NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 15 Octobre 2024 par

Elodie LAFARGUE

Fonction Dynamique des Interactions Protéine-Lipide Membranaires par Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Biochimie Structurale

École doctorale
ED62 Sciences de la Vie et de la Santé

Partenaires de recherche
DyNaMo lab
Aix-Marseille Université
INSERM

Composition du jury

Stéphanie MANGENOT	Rapporteuse
Professeur – Université Paris Cité/CNRS	
Jean-Luc PELLEQUER	Rapporteur
Directeur de recherche – IBS/Université Grenoble Alpes/CEA/CNRS	
Patricia LOSADA-PEREZ	Examinatrice
Professeur – Université Libre de Bruxelles	
Frank LAFONT	Examinateur
Directeur de recherche – Institut Pasteur de Lille/CNRS	
Agnès GIRARD-EGROT	Présidente du jury
Professeur – Université Claude Bernard Lyon 1/ICMBS/CNRS	
Félix RICO	Directeur de thèse
Maitre de conférence – AMU/CENTURI	
Ignacio CASUSO	Co-directeur de thèse
Chargé de recherche – INSERM/AMU	
Laura PICAS	Membre invitée
Chargée de recherche – IRIM/CNRS	

Affidavit

Je soussigné, Elodie LAFARGUE, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Dr. Félix RICO et Dr. Ignacio CASUSO, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 15 octobre 2024.

Lafargue Elodie



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et des participation aux conférences/diffusion scientifique

1. Liste de publications réalisées dans le cadre de mon projet de thèse :

1. **Soumis** Elodie Lafargue, Jean-Pierre Duneau, Nicolas Buzhinsky, Pamela Ornelas, Alexandre Ortega, Varun Ravishankar, James Sturgis, Ignacio Casuso, Lucie Bergdoll Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1, bioRxiv 2024.06.26.597124; doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124
2. ***En cours*** The ancient mechanism of membrane compartmentation of the glycosyltransferase enzyme MurG discovered by HS-AFM.
3. ***En cours*** Lysenin curvature induces stiffening.

2. Liste des participations aux conférences et écoles d'été au cours de ma période de thèse :

1. EMBO Worshop Physics of Living systems: From molecules to tissues 2021 (virtual workshop - poster).
2. 8th International Iberian Biophysics Congress 2022 (Bilbao, Espagne – poster).
3. Doctoral School colloquium 2022 (Marseille, France – poster).
4. 2nd MOSBRI Scientific Conference 2023 (Zaragoza, Spain – poster) – Grant MOSBRI23
5. EBSA Congress 2023 (Stockholm, Suède – poster) – Exceptional grant awarded by the Société Française de Biophysique (SFB)
6. BSI Congrès 2023 (Marseille, France – poster)
7. ESAB Congress 2024 (San Sebastian, Espagne – Talk).

3. Liste des participations aux événements et programmes de Vulgarisation scientifique :

1. Animation d'un stand à la « Fêtes de la Science (participation depuis 2019 à travers le laboratoire) : Présentation de la microscopie à force atomique (stand ou virtuel à travers des jeux.
2. Intervention « Chercheur.se en classe » dans des collèges et lycées depuis 2021 (20aine d'interventions) : présentation du monde de la recherche, de mon projet de

thèse et de mon parcours universitaire (1h/classe, en moyenne 3 classes/intervention).

3. Déclics2021 & 2022 : Intervention dans des lycées pour parler du métier de chercheurs (speed-searching).
4. Expérimentarium 2021 (Dijon) : Evènement d'une semaine avec différentes interventions et animations dans les établissements scolaires et dans les rues de la ville de Dijon.
5. Projet « Transfert » 2023 : Suivi de 2 classes (2 collèges de Marseille) dans une démarche scientifiques pendant 5 séances avec une reconstitution finale – film d'animation.
6. Nuit européenne des Chercheurs 2022 et 2023 : organisation de l'évènement et encadrement d'ateliers par l'Université Aix-Marseille.
7. Souk des Sciences 2022 et 2023 (Centre commercial Avant-Cap) : animation d'un stand sur les statistiques (2022) et sur la bioinformatique (2023).
8. Pint of Science Marseille 2023 : Animation d'une soirée sur l'AFM et ces utilisations.

Résumé

Les interactions entre les lipides et les protéines dans les membranes cellulaires sont cruciales pour maintenir leur structure et leurs fonctions essentielles. Malgré les avancées technologiques, notre compréhension des impacts de ces interactions protéine-lipide reste incomplète. Bien que l'impact de l'environnement lipidique sur la structure et la fonction des protéines membranaires soit largement reconnu, l'inverse demeure mal comprise. Les travaux réalisés vise à explorer ces interactions complexes, élucider les mécanismes fondamentaux régissant les interactions protéines – lipides et leur importance dans divers processus biologiques. Pour cela, différentes protéines membranaires ont été étudiées: MurG, VDAC1 ou la Lysénine. La principale technique utilisée a été la Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse (HS-AFM), une technique offrant une haute résolution spatio-temporelle dans des conditions physiologiques, permettant d'obtenir des films des protéines en action. Cette approche a permis de mettre en avant l'implication de MurG, une protéine bactérienne, dans le processus de partitionnement de la membrane ; l'impact de l'environnement lipidique sur l'oligomérisation du canal ionique mitochondriale VDAC1 ; ou encore, démontrer la capacité de la Lysenine toxine formant-pore, à induire la courbure de la membrane grâce au mode de cartographie mécanique. De plus, une partie de cette thèse a impliqué un développement technologique pour imiter les conditions conditions physiologiques par l'utilisation de mica nanoporeux et en développant un système générant un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane autosupportée. Ces travaux sur les interactions protéine-lipide membranaires mettent en avant le rôle des protéines sur l'activité des lipides membranaires, et inversement, tout en ouvrant de nouvelles perspectives pour les applications biomédicales.

Mots clés : microscopie à force atomique à haute vitesse, interaction protéine-protéine, protéines membranaires, lipides, mica nanoporeux, voltage transmembranaire.

Abstract

The interactions between lipids and proteins in cell membranes are crucial for maintaining their structure and essential functions. Despite technological advances, our understanding of the impacts of these protein-lipid interactions remains incomplete. While the impact of the lipid environment on the structure and function of membrane proteins is widely recognized, the reverse remains poorly understood. The work carried out aims at elucidate the fundamental mechanisms governing protein-lipid interactions, and their importance in various biological processes. To achieve this, different membrane proteins were explored: MurG, VDAC1 and Lysenin. The main technique used was High-Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM), a technique offering high spatio-temporal resolution under physiological conditions, providing films of proteins in action. This approach has highlighted the involvement of MurG, a bacterial protein, in the membrane partitioning process; the impact of the lipid environment on the oligomerization of the mitochondrial ion channel VDAC1; and demonstrated the ability of the pore-forming toxin Lysenin to induce membrane curvature thanks to mechanical Jumping mode. Additionally, part of this thesis involved technological development to mimic physiological conditions through the use of nanoporous mica and by developing a system generating an electrochemical gradient across the self-supported membrane. These studies on membrane protein-lipid interactions highlight the role of proteins in the activity of membrane lipids, and vice versa, while opening new perspectives for biomedical applications.

Key words: high-speed atomic force microscopy, protein-protein interaction, membranes, membrane proteins, lipids, mica nanoporous, transmembrane voltage.

Remerciements

Sommaire

Table des matières

Affidavit 1

Liste de publications et des participation aux conférences/diffusion scientifique 2

1. Liste de publications réalisées dans le cadre de mon projet de thèse : 2
2. Liste des participations aux conférences et écoles d'été au cours de ma période de thèse : 2
3. Liste des participations aux événements et programmes de Vulgarisation scientifique : 2

Résumé 4

Abstract 5

Remerciements 6

Sommaire 7

Liste des Figures 10

1. Liste des Figures 10
2. Liste des Tableaux 11

Liste des abréviations 12

Introduction 3

1. Membrane biologique 3
   - 1.1. Structure et organisation des membranes biologiques 5
     - 1.1.1 Lipides membranaires 6
     - 1.1.2. Protéines membranaires 9
   - 1.2. Propriétés biophysiques des membranes biologiques 13
     - 1.2.1. Forces électrostatiques 13
     - 1.2.2. Fluidité membranaire 14
     - 1.2.3. Transition de phase et compactage lipidique 15
     - 1.2.4. Courbure membranaire 17
     - 1.2.5. Potentiel membranaire 20
   - 1.3. Interactions protéines – lipides 23
2. Outils pour étudier les interactions protéines – lipides 24

2.1. Systèmes modèles membranaires 24
2.1.1. Monocouche de Langmuir 25
2.1.2. Vésicules lipidiques 26
2.1.3. Bicouches lipidiques supportées 27
2.1.4. Protéoliposomes 28
2.2. Outils pour étudier les interactions protéines – lipides 28
2.2.1. Microscopie à Fluorescence 29
2.2.2. Techniques structurales 31
2.2.3. Simulations de dynamique moléculaire 32
3. HS-AFM et interaction protéine-lipides. 33
3.1. La Microscopie à Force Atomique 33
3.2. La Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse 37
Objectifs de la Thèse 41
Méthode & Matériels 44
1. HS-AFM et acquisition des images 44
2. Traitement / Analyse des données HS-AFM 45
3. Préparation des échantillons 46
3.1. Formation des liposomes type SUVs et des SLBs 46
3.2. Incubation des protéines 48
3.2.1. Chapitre 1 : The ancient mechanism of membrane compartmentation of the glycosyltransferase enzyme MurG discovered by HS-AFM. 48
3.2.2. Chapitre 2 : Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1. 49
3.2.3. Chapitre 3 : Lysenin induces curvature membrane. 49
3.2.4. Chapitre 4 : Gradient 49
3.3. Mica perforées 50
Chapter I : 54
The ancient mechanism of membrane compartmentation of the glycosyltransferase enzyme MurG discovered by HS-AFM 54
1. Introduction 54
2. Materials 58
2.1. MurG protein & UDP-GlcNAc substrate 58

2.2. Sample preparation 58
2.3. Change of the composition of the experiment's solution during the imaging ... 59
2.4. Dynamical imaging..... 59
3. Bacterial MurG membrane proteins can modulate lipid fluidity for compartmentation 60
Résumé..... 60
4. Conclusion..... 61
5. Contribution to the work..... 61
Chapter II : 63
Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1 63
1. Introduction 63
2. Materials 66
2.1. Proteoliposome of VDAC1 66
2.1.1 VDAC production and purification..... 66
2.1.2. Reconstitution into liposomes 66
2.2. Sample prepration 67
2.3. Dynamical imaging..... 67
3. VDAC1 diffuses into EggPC membrane 68
3.1. Contexte 68
3.2. Results & Discussion 68
4. Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1 70
5. Conclusion..... 94
6. Contribution to the work..... 94
Conclusion générale et perspectives 96
Mission complémentaire :..... 99
Vulgarisation scientifique..... 99
Bibliographie..... 101

Liste des Figures

1. Liste des Figures

Figure 1 : **Représentation d'une cellule eucaryote.**

Figure 2 : **Représentation schématique de la membrane biologique.**

Figure 3 : **Structure des lipides membranaires.**

Figure 4 : **Les protéines membranaires.**

Figure 5 : **Interrelation entre le lipidome membranaire, la structure – fonction des protéines et les propriétés biophysiques de la membrane.**

Figure 6 : **Asymétrie de la composition lipidique de la membrane cellulaire.**

Figure 7 : **Représentation du polymorphisme lipidique.**

Figure 8 : **Transition de phase et nanodomaines.**

Figure 9 : **Les différents mécanismes responsable de la courbure membranaires**.

