ppm, respectively). These data confirm that PK 11195 stabilizes the conformation of TSPO. However, the stabilization of a unique conformation of TSPO over a long period, which is required for 3D NMR experiments acquisition, a first step to determine the protein atomic structure, remains a difficult challenge.

Stabilization of TSPO can be obtained by placing the protein in a lipid environment (see Sect. 14.2.6). Recent work shows that MP structure can be determined using solid-state NMR (ssNMR) of proteoliposomes (Marassi et al. 2012; Das et al. 2012; Park et al. 2012; see also Chap. 12 in this volume). ^{15}N- and ^{13}C-labeled

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

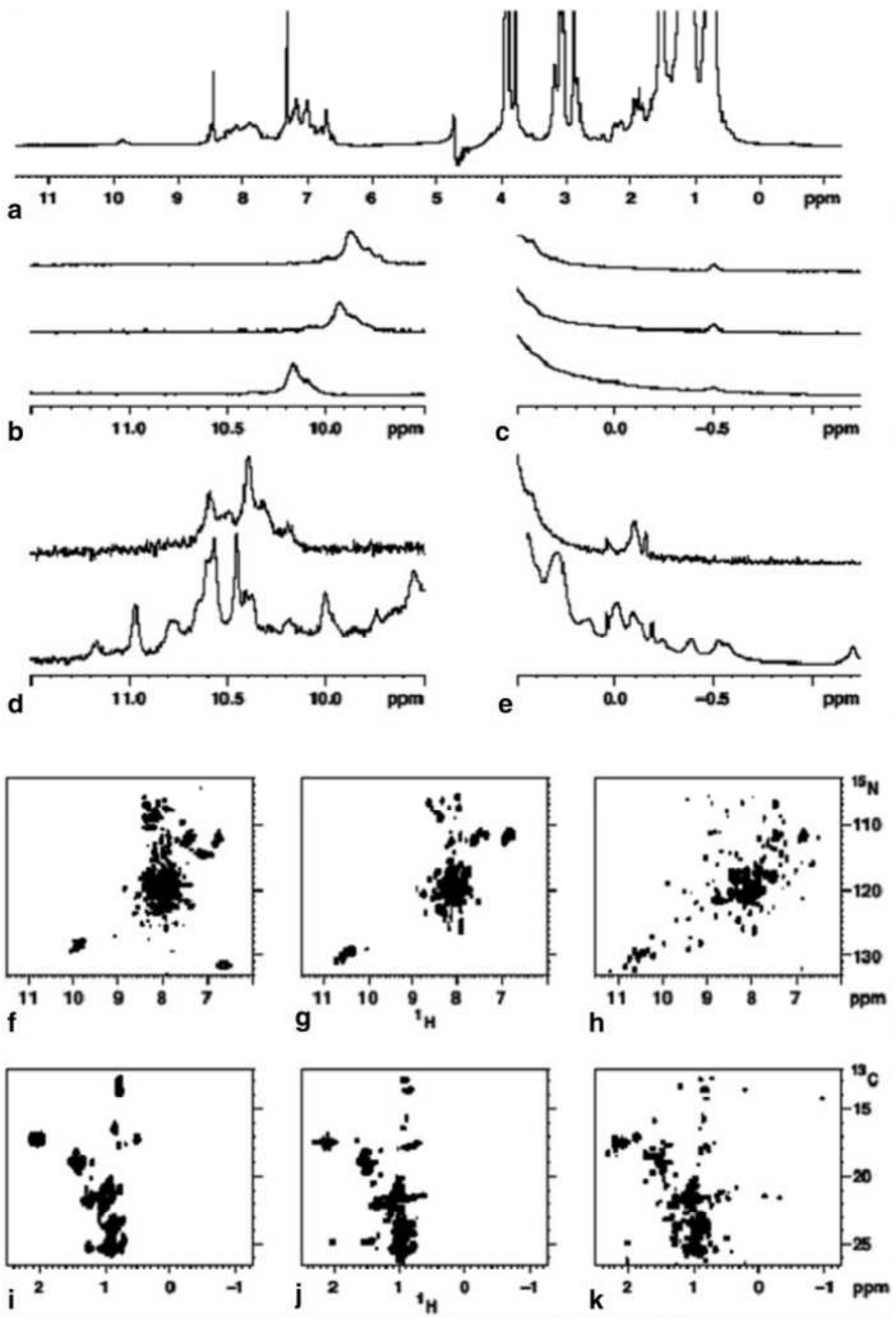


Fig. 14.13 Solution NMR spectra of TSPO. **a** 1D ^{1}H-NMR spectrum of TSPO solubilized in SDS. **b** and **c** 1D ^{1}H-NMR spectra of indole NH **b** and methyl proton **c** regions of TSPO solubilized in the presence of SDS (*top*), DDM (*middle*), and DPC (*bottom*). **d** and **e** 1D ^{1}H-NMR spectra of indole NH **d** and methyl proton **e** regions of TSPO solubilized in DPC in the absence (*top*) and in the presence (*bottom*) of PK 11195. **f**, **g**, and **h** 2D ^{1}H–^{15}N HSQC spectra of TSPO solubilized in SDS **f** or DPC **g**, **h**, in the absence **g** and presence **h** of PK 11195. **i**, **j**, and **k** Methyl region of 2D ^{1}H–^{13}C HSQC spectra of TSPO solubilized in SDS **i** or DPC **j**, **k**, in the absence **j** and presence **k** of PK 11195

Author's Proof !