Figure 10 : **Potentiel membranaire et potentiel d'action.**

Figure 11 : **Les lipides régulent les processus biologiques médiés par les protéines.**

Figure 12 : **Représentations schématiques des modèles membranaires in vitro.**

Figure 13 : **Vésicules et bicouche lipidique supportée.**

Figure 14 : **La Microscopie à fluorescence : principe et microscope.**

Figure 15 : **Principe de la Microscopie à Force Atomique (AFM).**

Figure 16 : **Représentation schématique d'une courbe de force.**

Figure 17 : **Chronologie montrant différentes techniques combinées à l'AFM.**

Figure 18 : **La Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse (HS-AFM).**

Figure 19 : **Le Microscope à Force Atomique à Haute Vitesse.**

Figure 20 : **Préparation des liposomes et des bicouches lipidiques supportées en AFM.**

Figure 21 : **Caractérisation de la surface de substrats de mica nanoporeux.**

Figure 22 : **Comparison of bacterial cell wall structure.**

Figure 23 : **Presentation of MurG protein.**

Figure 24 : **VDAC is a major transport channel of the mitochondrial outer membrane (MOM).**

Figure 25 : **VDAC1 diffuses into the EggPC membrane.**

Figure 26 : **VBIT-4 perturbs biomimetic MOM membrane.**

Figure 27 : **Structure and oligomerisation of the Lysenin protein.**

Figure 28 : **Lysenin bends the membrane.**

Figure 29 : **A difference in stiffness between the prepore and pore states.**

Figure 30 : **Oligomers of Lysenin on free-standing bilayer.**

Figure 31 : **Electrochemical gradient and biological membrane.**

Figure 32 : **Proof of concept: Bacteriorhodopsin and purple membrane on free-standing bilayer.**

Figure 33 : **Annexin V on free-standing bilayer.**

Figure 34 : **Verification of the creation of an electrochemical gradient by Fluorescence method.**

2. Liste des Tableaux

Tableau 1 : **Composition majeure des lipides détectée dans les membranes cytoplasmiques de quelques bactéries Gram positif.**

Tableau 2 : **Composition lipidique des différentes SUVs produites et utilisées pour chaque projet associé.**

Table 3 : **Lipid composition of Membrane Outer Mitochondrial (MOM).**

Liste des abréviations

A5 : Annexin 5

AFM : microscopie à force atomique

β-OG : n-Octyl-Beta-D-Glucopyranoside

BAM : microscopie à l'angle de Brewster

bR : Bactériorhodopsine

BRET : bioluminescence resonance energy transfer

Ca^{2+} : calcium

Chol : cholestérol

CL ou CA : cardiolipine

Cl- : chlorure

CLAFEM : microscopie électronique à force atomique à lumière corrélative

Cryo-ET : tomographie cryo-électronique

Cryo-MET : cryo-Microscopie électronique à transmission

Dap : Daptomycine

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPG : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPG : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

E : gradient électrochiique

EggPC : phosphatidylcholine d'œuf

ER : réticulum endoplasmique

$f_{resonance}$: fréquence de résonance

GFP : Green Fluorescent Protein

GPLs : glycérophospholipides

GUVs : vésicules unilamellaires géantes

Hexagonale I : HI

Hexagonale II : HII

HS-AFM : microscopie à force atomique à haute vitesse

k : constante de raideur

K+ : potassium

Lasp : Laspartomycine

Ld : liquide désordonné

Lo : liquide ordonnée

LUVs : vésicules unilamellaires larges

Lysyl-PG : lysyl-phosphatidylglycerol

MAM : mitochondria-associated membrane

MD : (simulation de) dynamique moléculaire

ME : microscopie électronique

Mica30 : mica nanoporeux de 30nm

Mica60 : mica nanoporeux de 60nm

Mica90 : mica nanoporeux de 90nm

MLVs : vésicules multilamellaires

MOM : membrane externe mitochondriale

MPs : protéines membranaires

MS : spectroscopie de masse native

MVV : vésicules multivésiculaires

Na+ : sodium

NAG : *N* -acetylglucosamine

NAM : *N* -acetylmuramic acid

NL : neutral lipid

NSOM : microscopie optique en champ proche

OLVs : vésicules oligolamellaires

PA : acide phosphatidique

PALM : microscopie par localisation photo-activable

PC : phosphatidylcholine

PDB : Protein Data Bank

PE : phosphatidyléthanolamine

PFTs : Pore-Forming Toxines

PG : phosphatidylglycérol

PI : phosphatidylinositol

PIP :phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PLs : protéoliposomes

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

PS : phosphatidylsérine cardiolipine.

RIFs : régions de fluidité accrue

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE : résonance paramagnétique électronique

SLs : sphingolipides

SLBs : Supported Lipid Bilayers

SPR : résonance plasmon de surface

SUVs : petites vésicules unilamellaires

SIM : microscopie à illumination structuré

SM : sphingomyéline

STED : microscopie à déplétion par émission stimulée

STORM : microscopie de reconstitution optique stochastique

T_m : température de fusion

TIRFM : microscopie à réflexion interne totale

UDP-GlcNAc :

UVs : vésicules unilamellaires

VDAC : voltage-dependent anion channel

X-rays : cristallographie aux rayons X

Introduction

1. Membrane biologique

Chaque cellule est entourée d'une membrane biologique. La membrane est un élément essentiel dans tout être vivant, elle agit comme barrière séparant l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Elle joue également un rôle dans la communication entre deux cellules voisines (transmission de signaux) et dans l'adhésion cellulaire. Une estimation sommaire indique que l'ensemble des membranes cellulaires de notre corps couvrirait une superficie d'environ trois hectares[1].

Chez les eucaryotes (présence d'un noyau) en Figure 1, la membrane plasmique protège et sépare le cytosol de l'environnement extérieur et des compartiments cellulaires internes (organelles), tels que le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi, la mitochondrie et les vésicules. Ainsi, la membrane plasmique possède deux rôles : (i) morphologique, en délimitant physiquement la cellule de son environnement extérieur et en protégeant les organelles et les parties internes de la cellule, et (ii) fonctionnel, en tant que barrière perméable, elle contrôle les mouvements des molécules à travers la membrane tels que les nutriments, l'oxygène et le dioxyde de carbone ou l'eau[2]. On trouve également une importante quantité de membranes à l'intérieur même d'une cellule eucaryote, où elles délimitent les compartiments intracellulaires des différentes organelles.

A contrario, chez les procaryotes (sans noyau), la membrane plasmique est une structure interne, protégée par une paroi cellulaire et dans certains cas d'une membrane externe (ou capsule) supplémentaire, qui joue un rôle important dans la régulation de l'entrée et de la sortie de toute substance. A noter que chez les procaryotes, la membrane plasmique est composée d'une plus petite variété de lipides[3].

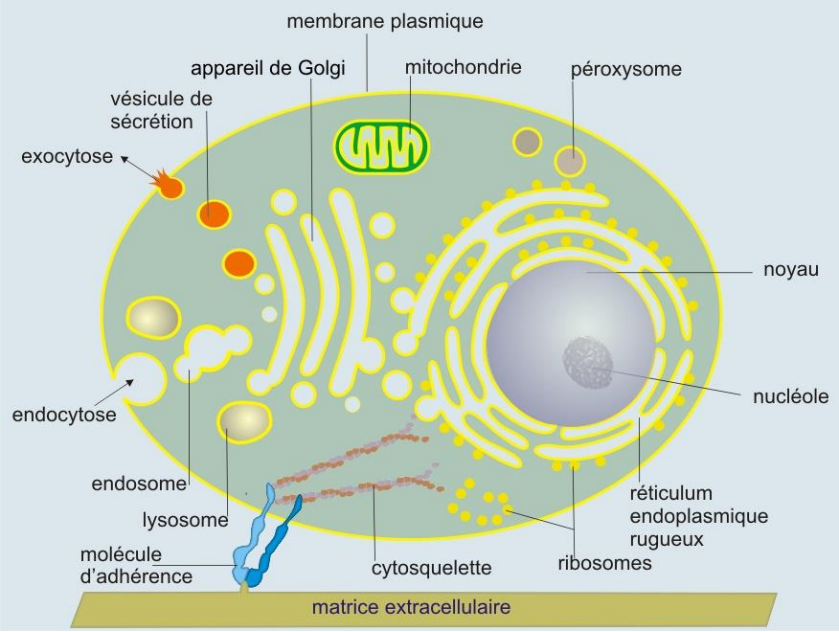


Figure 1 : **Représentation d'une cellule eucaryote.** Les membranes biologiques de la cellule et des organelles sont en jaune[4].

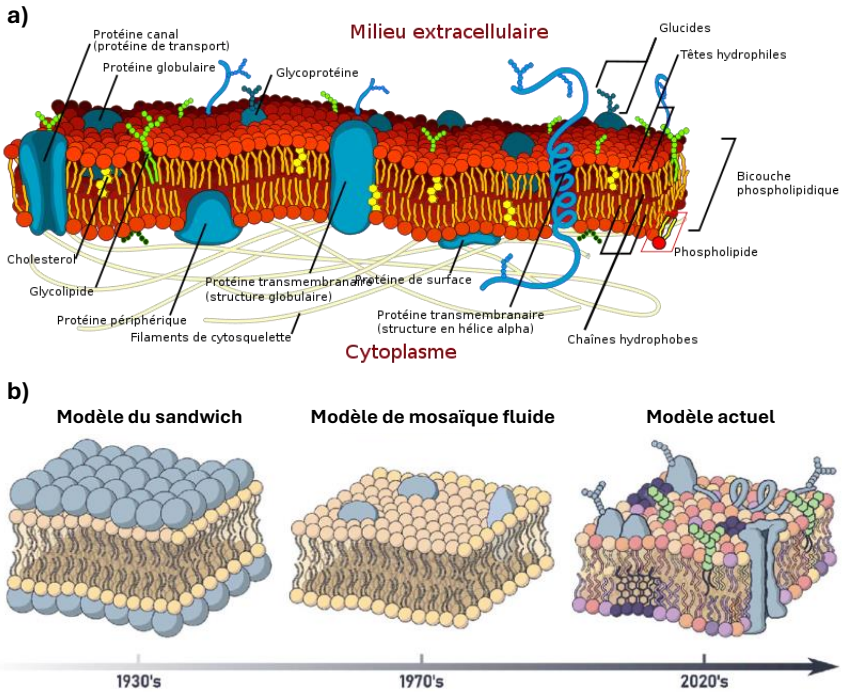


Figure 2 : **Représentation schématique de la membrane biologique. a)** Représentation de la membrane plasmique et des différents éléments qui la compose. **b)** Représentation des modèles lipidiques au cours du temps : des années 1930 avec le sandwich protéique de Davson et Danielli, le modèle de mosaïque fluide de Singer et Nicolson en 1972 et la vision actuelle des membranes biologiques (de gauche à droite) (*adapté de X. Chen et al.*[5]*)*.

1.1. Structure et organisation des membranes biologiques

Les membranes cellulaires sont essentielles au bon fonctionnement des cellules. Pour survivre, la cellule doit maintenir cette membrane opérationnelle. Tout cela est possible grâce aux différents rôles qu'assure la membrane[6] :

- Barrière : sépare l'intérieur et l'extérieur de la cellule et lui donne sa forme,
- Contact : médier les connections entres cellules
- Structurale : conserver le cytoplasme et les composants internes de la cellule en lui donnent la forme spécifique des cellules et des organelles
- Récepteur : recevoir les différents signaux provenant de leur environnement
- Transporteur : transporter quelques molécules telles que l'eau, les ions, les nutriments etc… à travers les transports membranaires actifs et passifs.

Ainsi, les membranes biologiques sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la production d'énergie (synthèse de l'ATP), le trafic membranaire et protéique, la signalisation cellulaire, l'adhésion cellulaire, etc…

Ces processus divers sont permis grâce à la composition des membranes cellulaires. Toutes les membranes biologiques partagent une structure commune : une myriade de molécules de lipides, de protéines et de glucides (respectivement, ≃ 50%, 40% et de 2-10% de la masse membranaire) organisées en double-feuillet hétérogènes et semi-perméables d'environ 5 nm d'épaisseur représentée en Figure 2a[5,7]. Les lipides sont les composants structurels des membranes biologiques, et la fonction de compartimentation des membranes leur en sont dévolue. Par contre, les fonctions actives de la membrane sont dépendant des protéines membranaires. A noter, que les glucides sont principalement liés de manière covalentes avec des lipides (glycolipides) ou des protéines (glycoprotéines). Chaque membrane, plasmatique ou de chaque organelle (mitochondrie, ER etc…), possède ainsi des fonctions différentes et donc le matériel et les molécules requises sont spécifiques aux processus cellulaires associés[2].

C'est en 1972, que le premier modèle fluide de la membrane biologique est schématisé sur le principe d'une membrane mosaïque fluide. Ce modèle simplifié représentait la membrane comme une plateforme lipidique dans laquelle les lipides diffusent à l'intérieur des bicouches en mouvement brownien et plus rapidement que les protéines membranaires[8]. Depuis, les connaissances se sont développés grâce à de nouvelles avancées techniques, et ce modèle a été reconnu comme incomplet comme montré en Figure 2b. La diversité moléculaire et l'impact des propriétés physicochimiques des lipides et des protéines sur la membrane biologique permettent de proposer un nouveau modèle. En effet, ce qui distingue le modèle actuel de l'ancien modèle est l'action essentielle et

coopérative des domaines dans la membrane qui sont hiérarchisés en trois niveaux : (i) compartiments induits par l'actine, la membrane et le cytosquelette (40-300 nm), (ii) les domaines des radeaux lipidiques (2-20 nm) et (iii) les domaines dynamiques induit par des complexe protéique (3-10 nm)[9].

Les membranes cellulaires ont deux caractéristiques bien distinctes : l'asymétrie résulte de la présence de protéines et de lipides différents dans les feuillets internes et externes de la bicouche pour le bon fonctionnement de la cellule ; la fluidité découlent des mouvements divers des lipides et des protéines[10].

1.1.1 Lipides membranaires

Les membranes biologiques présentent une grande diversité lipidique due (i) à la structure chimique des lipides cellulaires (conférant leurs propriétés physicochimiques spécifiques) et (ii) à la diversité de leur composition (ratio de différents lipides) au niveau des espèces, des tissus, des cellules, entre les différents organites cellulaires ou même entre les feuillets et sous-domaines membranaires[11]. Cette diversité influence les interactions lipides-lipides et protéines-lipides, et est crucial pour les fonctions membranaires. Les lipides membranaires jouent des rôles essentiels, notamment dans la modulation des fonctions des protéines, le stockage de composants membranaires, la production d'énergie et de chaleur, la signalisation cellulaire, le recrutement de protéines et comme substrats pour les modifications post-traductionnelles des protéines[2].

Contrairement, aux membranes plasmiques des procaryotes (seulement quelques types de phospholipides[3] Tableau 1), les cellules eucaryotes contiennent >1000 espèces différentes de lipides, classifiés en trois catégories[12] :

- glycérophospholipides (GPLs), incluant phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycérol (PG), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), acide phosphatidique (PA) et cardiolipine (CL).
- Sphingolipides (SLs), incluant sphingomyéline (SM) et glycosphingolipides.
- Stérols, principalement le cholestérol (Chol) chez les cellules de mammifères.

Tableau 1 : **Composition majeure des lipides détectée dans les membranes cytoplasmiques de quelques bactéries Gram positif.** Les lipides présents chez les bactéries : phosphatidylglycerol (PG), lysyl-phosphatidylglycerol (lysyl-PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL) and neutral lipids (NL) (*adapté de Malanovic et al.*[13]).

Organism	Morphology Cell/Colony	Weight Percentage of Total Lipid of Cell Membrane						
		PG	lysyl-PG	PI [a]	PE	CL	NL	Others [b]
Cocci	round/chain							
Staphylococcus aureus	round/cluster	43	30	-	-	22	-	5
Enterococcus faecium	round/diplococci	33.8	14.4	-	-	39	-	12.8
Streptococcus sanguis	round/diplococci	82	-	-	-	18	-	-
Streptococcus pneumoniae	round/cocci lancet shape	50	-	-	-	50	-	-
Actinomycetes	spherical pleomorph/filamentous							
Corynebacterium glutamicum	rods/V-shaped	72.4	-	13.1	-	14.1	-	0,4
Streptomyces hygroscopicus	rods, mycelium	-	-	7	36	16 [c]	30	11
Mycobacterium tuberculosis	long, slender rods/filamentous	-	-	13	5	6	54	22
Cell wall deficient	polymorph/fried egg							
Mycoplasma hominis [d]	round to oblong/fried egg	33	-	-	-	-	60	7
L-form *S. aureus*	polymorph/fried-egg	26	17	-	-	54		3
L-form *S. hygroscopicus*	polymorph/fried-egg	-	-	13	37	22	16	12
Bacilli	round-ended cylinders/ single or in chains							
Clostridium difficile	large, blunt-ended rods/ pairs or chains	100	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	Rods/chain	70	-	-	12	4	-	14
Listeria monocytogenes	slender, short rods/ single or in chains	29	23	-	9	22	-	17

[a] PI+PI mannosides; [b] "Others" corresponds mainly to glycolipids besides of traces of other lipids; [c] CL+CL derivatives;

Parmi les lipides chez les cellules eucaryotes, les phospholipides (glycérophospholipides et sphingolipides) sont les plus abondants et sont indispensables à toutes les membranes cellulaires et subcellulaires. Malgré une diversité lipidique structurelle, les phospholipides sont des molécules fortement amphiphiles constitués d'une structure commune : d'une région hydrophile (la tête polaire avec un groupe phosphate) et d'une région hydrophobe (la queue aliphatique) montré en Figure 3.

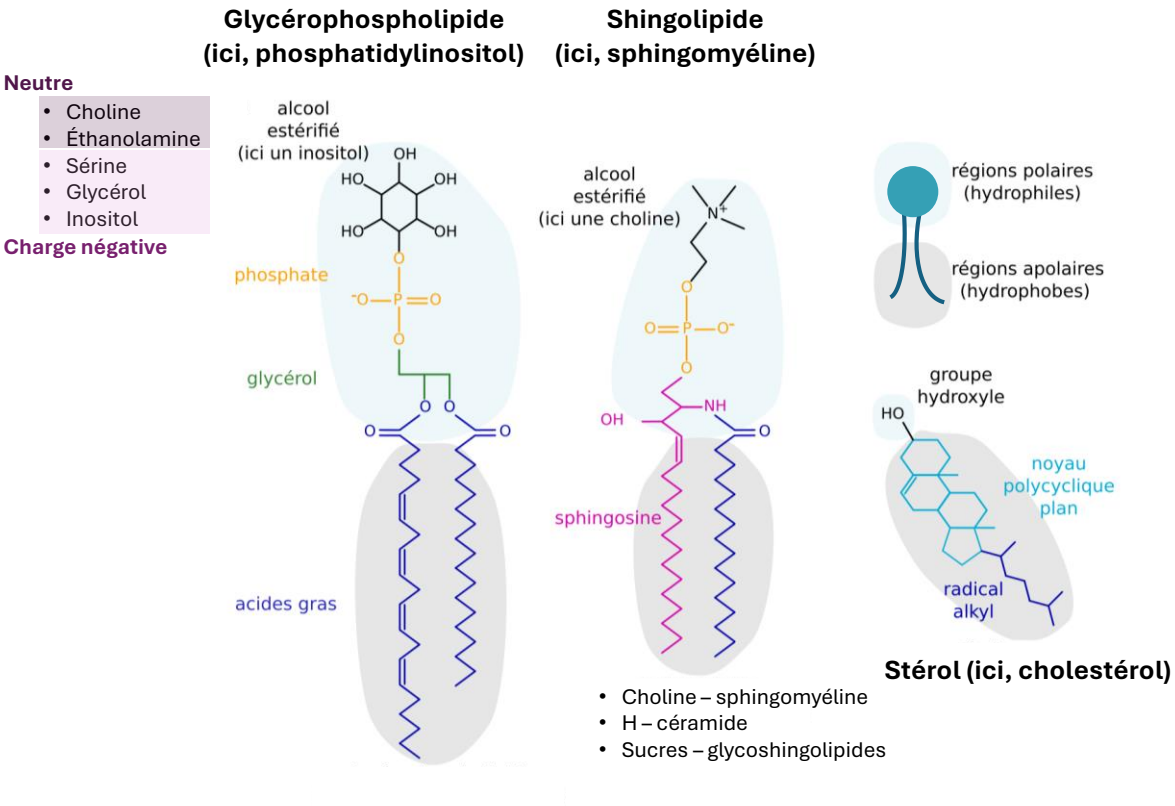


Figure 3 : **Structure des lipides membranaires.** (*adapté de l'illustration de Mehdi Doumane*[14]*).*