TSPO has been reconstituted at a lipid-to-protein ratio of 10 (w/w) and ssNMR spectra were recorded at magic angle spinning (MAS). The 1D MAS ^{13}C spectrum displays sharp, intense peaks (Fig. 14.14a) that correspond to the natural abundance of ^{13}C lipid signals that can be seen on the 1D spectrum of pure lipids (Fig. 14.14b). A lower lipid-to-protein ratio (1 w/w) was used to reduce the lipid contribution to the NMR spectra (Fig. 14.14c). The 2D MAS ^{13}C–^{13}C correlation spectra in the absence and presence of PK 11195 were recorded (Fig. 14.14d, e). In the absence of PK 11195, the spectral quality of TSPO in its native lipid environment is promising and could be amenable to structural studies. A dramatic effect of PK 11195 is clearly observed on the spectrum in terms of chemical shift dispersion and number of observed correlations. This might be due to a conformational change of TSPO induced by PK 11195 that results in improved structural homogeneity, and could therefore open the way toward the structural determination of an alternative ligand-bound conformation of TSPO.

14.3.3 Two-Dimensional Crystals and Electron Microscopy

The 2D crystallization of MPs combined with EM observation and analysis has been an alternative to 3D crystallization. This approach requires low protein concentration and enables direct imaging of the objects (Lacapere 2010). Several types of 2D crystals can be grown such as sheets or tubes (Lacapere 2010).

The first 3D structure of TSPO was obtained by electron cryomicroscopy of helical crystals of bacterial TSPO from *Rhodobacter sphaeroides* (Korkhov et al. 2010). Although the data were of low resolution (10 Å), the 3D reconstruction revealed monomers with five TM domains and dimeric association. More recently, images of mouse TSPO interacting with a functionalized monolayer have been obtained (Teboul et al. 2012). The EM image (Fig. 14.15a) reveals particles (Fig. 14.15b) that are aligned and averaged (Fig. 14.15c). The diameter of a particle is approximately 6 nm, whereas the bacterial monomer is 2.5 nm (Fig. 14.15e, f). This raises a question about the degree of polymeric association of mammalian TSPO. The bacterial monomer can be enclosed either in a circle or in an ellipse (Fig. 14.15f) that can be used in an attempt to fit mouse TSPO using an isodensity contour level of the averaged image. Several densities surrounding a central hole can be clearly seen (Fig. 14.15d), and at least two different fittings can be obtained with three ellipses or four circles (Fig. 14.15g). The projection map of the bacterial dimer accounts for the entire protein because it is obtained from cryoimages, whereas the mammalian map is obtained from negative staining images that account for only the external domain of TSPO that is accessible to the negative stain. Thus, counting and comparing the number of densities (3 for bacterial TSPO, Fig. 14.15e, and 4–6 for mammalian TSPO, Fig. 14.15d) is not possible, whereas comparing the overall dimensions is more simple and accurate. At this stage, the following two questions can be raised: (1) Are there different TSPO polymers depending on the species (bacterial or mammalian)? (2) Are different TSPO polymers relevant for transporter function, or are they a crystallization artifact?