Ainsi, les phospholipides sont classés en fonction de la tête polaire et de la queue hydrophobe conférant leur propriétés physicochimiques[11] :

- les têtes polaires peuvent être chargées électriquement : ionique (charge positive ou négative), zwitterionique (deux charges s'opposant) ou neutre (sans charge).
- leur squelette carboné : les acides gras diffèrent par la longueur de la chaîne (nombre de carbone) et leur niveau de saturation (saturées ou insaturées). La structure insaturée se définit par une ou plusieurs doubles liaisons dans la chaîne acyle, *a contrario,* les lipides saturés ont des liaisons simples donnant une forme linéaire à la chaîne acyle.

Plus précisément, des différences structurelles sont observées entre les glycérophospholipides et les sphingolipides. Une molécule de glycérophospholipide est constituée d'un groupe phosphate (1 phosphate attaché à 4 molécule d'oxygène), de deux acides gras (longues chaînes carbonées) et d'une molécule de glycérol les reliant. Alors qu'une molécule de sphingolipide est constituée d'une base sphingosine (ou l'un de ces dérivés) qui est à la fois le squelette carboné et la queue hydrophobe accroché à un acide gras[11]. Cette différence leur confère des propriétés physicochimiques spécifiques.

En plus des phospholipides, un composant essentiel des membranes biologiques des cellules eucaryotes sont leur enrichissement en stérols (composant plus compact et apolaire), et plus précisément en Cholestérol qui constitue environ 30% des lipides totaux des membranes plasmiques.

Les glycérophospholipides sont les lipides les plus abondants dans la membrane plasmique mais réparties de manière asymétrique : dans les cellules de mammifères, le PC et la SM se trouvent généralement dans le feuillet externe alors que le PS, le PE et le PI sont situés dans le feuillet interne de la membrane plasmique. A noter que lorsque le PS se retrouve dans le feuillet externe, cela indique une perte de l'intégrité membranaire déclenchant des cascades de signalisation conduisant à l'apoptose cellulaire[15].

Il est intéressant de noter que les phospholipides et les stérols ne sont pas répartis de manière homogène dans les principaux organites ce qui s'explique par la localisation du processus de synthèse des lipides. En effet, le métabolisme local des lipides est le premier facteur déterminant de la composition unique des organites, telle que celles des mitochondries qui est riche en cardiolipine[2,16].

Le Cholestérol a une plus grande affinité pour les lipides saturés que pour les lipides insaturés. La présence de Cholestérol influence les propriétés de la bicouche lipidique en modifiant sa fluidité, son épaisseur, sa courbure, la compressibilité et la pénétration de l'eau[17,18]. La région hydrophile du Chol est assez petite et consiste en un seul groupe hydroxyle ; en revanche sa région hydrophobe est une structure planaire rigide composée de plusieurs anneaux fusionnés s'intercalant entre les molécules lipidiques, remplissant l'espace libre et diminuant ainsi la flexibilité des chaines lipidiques environnantes et donc la fluidité des bicouches lipidiques. Cette fluidité facilite l'insertion des protéines dans la membrane et améliore le trafic membranaire, la signalisation, l'endocytose ou la transduction du signal[19].

1.1.2. Protéines membranaires

Bien que la compartimentation est la condition *sine qua non* de la vie cellulaire, la cellule (procaryote ou eucaryote) ou l'organite a besoin d'échange continuels de matière, d'énergie et d'informations de part et d'autres de la membrane. Ces échanges sont possible grâce à la présence de protéines, second constituant majeur de la membrane (environ 50% du poids sec des membranes). Ainsi, la membrane biologique est soumise à une régulation complexe par l'action de ces diverses protéines[20].

La structure d'une protéine montré en Figure 4a est un enchainement d'acides aminés (structure primaire), qui va s'arranger spatialement pour former des conformations en hélice α ou feuillet β (structure secondaire) et qui par un ensemble d'interactions non-covalentes (interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes et hydrophobes) va se replier dans l'espace pour former une structure complexe (structure tertiaire) et ainsi donner sa fonction

à la protéine. Les protéines membranaires ont toutes en commun une particularité, un domaine structural avec une surface hydrophobe leur permettant leur insertion au sein de la membrane.

Les protéines membranaires (MPs) se classent en deux grandes catégories en fonction de leur « contact » (ancrées, associées ou attachées) à la membrane biologique/organelles (Figure 4b)[21] :

- Protéines périphériques (ou extrinsèques) : temporairement associées à la membrane (de part ou de l'autre) par des interactions électrostatiques avec les lipides ou les protéines membranaires émergeant de la membrane, mais ne traverse pas la membrane,
- Protéines intégrales (ou intrinsèques) : intégrées dans la région hydrophobe de la bicouche et s'étendent à travers la membrane (une partie peut émerger en dehors de la membrane).

Comme leurs voisins phospholipidiques, les protéines transmembranaires sont amphiphiles avec des régions hydrophobe (interagissant avec les queues hydrophobes des molécules de lipides) et hydrophile (exposés au milieu aqueux de part et/ou d'autre de la membrane). La région hydrophobe peut s'organiser dans la membrane en différents réarrangements : hélice α simple ou multiple, ou feuillet β ; et peuvent traverser une ou plusieurs fois la membrane grâce à des liaisons covalentes avec les chaines des acides gras de la bicouche lipidique[22]. Les protéines membranaires partiellement intégrées dans la membrane ne pénètrent pas dans les parties hydrophobes de la bicouche.

Les protéines périphériques se lient à la surface de la membrane via des liaisons non covalentes. Elles sont liées à l'un des deux feuillets via des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes entre les groupes chargés des acides aminés et des têtes polaires des lipides. Par exemple la protéine Annexine V qui interagit spécifiquement avec la phosphatidylsérine[23,24].

Les MPs sont souvent amphiphiles avec des parties à la fois hydrophile et hydrophobe (Figure 4b). Les variations d'organisation structurelles en hélice α ou en feuillet β conduisent à différentes intégrations membranaires [21,25,26]:

- Monotopiques : constamment attachées à l'un des côtés de la bicouche lipidique (ex : une hélice α amphiphile parallèle au plan membranaire ou boucles hydrophobes ancrant intégralement la protéine),
- Bitopiques : traversent une fois la bicouche lipidique,
- Polytopiques : protéines transmembranaires qui traversent plusieurs fois la bicouche lipidique,
- Protéines d'ancrage aux lipides (« lipid-anchored ») : la protéine est attachée de manière covalentes aux lipides intégrées à la bicouche de phospholipides.

L'interactions peut avoir lieu par une liaison covalente avec un lipide membranaire (lipidation) ou par des interactions électrostatiques avec la membrane.

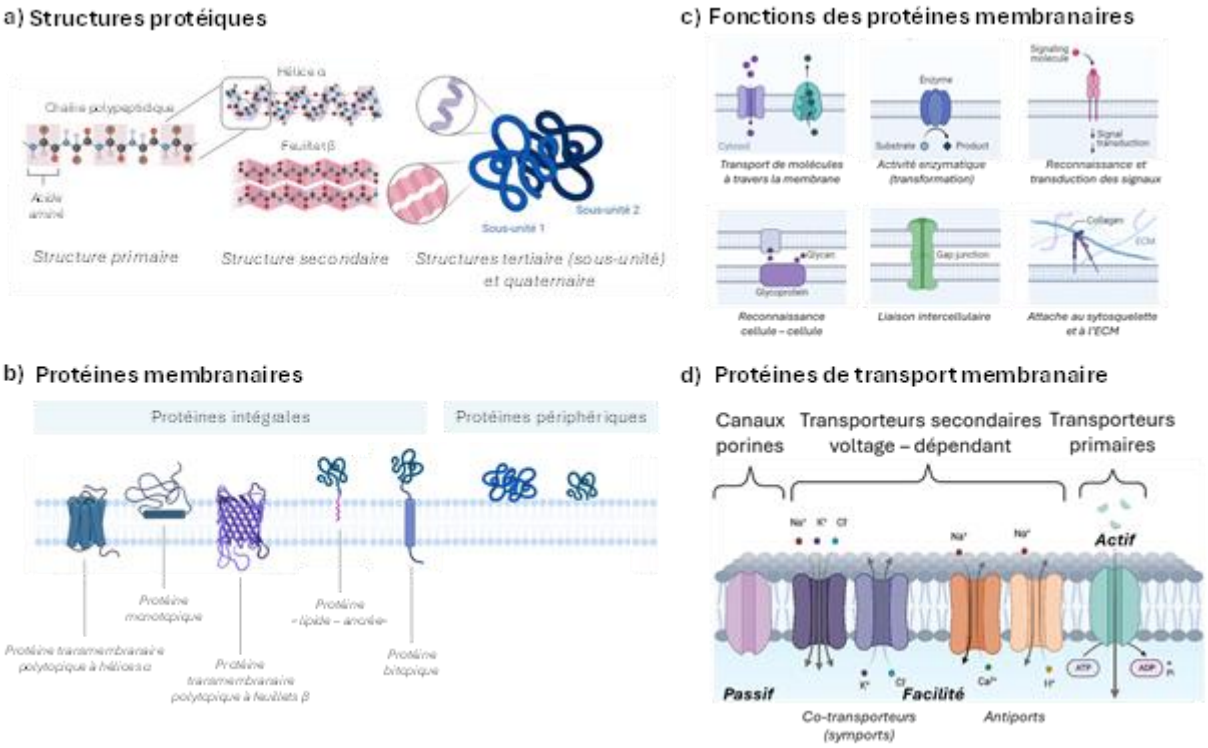


Figure 4 : **Les protéines membranaires.** **a.** Structures des protéines **b.** Les deux grandes familles des protéines membranaires : protéines intégrales classées en fonction de leur intégration à la membrane, et les protéines périphériques. **c.** Résumé des différentes fonctions qu'exercent les protéines membranaires. **d.** Les protéines transmembranaires type transporteurs ou canaux.

Les fonctions actives de la membrane sont donc dépendant des protéines membranaires avec des rôles de récepteurs, d'enzymes, de transporteurs, de protéines de liaison ou de canaux ioniques, *etc* (Figure 4c). Plus précisément, en agissant comme médiateurs entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, certaines protéines membranaires jouent un rôle dans la transmission de signaux extracellulaires en initiant des cascades de signalisation intracellulaire régulant des processus tels que la croissance, la division cellulaire et la différenciation ; et d'autres agissent en tant que transporteurs, facilitant le passage sélectif des molécules à travers la membrane[27]. En contrôlant le passage de petites molécules à travers les bicouches lipidiques, les transporteurs membranaires influencent non seulement

l'absorption et l'efflux des nutriments, mais également l'état métabolique de la cellule [28]. Il existe trois types de transport des solutés[29] :

- Diffusion passive, dans le sens de leur gradient électrochimique et sans interagir avec une composant membranaire avec deux types de diffusion (simple sans énergie).
- Diffusion facilitée, processus passif en impliquant une protéine de transport spécifique. Il existe deux types de transport facilité : (i) uniport, une seule molécule est transportée ; et (ii) symport/antiport, deux molécules sont transportées simultanément dans le sens (symport) ou contre (antiport) le gradient électrochimique.
- Transport actif, nécessite la consommation d'énergie pour déplacer des molécules contre leur gradient de concentration.

La diffusion passive est un processus lent qui n'est pas régulé contrairement à la diffusion facilitée/active qui est un processus très rapide régulée par des protéines transmembranaires.

Il existe 3 grandes classes de transporteurs (Figure 4d) [30,31]:

- Les canaux ioniques et porines : pores permettant le passage facilité d'ions ou de molécules de petites tailles (eau, nucléotides, acides aminés etc.), sont d'importantes cibles de médicaments. Ils assurent un transport actif secondaire permettant le maintien des concentrations de solutés de part et d'autres de la membrane.
- Les pompes : capable d'hydrolyser l'ATP, ce sont des transporteurs actifs primaire qui peuvent faire entrer une grande capacité d'ions. Elles sont génératrices du potentiel membranaire qui traverse la membrane. Exemple : pompe ATPase Na+/K+.

Mais par leur rôle cruciaux et fonctionnels, les protéines membranaires peuvent provoquer des dysfonctionnements cellulaires et être impliquées dans de nombreuses maladies. Leurs mutations peuvent provoquer de lourdes pathologies comme par exemple avec les canaux ioniques qui peuvent induire des troubles neurologiques, cardiaques ou encore musculaires (un nom leur a été attribué en anglais, les « channelopathies »)[32]. En conséquence directe, les protéines membranaires sont le ciblage privilégié de nombreux médicaments[33] (près de 70% *versus* 30% des produits du génome) par les laboratoires pharmaceutiques ainsi que pour le développement de nouveaux médicaments[34].

1.2. Propriétés biophysiques des membranes biologiques

Les membranes biologiques sont des structures asymétriques, fluides et dynamiques. Elles subissent constamment des remaniements pour exercer les fonctions biologiques. La composition variée des lipides et leur arrangement contrôlé déterminent les propriétés physicochimiques de la membrane engendrant des réponses cellulaires temporelles et spatiales spécifiques. Ces changements jouent un double rôle : (i) maintenir l'homéostasie (contre les perturbations causées par le bourgeonnement et la fusion membranaire), et (ii) l'auto-organisation membranaire par l'influence des forces électrostatiques, le compactage des lipides et la courbure membranaire (Figure 5)[35].

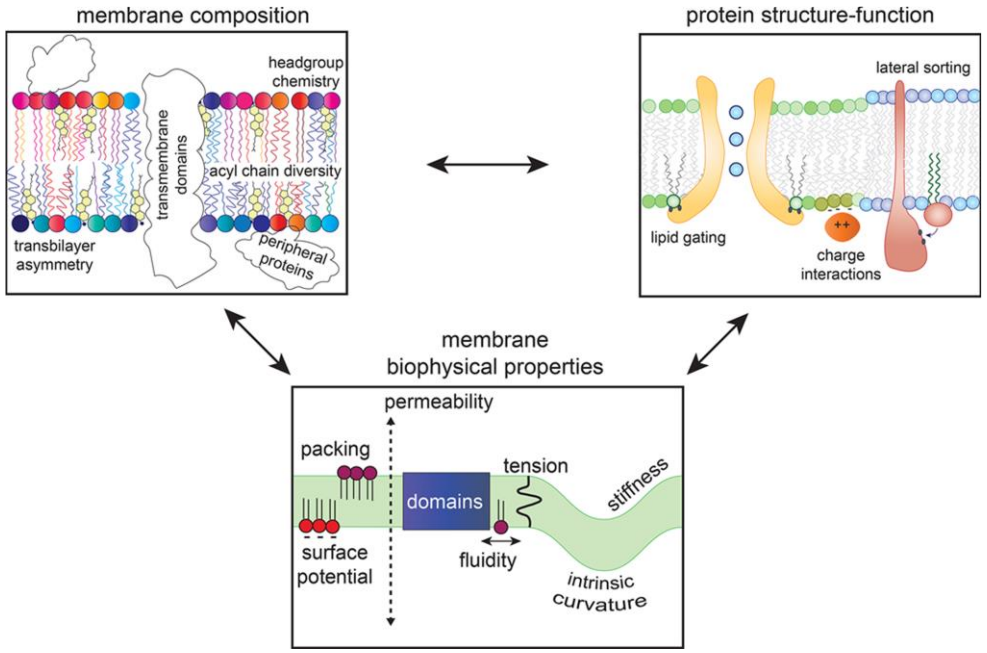


Figure 5 : **Interrelation entre le lipidome membranaire, la structure – fonction des protéines et les propriétés biophysiques de la membrane.** Les molécules de lipides individuelles peuvent servir de cofacteurs spécifiques pour les MPs, mais elles constituent également collectivement un solvant complexe et dynamique qui détermine le comportement fonctionnel des MPs. A leur tour, les MPs produisent et transduisent des signaux capables de réguler le lipidome membranaire. L'ensemble déterminent les propriétés biophysiques d'une membrane biologique donnée[36].

1.2.1. Forces électrostatiques

Elles permettent d'orienter et de guider les interactions lipides-lipides et les lipides-protéines membranaires, favorisant ainsi la formation de complexes fonctionnels. Les deux

feuillets de la bicouche lipidique sont asymétrique par leur composition chimique comme montré en Figure 6, ce qui implique des charges électrostatiques différentes. Presque tous les lipides anioniques (chargés négativement) des cellules eucaryotes sont situés dans la face cytoplasmique, permettant l'interaction avec les régions cationiques des protéines associées à la membrane[37].

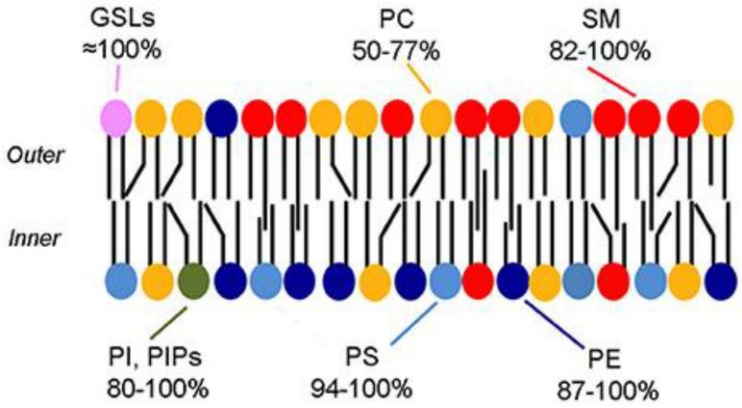


Figure 6 : **Asymétrie de la composition lipidique de la membrane cellulaire.** Le feuillet externe est majoritairement composé de sphingomyéline (SM), de phosphatidylcholine (PC) et de glycoshingolipide (GSL) ; alors que le feuillet interne est composé de phosphatidylsérine (PS), phosphatidyléthanolamine (PE) et de phosphatidylinositol/ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI/PIP) [37].

1.2.2. Fluidité membranaire

La fluidité des biomembranes est fondamentale pour leur fonction, car elle permet aux protéines et aux lipides d'explorer la surface de la cellule et de trouver des partenaires d'interaction[36]. Les lipides et les protéines sont en perpétuel mouvement. Il existe deux types de déplacements par ces constituants membranaires :

- La diffusion latérale lipidique avec mouvement rotationnelle (dans leur monocouche) : l'asymétrie de la bicouche lipidique induit une différence de diffusion entre les deux feuillets mais agit sur des distances relativement longues[38].
- La diffusion transversale lipidique (dans la coupe de la membrane) ou également désignée « flip-flop ». Il s'agit de la diffusion d'un lipide d'un feuillet à l'autre. Ce transfert peut être passif (passage lent comme un soluté) ou facilitée par un catalyseur, une protéine membranaire (dite « flippase »)[39,40].

Le composant lipidique de la membrane se comporte donc comme un liquide bidimensionnel dans lequel les molécules se déplacent très rapidement. Quant aux protéines, elles peuvent se déplacer dans le plan membranaire mais beaucoup plus

lentement que les lipides. La diffusion latérale est possible mais semble limitée par la fonction même de la protéine, comme par exemple au niveau des jonction synaptiques où les constituants protéiques sont figés[41,42].

En outre, les protéines membranaires peuvent influencer la fluidité de la membrane plasmique en interagissant avec les lipides qui la composent. Elle a également comme conséquence une rotation de la protéine sur elle-même autour d'un axe perpendiculaire au plan de la membrane, il s'agit d'une diffusion de rotation. Ces interactions peuvent modifier la structure de la membrane, affectant ainsi sa perméabilité et sa flexibilité[43].