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

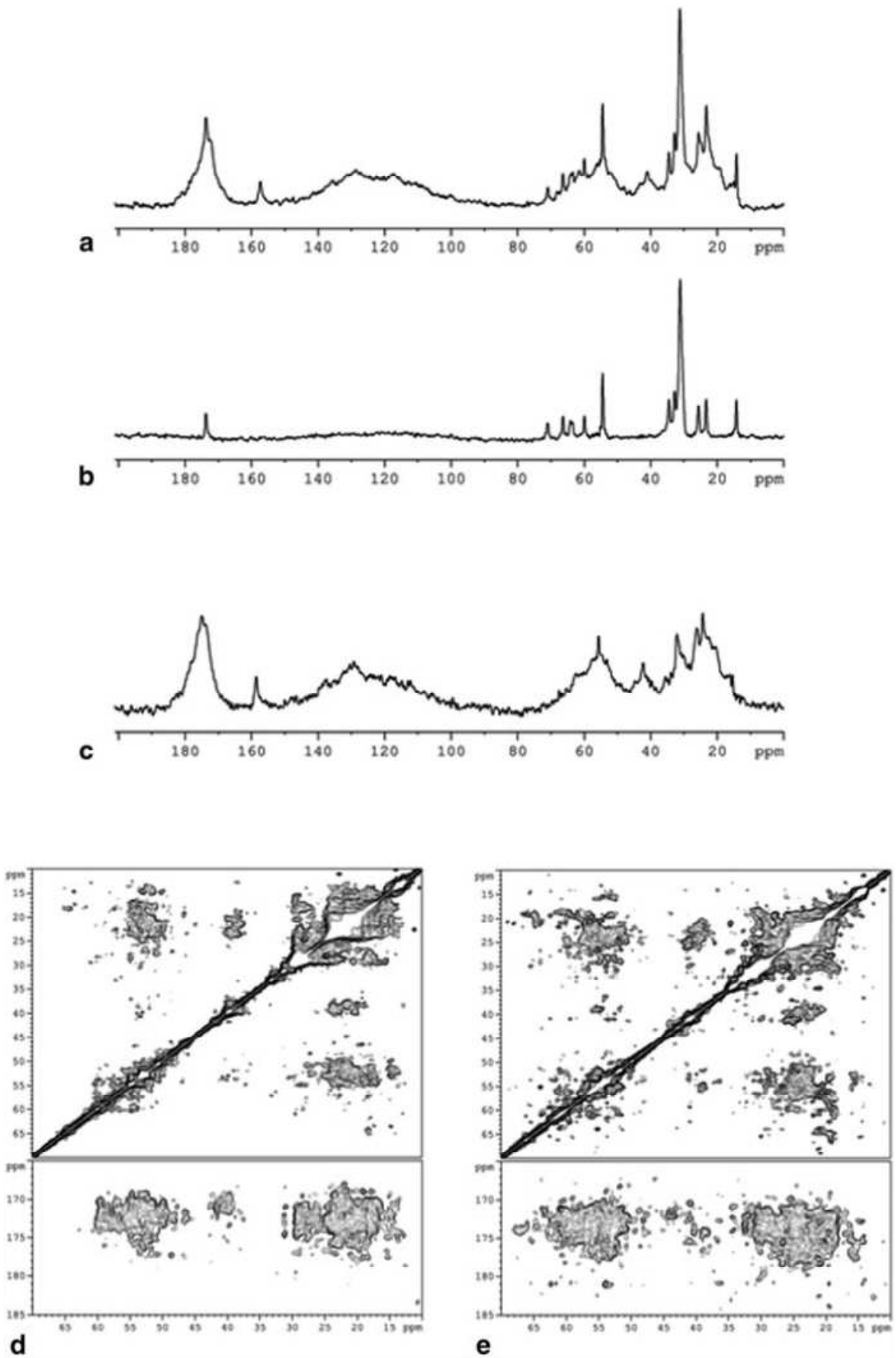


Fig. 14.14 Solid-state MAS NMR spectra of TSPO. **a** and **c** 1D MAS ^{13}C NMR spectra of TSPO reconstituted in proteoliposomes at a lipid-to-protein ratio of 10 (w/w) (**a**) or 1 w/w (**b**), and of pure lipid liposomes (DMPC:PE, 9:1) (**c**). **d** and **e** 2D MAS ^{13}C–^{13}C NMR correlation spectra of TSPO reconstituted in proteoliposomes in the absence (**d**) or presence (**e**) of PK 11195, recorded using PARIS recoupling (Weingarth et al. 2009) and covariance treatment (Weingarth et al. 2010)

Author's Proof !

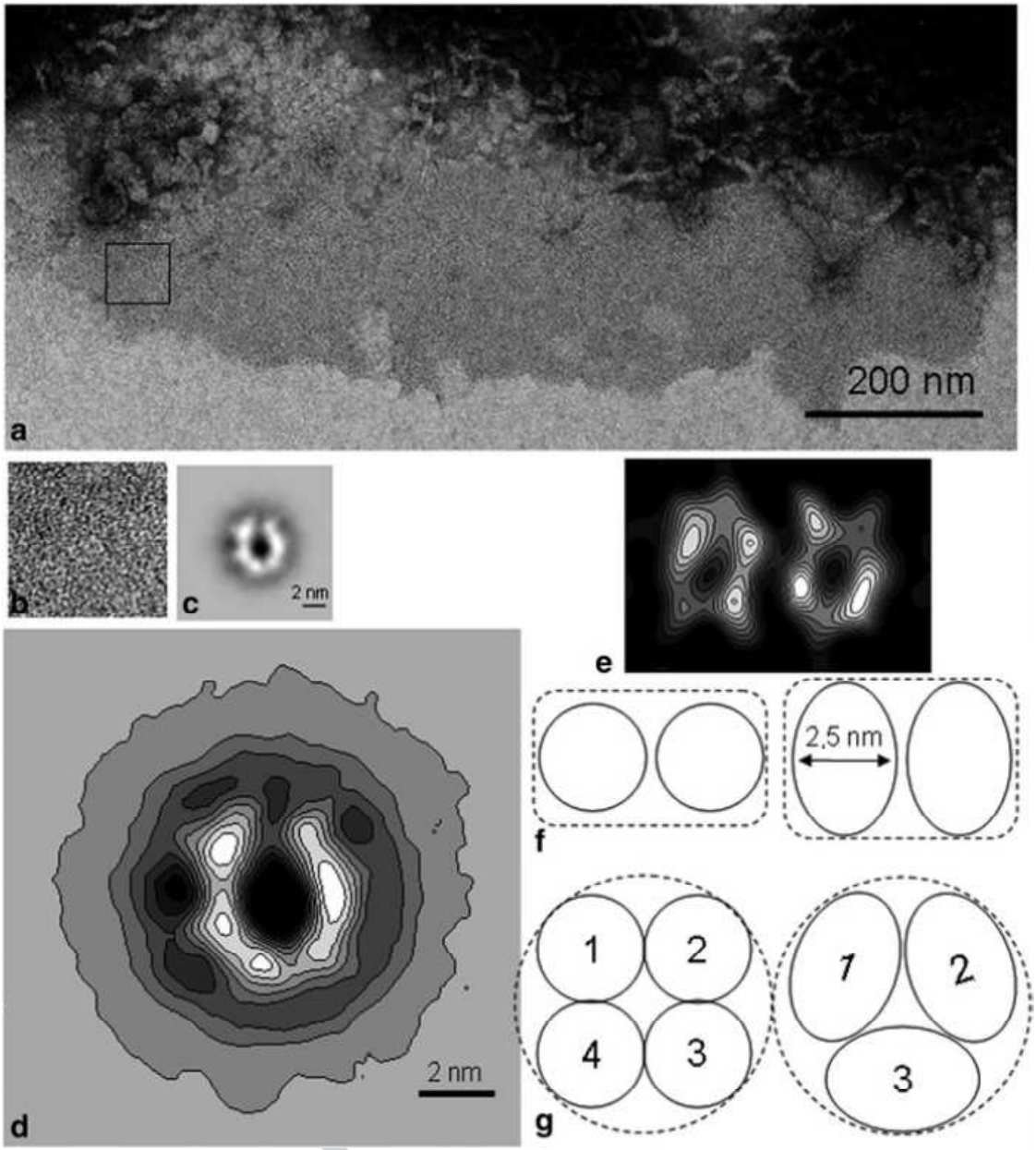


Fig. 14.15 Two-dimensional crystallization of TSPO. **a** Transmission electron microscopy image of recombinant TSPO adsorbed under a functionalized monolayer. **b** Enlargement of particles contained in the *black box* shown in panel **a**. **c** Average of particles obtained after correspondence analysis (Teboul et al. 2012). **d** Superimposed contour level of average particle. **e** Computed projection of a dimer from the cryo-TEM density map of bacterial TSPO (Khorkov et al. 2010). **f** Schemes depicting the dimer of bacterial TSPO represented either by two *circles* or two *ellipses* enclosed in a *rectangle* with rounded corners. **g** Schemes depicting overall size of average image of recombinant TSPO enclosing either three or four putative monomers

In bacterial TSPO crystals, lipid-inserted TSPO dimers are associated in a ring and proteolipid tubes are formed by ring stacking. The 3D structure shows close interactions in a ring between dimers at the level of TM helices, but some space between dimers, suggesting the interactions of loops (Korkhov et al. 2010). The rings are stacked with a rotation from one ring to the neighboring ring. Interactions

UNCORRECTED

Author's Proof !

involved in the stabilization of adjacent rings within the tube are not well understood because no atomic structure is available. It may involve the C-terminal region that contains the poly-histidine tag. The crystal structure may suggest a dimeric association as a functional unit, but could not exclude higher degrees of polymerization. The functional interpretation of bacterial TSPO arrangement is rather complex and depends on the functional unit considered. Substrate translocation can occur within the core of a monomer; the presence of a dimer remains unexplained. Substrate translocation may occur at the interface of a dimer and thereby provide functional data for the existence of the dimer.

The structural determination of the mammalian TSPO is more complicated. The association observed in the particle can be due to close packing of proteins adsorbed under a functionalized monolayer. In this case, it often occurs through hexameric associations that minimize energy interactions, but the presence of a protein in the middle of the putative hexamer would be expected. The overall size would be greater than that measured. Both tetrameric and trimeric associations, which fit into the density, give a central hole that could accommodate substrate translocation. This would indicate a stoichiometry of one transported molecule per trimer or tetramer, and a possible cooperative mechanism for transport. No data are available to distinguish between these possibilities. It has been reported that mouse TSPO can form a covalent polymer in response to steroid and ROS production (Delavoie et al. 2003), but no unique polymeric stoichiometry has been described. The most common mechanism suggested for cholesterol transport activated by pharmacological ligands proposes the lowest stoichiometry of one cholesterol and one PK 11195-binding site per TSPO.