1.2.3. Transition de phase et compactage lipidique

Les transitions de phase dans les bicouches lipidiques sont définies par la force des interactions entre les molécules lipidiques locales (18). Extrait de leur contexte membranaire, et remis en suspension dans un environnement aqueux, les lipides isolés peuvent adopter différentes organisations structurales, c'est le « polymorphisme lipidique » présenté en Figure 7[44,45]. Ce concept, dépend de la balance amphiphile globale du lipide (« balance hydrophile – hydrophobe »), soit de la taille relative des parties hydrophiles et hydrophobe de la molécule qui est globalement cylindrique. Par leur compensation de forme des lipides, l'organisation de la membrane est de type lamellaire. Cependant, la forme globale du lipide n'est pas seulement définie par la structure chimique du groupe de tête lipidique et des chaînes acyles mais également par les paramètres environnementaux, tels que le pH, la température, la concentration de sels, la présence de cations divalent ou de l'hydratation.

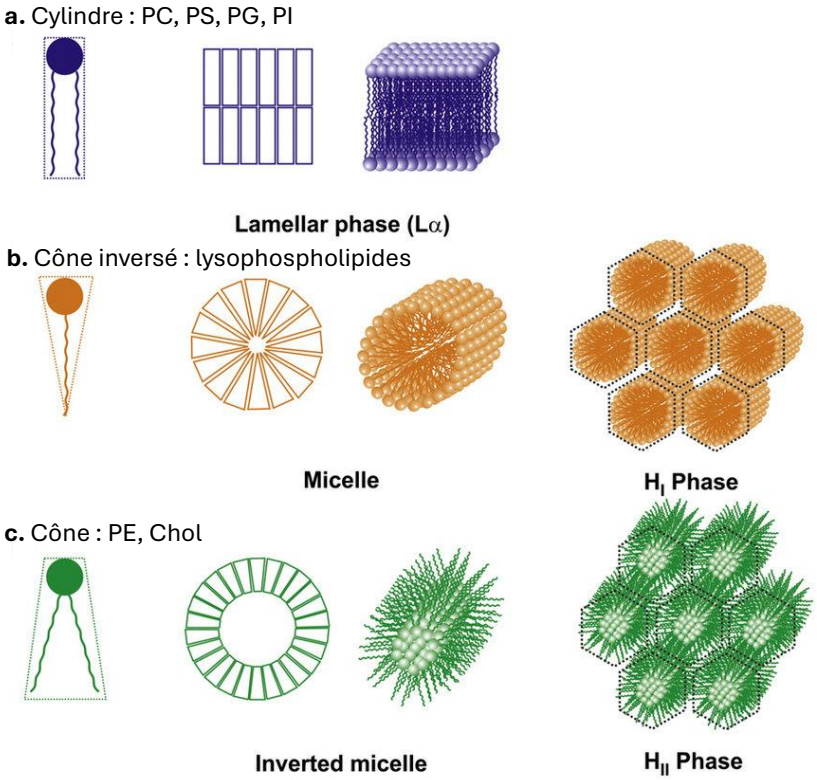


Figure 7 : **Représentation du polymorphisme lipidique**. Basé sur la forme moléculaire. **a.** Les lipides de forme rectangulaire (par exemple PC, SM) ne confèrent pas de contrainte de courbure formant des phases lamellaires. **b.** Les lipides avec une tête polaire volumineuse et une seule chaîne acyle (par exemple les lysophospholipides, dits bioactifs) ont une forme de cône inversé induisant une contrainte de courbure positive dans les membranes. Ils favorisent la formation de micelles ou de phases hexagonales I (H_I). **c.** Les lipides avec une petite tête polaire (par exemple PE, Chol) ont une forme moléculaire qui ressemble à un cône tronqué. Ils induisent une contrainte de courbure négative et favorisent la formation de micelles inversées et de phases hexagonales II (H_{II}) (*adapté de Llado V. et al.* [46]).

Tous les lipides ont une température caractéristique de transition à laquelle ils subissent une fusion de la phase gel (ordonée) à la phase liquide (relativement désordonnée), appelé température de fusion (*T*m). A une température donnée au-dessus du *T*m, une bicouche lipidique peut exister dans deux états : (i) phase liquide désordonnée (Ld, généré par les lipides insaturés) ou, (ii) phase liquide ordonnée (Lo, plus épaisse et diffusion plus faible, généré par les lipides saturés) Figure 8[47]. Structurellement, les lipides qui ont des queues plus longues vont exposer plus de surface, soit augmenter la force d'interaction et diminuer la mobilité des lipides contrairement à un lipide à queue courte qui sera plus fluide[48]. Les phases Lo et Ld peuvent coexister[49]. Le Chol produit un effet de condensation en ordonnant les lipides (phase Lo) de la phase fluide dans la zone d'absorption[17].

Fluidité et/ou séparation de phase

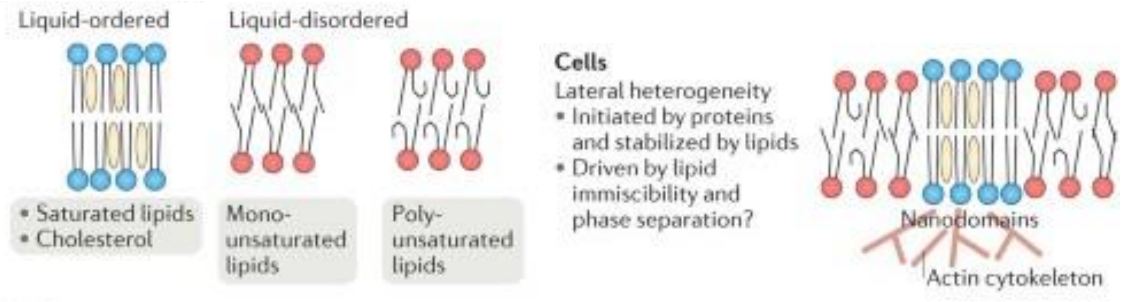


Figure 8 : **Transition de phase et nanodomaines.** Les lipides saturés et le cholestérol génèrent des phases ordonnées liquides, et les lipides insaturés des phases désordonnées liquides. Les phases de gel générées par des lipides saturés purs ne sont pas représentées. L'insaturation des chaînes acyles augmente la fluidité de la membrane et donc son organisation. Des hétérogénéités latérales dans la fluidité membranaire générant des nanodomaines distincts (a*dapté de Harayama et al.*[11]).

Les transitions de phase des membranes conduisent à l'hétérogénéité lipidique latérale et à la compartimentation au sein de la membrane[11,50]. Une des compartimentations les plus connues mais controversées est l'hypothèse des « radeaux lipidiques » (ou « lipid rafts »). Les stérols, notamment le Chol, et quelques phospholipides peuvent induire la formation de nanodomaines plus compactes Figure 8[51,52]. Ces plateformes stables de tailles variables répondent à des stimulus permettant les interactions protéines – lipides ou lipides – lipides, mais surtout sont des « barques flottantes à géométrie lipidique spécifique » (le Chol s'intercalant entre les molécules lipidiques) véhiculant à des endroits précis de la membrane, les protéines et les lipides nécessaires à certains fonctions cellulaires. Ainsi, la formation de domaines lipidiques ou de domaines protéiques est un régulateur fondamental des interactions entre les protéines. Par exemple, une étude récente «numérique» a montré que les protéines transmembranaires actives des GPRC se localisent dans les radeaux lipidiques[53].

1.2.4. Courbure membranaire

La courbure de la membrane est un paramètre physique essentiel des membranes. Puisque les membranes sont inélastiques et résistantes à la flexion spontanée, la courbure est générée par des processus actifs médiés par des protéines spéciales, des lipides et le cytosquelette comme le montre la Figure 9.

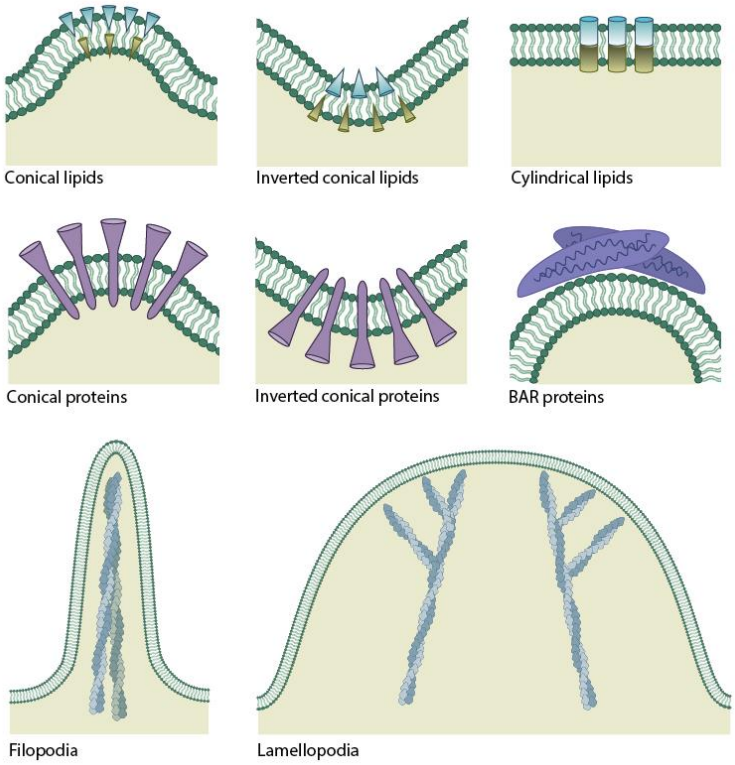


Figure 9 : **Les différents mécanismes responsable de la courbure membranaires**. La forme physique des lipides et des protéines donne lieu à une courbure membranaire. Les lipides/protéines de formes coniques induit une courbure membranaire positive, alors que les lipides/protéines coniques inversés induit une courbure membranaire négative[54].

Une membrane cellulaire est fortement déformable. La courbure de la membrane est essentielle pour la reconnaissance de la forme de la membrane. La reconnaissance de la forme membranaire module les protéines via des modifications des propriétés mécaniques de la membrane et les régule en fournissant la surface optimale pour l'interaction[55]. Ainsi, la courbure membranaire joue un rôle important dans les processus cellulaires dynamiques impliquant le remodelage de la membrane tel que la division cellulaire, l'endo/exo-cytose ou le trafic membranaire. Cette courbure fait référence au pliage physique de la membrane et repose sur l'élasticité intrinsèque des membranes[45]. Cependant, les courbures membranaires sont intrinsèquement instables, en particulier à l'échelle nanométrique. Pour stabiliser les membranes incurvées, les cellules peuvent utiliser des protéines qui détectent et génèrent la courbure de la membrane[56]. Ainsi, la courbure membranaire influence la localisation et l'activité des protéines membranaires, ainsi que les processus de bourgeonnement et de fusion.

De nombreuses études[22,56,57] ont décortiqué à l'échelle moléculaire comment diverses protéines pouvaient déformer une membrane ou reconnaitre une déformation membranaire. La courbure est générée et médiée par des protéines périphériques spéciales, la forme des

lipides et par le cytosquelette sous-jacent. En effet, certaines protéines peuvent s'adapter aux compositions lipidiques afin de reconnaitre la forme de la membrane. Comme par exemple, les protéines tétraspanines qui sont fortement influencées dans leur localisation et enrichissement par la courbure membranaire permettant le remodelage membranaire[58]; ou encore comme les toxines formants des pores (PFTs, Pore – Forming Toxines) qui sont capables de remodeler la structure de la membrane en mélangeant les phases lipidiques[59]. Cela est possible car la composition chimique du lipide (groupe de tête et chaine acyle) affecte la forme du lipide qui peut être coniques, coniques inversés ou cylindriques imposant ainsi une courbure spontanée de la membrane montré en Figure 9[60].

En plus des propriétés lipidiques, la détection et le maintien de la courbure membranaire sont des processus médiés et contrôlés par des protéines spécialisées utilisant les mécanismes suivants[54] et montrés en Figure 9 :

- Enrichissement protéique : le partitionnement de domaines transmembranaires, l'encombrement des protéines à la surface de la membrane et le recrutement des protéines par les lipides (par un domaine de liaison aux lipides) dans des compartiments ou sous-domaines membranaires spécifiques affecte la courbure de la membrane. A noter que certaines protéines transmembranaires (transporteurs, récepteurs ou canaux ioniques) ont également une forme conique ou conique inversée qui peut plier leur membrane associée.
- Insertion de motifs protéiques hydrophobes dans la membrane : un petit motif protéique hydrophobe entre les groupes de têtes lipidiques induit une courbure locale. Par exemple, le complexe ESCRT-III induit le remodelage de la membrane par son insertion[61].
- Echafaudage par les protéines périphériques à l'échelle nanoscopique et microscopique : l'oligomérisation et la liaison membranaire impose une courbure membranaire à l'échelle des domaines protéiques. Présent par exemple dans les mitochondries, les protéines contenant un domaine rigide et incurvé -BAR imposent localement la courbure membranaire distincte appelée « crêtes »[62]
- Echafaudage à l'échelle macroscopique : le cytosquelette (actine, filaments intermédiaires et microtubules) génère à grande échelle (plusieurs microns) la courbure de la membrane au niveau des organites (ER et Golgi) et de la membrane plasmique (filipodes et lamellipodes, ou au cours de la division cellulaire par exemple).

Ainsi, en plus de donner la forme aux cellules ou aux organelles, la courbure membranaire locale peut affecter des processus tels que le bourgeonnement, la scission membranaire et la fusion des vésicules ainsi que la concentration en protéines et l'activation des enzymes sur les membranes. Comme par exemple, avec la relation entre l'action des phospholipases et la modulation de la courbure membrananire[63].

1.2.5. Potentiel membranaire

Le potentiel membranaire (ou potentiel de repos) est une caractéristique essentielle des cellules, il fait référence à la différence de potentiel de charge électrique qui existe de part et d'autre de la membrane cellulaire d'une cellule au repos (environ -70 milliVolt). Cette différence de charge s'exprime sous l'équation de Nernst :

$$V_m = E_A - E_B = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[I]_\mathrm{A}}{[I]_\mathrm{B}}$$

E_i : potentiel électrique du compartiment i
[I] : concentration de l'ion I du compartiment i
R : constante des gaz parfaits (R= 8,314 J.mol^{-1}.K^{-1})
T : température (en Kelvin)
Z : charge de l'ion I
F : constante de Faraday (F= 96 485,33 C.mol^{-1})

Toutes les membranes cellulaires ont pour fonctionnalité de générer et de maintenir les gradients de potentiels électriques et électrochimiques[64]. Le potentiel transmembranaire joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires tels que : transmission de l'influx nerveux, le transport des nutriments et des ions à travers la membrane, le maintien de l'équilibre osmotique cellulaire ou la signalisation cellulaire (détecter et répondre aux signaux chimiques et électriques : libération de neurotransmetteurs, endocytose et exocytose, la contraction musculaire etc...). Lors d'un dysfonctionnement de nombreuses pathologies telles que l'Alzheimer[65] et la maladie de Parkinson[66] peuvent se déclarer. C'est pourquoi il constitue une cible d'étude majeure dans le domaine du développement de médicaments.

Le courant électrique des membranes est généré par le mouvement contrôlé d'ions à travers les canaux ioniques présents dans la membrane cellulaire. Ce potentiel résulte principalement de la distribution inégale des ions à travers la membrane plasmique, soit de la différence de perméabilité de la membrane à divers ions et par les concentrations de ces ions entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Il a donc un impact significatif sur les propriétés et les fonctions de cette membrane.

La perméabilité sélective de la membrane est un facteur clé dans la génération du potentiel membranaire de repos. Les membranes cellulaires sont sélectivement perméables par son rôle de barrière et grâce à des canaux ioniques protéiques qui traversent la membrane comme montré en Figure 10. Les ions les plus courants sont le potassium (K+), le sodium (Na+), le chlorure (Cl-) et le calcium (Ca2+). Lorsque la cellule est au repos, les canaux potassiques (K+) sont principalement ouverts, permettant au potassium de migrer de l'autre côté de la membrane. Généralement autour de -70 millivolts (mV). Cette valeur négative indique que l'intérieur de la membrane est relativement plus négatif que l'extérieur,

ce qui crée une polarisation. Cette perméabilité (capacité à la membrane cellulaire à laisser passer les ions K+), combinée aux concentrations intracellulaires élevées de potassium, détermine principalement le potentiel membranaire de repos. Les différences de concentration en ions entre l'intérieur et l'extérieur des cellules sont principalement dues à l'activité de la pompe sodium-potassium (Na+/K+). Cette pompe transporte activement trois ions sodium (Na+) hors de la cellule pour chaque deux ions potassium (K+) qu'elle transporte à l'intérieur. Cela crée des gradients de concentration, avec une concentration plus élevée d'ions Na+ à l'extérieur des cellules et une concentration plus élevée d'ions K+ à l'intérieur. La Figure 10 résume ces étapes.

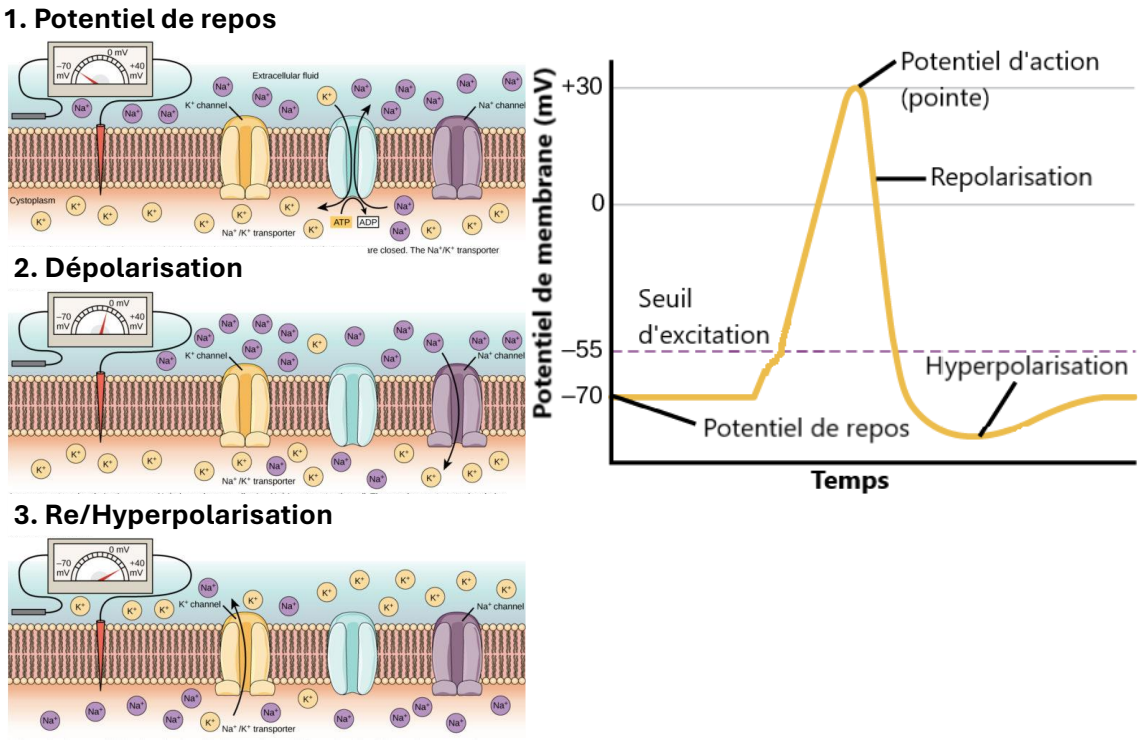


Figure 10 : **Potentiel membranaire et potentiel d'action. 1.** Le potentiel de membrane au repos est le résultat des différentes concentrations d'ions Na+ et K+ à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Un influx nerveux provoque l'entrée de Na+ dans la cellule, ce qui entraîne une **2.** dépolarisation. Au pic du potentiel d'action, les canaux K+ s'ouvrent et la cellule devient **3.** hyperpolarisée.

Dû à sa localisation membranaire, le potentiel transmembranaire joue un rôle crucial dans la stabilité, la conformation et les activités fonctionnelles des protéines membranaires. L'électrostatique induite par le potentiel transmembranaire peut influencer la localisation, la liaison et les mouvements conformationnels des protéines. De plus, certaines protéines membranaires sont sensibles aux variations du potentiel transmembranaire que l'on appelle « voltage-dépendant ». Ces changements peuvent moduler leur activité enzymatique, leur capacité de liaison et leurs interactions avec d'autres composants cellulaires. La

compréhension de la régulation des protéines membranaires par le potentiel transmembranaire est essentiel dans la conception de médicaments et de thérapies ciblant ces processus[67].