We cannot exclude that bacterial and mammalian TSPO have different unit associations because they have different functions. *Rhodobacter* TSPO regulates photosynthetic gene expression involving tetrapyrrole homeostasis (Yeliseev and Kaplan 2000). Mammalian TSPO regulates biosynthesis of steroids and bile salts involving cholesterol transport (Lacapere and Papadopoulos 2003). The cytosolic loop involved in PK 11195 binding is different in bacterial and mammalian TSPOs; bacterial TSPO is shorter and lacks residues important for the ligand binding.

14.3.4 Molecular Modeling

Bioinformatic- and molecular-modeling approaches are powerful tools to construct the atomic structure of proteins from X-ray crystallography, NMR spectroscopy, or amino acid sequence. For the first two approaches, experimental data are needed that are not available for TSPO. For the third approach, several structures have been modeled by sequence alignment and homology mapping with proteins of known atomic structure.

The first 3D model of TSPO was generated using molecular dynamics simulation and the bacteriorhodopsin atomic structure (Bernassau et al. 1993). In this model, the five helices are arranged clockwise from one to five (Fig. 14.16a). This model

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

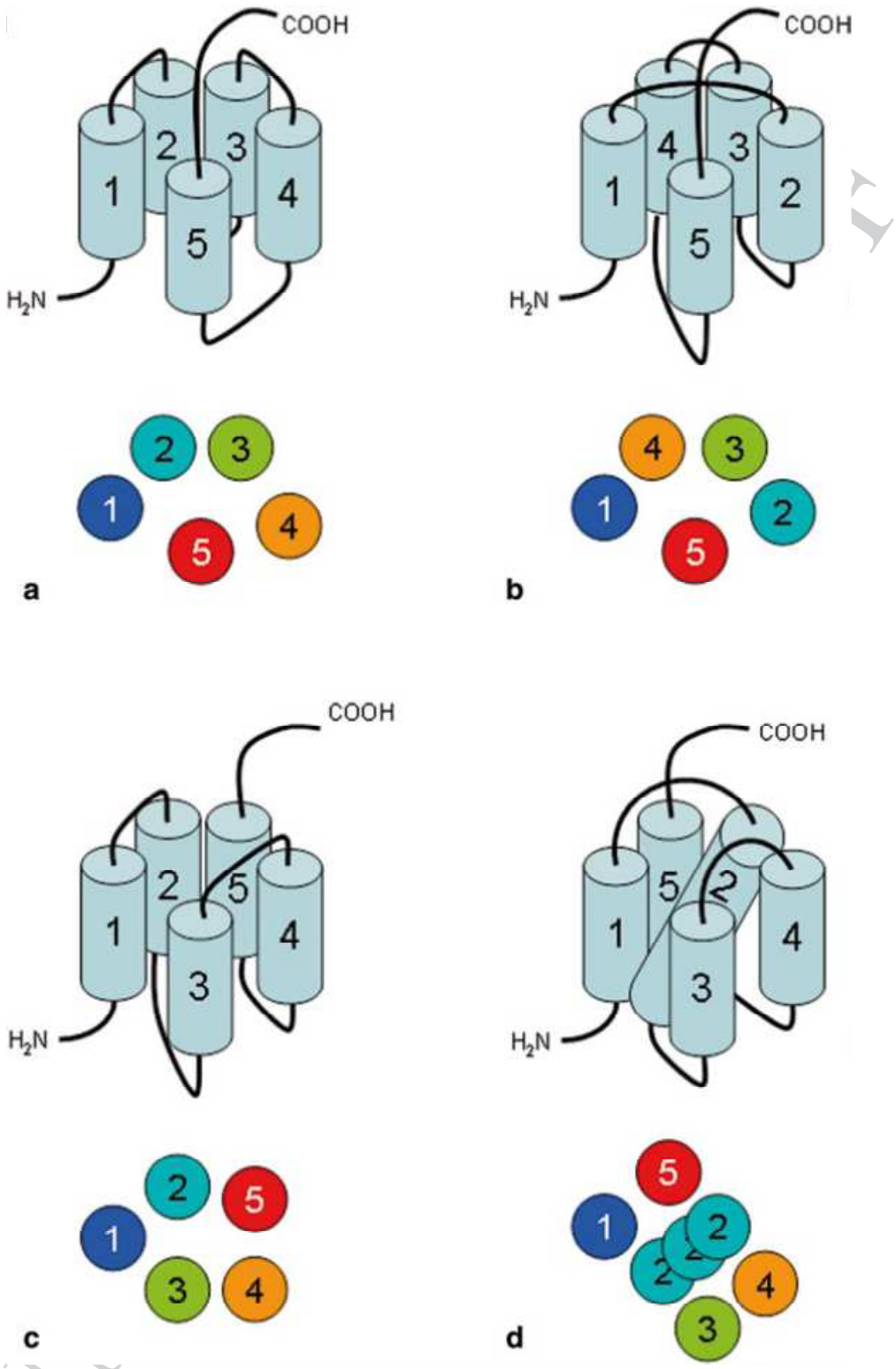


Fig. 14.16 Molecular modeling of TSPO. Schematic representation of different models that have been computed from existing 3D structures. **a** Bacteriorhodopsin (Bernassau et al. 1993), **b** apolipophorin III (Anzini et al. 2001), or *ab initio* from evolutionary sequence variations (**c** and **d**; Hopf et al. 2012). For each model, side view and top view are shown. The top view is from the C-terminal

Author's Proof !

for the human TSPO was used later to build another mammalian TSPO model after mutation of the human sequence to the mouse sequence (Culty et al. 1999). This approach positioned the TSPO ligand-binding site using a series of amino acid deletions and mutations that reduced the binding affinity for PK 11195 and cholesterol (Li and Papadopoulos 1998). The binding of PK 11195 involved external loops and the C-terminal region of TSPO. The binding of cholesterol was proposed to occur at the CRAC domain (Li and Papadopoulos 1998), and it was passed through a channel located in the middle of the bundle made by the five TM helices (Ruppecht et al. 2010).

Another TSPO model was built by considering the structural restraints drawn by the apolipophorin III for the TM region and the myohemerythrin for the first loop, whereas the third loop was modeled ab initio (Anzini et al. 2001). In this full-length model, the five helices are not in a clockwise sequence, because the positions of TM2 and TM4 permutated in agreement with the apolipophorin structure (Fig. 14.16b). The main consequence is that the exit of the channel in the middle of the bundle made by the five TM helices might be closed more tightly on the N-terminal side by the short loops connecting TM2–TM3 and TM4–TM5. On the opposite side, the loops connecting TM1–TM2 and TM3–TM4 were used to analyze mutations that affect ligand binding and the interaction of different chemical classes of ligands that are not structurally related (Anzini et al. 2001). The flexibility of these loops is sufficient to open and close the entrance of the putative channel, especially if cholesterol binds on the CRAC domain located in a groove at the C-terminus of TSPO (Jamin et al. 2005).

Several publications have described 3D protein structure computed from evolutionary sequence variation (Marks et al. 2011). This was applied recently to human TSPO; two different 3D models were proposed (Hopf et al. 2012), and two distinct TM topologies have been proposed (Fig. 14.16c, d). The former model does not show a sequential clockwise position of the five TM, because the positions of TM3 and TM5 have been permutated (Fig. 14.16c). The exit of the putative channel for cholesterol might be closed on the N-terminal side of TSPO. The later model is more distinct because it suggests a highly tilted TM2 that completely occupies the putative channel for cholesterol. Thus, it implies a completely different mechanism for cholesterol transport.

All these models are very useful to produce a 3D structure of TSPO, but no model is based on experimental data from the TSPO family. They may help to resolve amino acid mutations, but they cannot be used to simulate transport by TSPO. There is still a need for the first atomic structure of any TSPO.

Acknowledgments We would like to thank S. Beaufils, G. Bolbach, F. Delavoie, J. Fan, C. Galvagnion, N. Jamin, P. Montaville, H. Li, S. Murail, J. M. Neumann, M. A. Ostuni, J. C. Robert, S. Sagan, J. C. Taveau, D. Teboul, V. Vie, C. Venien, and Z. X. Yao, who participated in the course of this investigation of TSPO overexpression and structure determination. This work was supported with funds from the Institute National de la Santé et de la Recherche Medical, the Centre National de la Recherche Scientifique, the French National Agency for Research (ANR BLAN-0190-01), and the Canadian Institutes of Health Research.

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

References

Anzini M, Cappelli A, Vomero S, Seeber M, Menziani MC, Langer T, Hagen B, Manzoni C, Bourguignon JJ (2001) Mapping and fitting the peripheral benzodiazepine receptor binding site by carboxamide derivatives. Comparison of different approaches to quantitative ligand-receptor interaction modeling. J Med Chem 44:1134–1150

AQ3 Baneres JL, Popot JL, Mouillac B (2011) New advances in production of G-protein-coupled receptors. Trends Biotechnol 29:314–322

Barrera NP, Di Bartolo N, Booth PJ, Robinson CV (2008) Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum. Science 321:243–246

Bernassau JM, Reversat JL, Ferrara P, Caput D, LeFur G (1993) A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport. J Mol Graph 11:236–244

AQ4 Cinone N, Holtje HD, Carotti A (2000) Development of a unique 3D interaction model of endogenous and synthetic peripheral benzodiazepine receptor ligands. J Comput Aided Mol Des 14(8):753–768

Culty M, Li H, Boujrad N, Amri H, Vidic B, Bernassau JM, Reversat JL, Papadopoulos V (1999) In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol 69:123–130

Das BB, Nothnagel HJ, Lu GJ, Son WS, Tian Y, Marassi FM, Opella SJ (2012) Structure determination of a membrane protein in proteoliposomes. J Am Chem Soc 134(4):2047–2056

Delavoie F, Li H, Hardwick M, Robert JC, Giatzakis C, Peranzi G, Yao ZX, Maccario J, Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003) In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. Biochemistry 42(15):4506–4519

Fan J, Lindemann P, Feuilloley MG, Papadopoulos V (2012) Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa). Curr Mol Med 12(4):369–386

Galvagnion C, Montaville P, Coïc YM, Jamin N (2013) Production and initial structural characterization of the TM4TM5 helix-loop-helix domain of the translocation protein. J Pept Sci 19(2):102–109

Garnier M, Dimchev AB, Boujrad N, Price JM, Musto NA, Papadopoulos V (1994) In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. Mol Pharmacol 45:201–211

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) The proteomic protocols handbook. Humana, Totowa, pp 571–607

Ginter C, Kiburu I, Boudker O (2013) Chemical catalysis by the translocator protein (18 Kda). Biochemistry 52(21):3609–3611

Goormaghtigh E, Gasper R, Bénard A, Goldsztein A, Raussens V (2009) Protein secondary structure content in solution, films and tissues: redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra. Biochim Biophys Acta 1794(9):1332–1343

Guerrero SA, Hecht HJ, Hofmann B, Biebl H, Singh M (2001) production of selenomethionine-labelled proteins using simplified culture conditions and generally applicable host/vector systems. Appl Microbiol Biotechnol 56:718–723

Guillaumot D, Guillon S, Morsomme P, Batako H (2009) The Arabidopsis TSPO-related protein is a stress and abscisic acid-regulated, endoplasmic reticulum–Golgi-localized membrane protein. Plant J 60:242–256

Hielscher R, Friedrich T, Hellwig P (2011) Far- and mid-infrared spectroscopy analysis of the substrate-induced structural dynamics of respiratory complex I. Chemphyschem 12(1):217–224

Hopf TA, Colwell LJ, Sheridan R, Rost B, Sander C, Marks DS (2012) Three-dimensional structures of membrane proteins from genomic sequencing. Cell 149:1607–1621

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

Issop L, Rone MB, Papadopoulos V (2012) Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. Mol Cell Endocrinol 371(1-2):34–46

Jamin N, Lacapère JJ (2007) Circular dichroism as a tool for controlling membrane protein folding or structural modifications. In: Pebey-Peyroula E (ed) Biophysical analysis of membrane proteins. Investigating structure and function. Wiley-VCH, Weinheim, pp 243–258

Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, Murail S, Robert JC, Giatzakis C, Papadopoulos V, Lacapere JJ (2005) Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. Mol Endocrinol 19(3):588–594

Joseph-Liauzin E, Delmas P, Shire D, Ferrara P (1998) Topological analysis of the peripheral benzodiazepine receptor in yeast mitochondrial membranes supports a five-transmembrane structure. J Biol Chem 273(4):2146–2152

Kragh-Hansen U, Le Maire M, Moller J (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. Biophys J 75:2932–2946

Korkhov VM, Sachse C, Short JM, Tate CG (2010) Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. Structure 18:677–687

Lacapere JJ (2010) Membrane protein structure determination: methods and protocols. Methods in molecular biology, vol 654. Humana, New York

Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol binding protein. Steroids 67:569–585

Lacapere JJ, Delavoie F, Li H, Peranzi G, Maccario J, Papadopoulos V, Vidic B (2001) Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. Biochem Biophys Res Comm 284:536–541

Lacapère JJ, Peybay-Peyroula E, Neumann JM, Etchebest C (2007) Determining membrane proteins structures: still a challenge! Trends Biochem Sci 32(6):259–270

Li H, Papadopoulos V (1998) Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. Endocrinology 139:4991–4997

Li F, Hiser C, Ferguson-Miller S (2012) Expression, purification and characterization of bacterial and human translocator protein 18 kDa (TSPO). Biophys J 102(3):247a–248a

Marassi FM, Bibhuti BB, Lu GJ, Nothnagel HJ, Park SH, Son WS, Tian Y, Opella SJ (2012) Structure determination of membrane proteins in five easy pieces. Methods 55:363–369

Marks DS, Colwell LJ, Sheridan R, Hopf TA, Pagnani A, Zecchina R, Sander C (2011) Protein 3D structure computed from evolutionary sequence variation. PLoS One 6(12):e28766

Montaville P, Jamin N (2010) Determination of membrane protein structures using solution and solid-state NMR. Methods Mol Biol 654:261–282

Murail S, Robert JC, Coïc YM, Neumann JM, Ostuni MA, Yao ZX, Papadopoulos V, Jamin N, Lacapère JJ (2008) Investigating the structural properties of the translocator protein TSPO by CD and NMR. Ligand binding induces conformational changes. Biochim Biophys Acta 1778(6):1375–1381

Ostuni MA, Péranzi G, Ducroc RA, Fasseu M, Vidic B, Dumont J, Papadopoulos V, Lacapere JJ (2009) Distribution, pharmacological characterization and function of the 18 kDa translocator in rat small intestine. Biol Cell 101(10):573–586

Ostuni MA, Harbi-Iatmamen S, Teboul D, Robert JC, Lacapere JJ (2010) Characterization of membrane protein preparations: measurement of detergent content and ligand binding after proteoliposomes reconstitution. Method Mol Biol 654:3–18

Park SH, Bibhuti BB, Casgrande F, Tian Y, Nothnagel HJ, Chu M, Kiefe H, Maier K, De Angelis AA, Marassi FM, Opella SJ (2012) Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipids bilayers. Nature 491:779–784

Parola AL, Stump DG, Pepper DJ, Krueger KE, Regan JW, Laird HE (1991) Cloning and expression of a pharmacologically unique bovine periphera-type benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein. J Biol Chem 268(21):14082–14087

Papadopoulos V, Miller WL (2012) Role of mitochondria in steroidogenesis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 26(6):771–790

UNCORRECTED PROOF

Author's Proof !

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Linemann P, Noenberg MD, Nutt D, Weizman A, Ahang MR, Gavish M (2006) Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. Trends Pharmacol Sci 27(8):402–409

Pebay-Peyroula E (2007) Biophysical analysis of membrane protein. Wiley-VCH, Hoboken

Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD (2012) The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 40(D1):D290–D301

Rigaud JL, Pitard B, Levy D (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. Biochim Biophys Acta 1231:223–246

Riond J, Laplatois P, Laurent P, le Fur G, Caput D, Loison G, Ferrara P (1991) Expression and pharmacological characterization of the human peripheral-type benzodiazepine receptor in Yeast. Eur J Pharmacol 208(4):307312

Robert JC, Lacapere JJ (2010) Bacterial overexpressed membrane proteins: an example, the TSPO. Method Mol Biol 654:29–45

Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, Ye X, Blonder J, Veenstra T, Papadopoulos V (2012) Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. Mol Endocrinol 26(11):1868–1882

Ruppecht R, Papdopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M (2010) Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov 9:971–988

Sagan S, Bolbach G (2009) Analyse des protéines membranaires par spectrométrie de masse: toujours un amour impossible? Spectra Anal 270:19–21

Sprengel R, Werner P, Seeburg PH, Mukhin A, Santi RS, Grayson DR, Guidotti A, Krueger KE (1989) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. J Biol Chem 264(43):20415–20421

Sreerama N, Woody RW (2004) On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. Protein Sci 13:100–112

Tate CG, Schertler GFX (2009) Engineering G protein-coupled receptors facilitate their structure determination. Curr Opin Struct Biol 19:386–395

Teboul D, Beaufils S, Taveau JC, Iatmanen-Harbi S, Renault A, Venien-Bryan C, Vié V, Lacapere JJ (2012) Mouse TSPO in a lipid environment interacting with a functionalized monolayer. Biochim Biophys Acta 1818:2791–2800

Verma A, Nye JS, Snyder SH (1987) Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripherl-type) benzodiazepine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 84:2256–2260

Weingarth M, Demco DE, Bodenhausen G, Tekely P (2009) Improved magnetization transfer in solid-state NMR with fast magic angle spinning. Chem Phys Lett 469:342–348

Weingarth M, Tekely P, Brüschweiler R, Bodenhausen G (2010) Improving the quality of 2D solid-state NMR spectra of microcrystalline proteins by covariance analysis. Chem Commun 46:952–954

Wendler G, Lindemann P, Lacapère JJ, Papadopoulos V (2003) Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR. Biochem Biophys Res Commun 311(4):847–852

Yeliseev AA, Kaplan S (1995) A sensory transducer homologous to the mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor regulates photosynthetic membrane complex formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J Biol Chem 270(36):21167–21175

Yeliseev AA, Kaplan S (1999) A novel mechanism for the regulation of photosynthesis gene expression by the TspO outer membrane protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J Biol Chem 274(30):21234–21243

UNCORRECTED PROOF

Chapter 14: Author Query

AQ1. We have changed the citations “Issop et al. (2013), Yeliseev et al. (1999), Joseph-Liauzin et al. (1995), Sreerama et al. (2004), Baneres et al. (2012), Tate et al. (2009), Marassi et al. (2012), Lacapere et al. (2010), Hopf et al. (2013) and Papadopoulos et al. (2012)” to match the reference. Please check.

AQ2. The following citations are not in the reference list “Mouillac and Baneres (2010), Vigano et al. (2004), Neehaul et al. (2013), Yeliseev and Kaplan (2000)”. Please provide the references or delete the citations from the text.

AQ3. We have updated the journal name in reference “Baneres et al. 2011”. Please check.

AQ4. The reference “ Cinone et al. (2000)” is not cited in the text. Please provide the citation or delete the reference from the reference list.