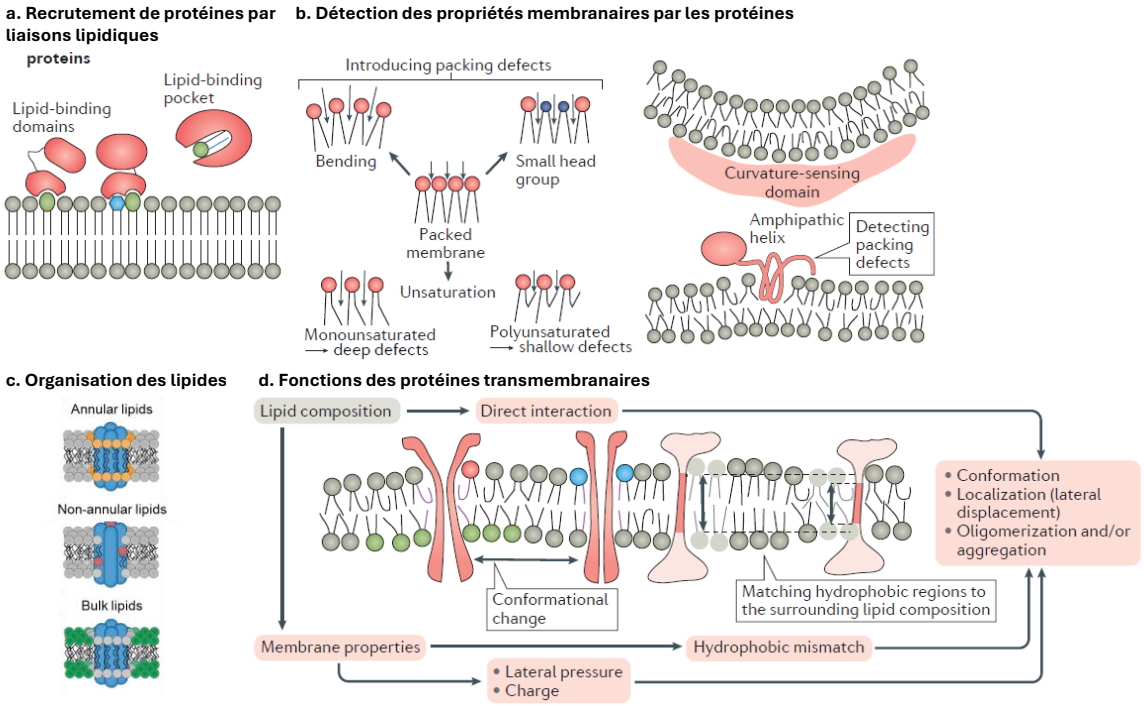


Figure 11 : **Les lipides régulent les processus biologiques médiés par les protéines. a.** Les lipides ayant des structures spécifiques recrutent des protéines et peuvent être des ligands pour des protéines. **b.** La courbure de la membrane, la taille du groupe de tête et l'insaturation affectent le degré de compaction des lipides, pouvant entraîner des défauts d'empaquetage où les régions hydrophobes sont exposées à l'environnement aqueux. Plusieurs protéines sont recrutées en reconnaissant des propriétés membranaires spécifiques (courbure ou encore défauts d'empaquetage). **c.** Les types de lipides dans les membranes biologiques comprennent : les lipides annulaires (orange) assurent la médiation entre la protéine et l'environnement lipidique (positionnement verticale), les lipides non annulaires (rouges) sont liés aux cavités de la surface des protéines et aux interfaces protéine-protéine, et les lipides en vrac (verts) n'entrent pas en contact avec la protéine intégrée à la membrane et représentent la composition lipidique globale de l'environnement membranaire de la protéine. **d.** La conformation, la distribution et les états d'oligomérisation des protéines membranaires sont influencés par la composition lipidique environnante. Ces transitions peuvent résulter d'une liaison lipide-protéine directe (lipide non-annulaire) ou par les propriétés de la membrane. Un décalage entre la longueur du segment transmembranaire et l'épaisseur de la membrane entraîne divers effets : le déplacement latéral, l'agrégation de la protéine, l'inclinaison ou la déformation des segments transmembranaires. La pression latérale et la charge électrique des groupes de tête des lipides influencent également les fonctions des protéines membranaires. (*adapté de Frick et al., et de Harayama et al.*[11,41]*).*

1.3. Interactions protéines – lipides

Les interactions entre les lipides et les protéines sont essentielles dans la structure et la fonction de la membrane. Ces interactions peuvent être classées en fonction de leur spécificité, effets fonctionnels sur les protéines ou de leur effets sur les propriétés membranaires locales[33]. Malgré les progrès technologiques en techniques structurelles et biophysiques, des lacunes subsistent dans la compréhension de l'impact mutuel entre les protéines membranaires et les lipides associés, en raison des difficultés d'interprétation des mesures des interactions protéine-lipide[36].

Les protéines membranaires peuvent être distinguées par des stratégies de reconnaissance spécifique de lipides[68,69], de piégeage cinétique (impliquant un changement conformation), ou de reconnaissance des propriétés physicochimiques de la membrane (courbure, interactions électrostatiques…) comme le résume la Figure 11a/b. Chaque protéine perturbe localement la membrane, et toute modification de la composition lipidique de la membrane[70] ou de la surface protéique[71,72] peut moduler l'organisation des protéines en impactant sa diffusion ou sa solubilité, et ainsi sa fonction[73]. Les défauts lipidiques, influencés par la composition lipidique et la courbure de la membrane, jouent aussi un rôle important dans les interactions protéines – lipides.

La géométrie des lipides (forme) induit des défauts lipidiques de compactage dans l'organisation de la membrane biologique que les protéines périphériques reconnaissent comme le montre la Figure 11b. De tels défauts peuvent influencer les interactions protéines-lipides et sont causés à la fois par la composition lipidique et par la courbure de la membrane.

En tenant compte de l'environnement lipidique de la membrane, les interactions protéine-lipide sont classées en trois sous-classes selon leurs interactions avec les protéines membranaires montré en Figure 11c/d :

- les lipides dits « en vrac » (traduction de « bulk lipid ») : influencent la géométrie et l'accessibilité des protéines sans interaction directe,
- les lipides annulaires : entourent l'environnement immédiat de la protéine et les positionnent dans la bicouche (servent d'intermédiaire entre la protéine et le reste des lipides),
- les lipides non annulaires (cofacteurs) : se lient aux cavités à la surface de la protéine.

Ces interactions spécifiques sont dues à des motifs de liaison lipidique ou à des interactions électrostatiques et hydrophobes[74], influençant directement la fonction protéique par allostérie ou oligomérisation[75]. Par exemple, les canaux ioniques voltage-dépendants montrent un contrôle lipidique du mécanisme de « gating » chez KvAP[76]. Les interactions protéines-lipides sont donc des déterminants cruciaux des processus membranaires. Les méthodes à haute résolution pour étudier ces interactions ont mené au

concept du «paralipidome fonctionnel»[36], qui désigne la régulation mutuelle entre les protéines membranaires et leur environnement lipidique local.

2. Outils pour étudier les interactions protéines – lipides

Les membranes biologiques sont complexes comme expliqué précédemment. Etudier les interactions entres les protéines et les lipides membranaires est donc compliqué dues à leur localisation dans les membranes (accès difficile) et un réel défi pour les scientifiques[76]. De nombreuses techniques permettent de contourner le problème par l'utilisation de systèmes modèles membranaires et par des approches à haute résolution, comprenant des techniques optiques, spectroscopiques, mécaniques, structurales et de simulation, approfondissant ainsi notre compréhension des interactions protéine-lipide[33].

2.1. Systèmes modèles membranaires

Les interactions protéines – lipides peuvent être étudiées en utilisant des membranes isolées et des modèles *in vitro*[12]. Les modèles membranaires sont des outils pour étudier le comportement des protéines et des lipides dans une membrane fournissant les informations, par exemple, sur la structure et la fonction des lipides, l'effet de courbure sur les complexes membranaires – protéiques, les interactions protéines – lipides et avec des médicaments etc. Les systèmes *in vitro* les plus utilisés sont les vésicules lipidiques (liposomes), les monocouches de Langmuir, les bicouches lipidiques supportées (SLB) et les nanodisques montrés en Figure 12[77]. L'avantage d'utiliser des systèmes biomimétiques est de fournir aux scientifiques la possibilité de contrôler les paramètres suivants : composition et concentration lipidique, pH, charge de surface de la membrane, force ionique et courbure de la membrane. Quoique efficace et suffisant pour répondre à certaines problématiques de recherche, il ne faut pas oublier qu'il s'agit de systèmes minimaux simplifiant les processus cellulaires. Les membranes modèles ne tiennent pas compte des milliers d'espèces lipidiques différentes présentes dans les membranes biologiques et les interactions avec les composants du cytosquelette qui jouent un rôle actif dans l'organisation des membranes. La validation des résultats à partir de membranes cellulaires natives (comme par exemple avec la Bactériorhodopsine et les membranes pourpres) et *in cellulo* sont nécessaires (*non approfondis ici*)[78,79].

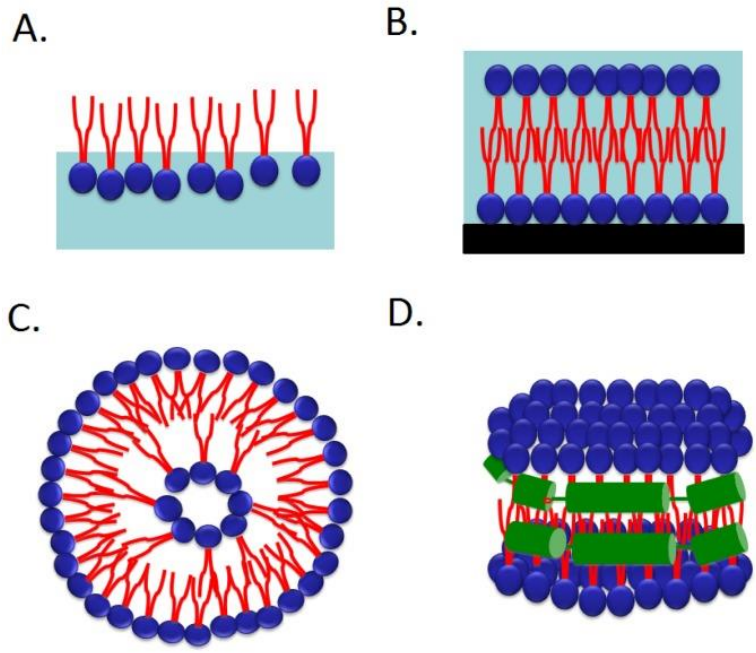


Figure 12 : **Représentations schématiques des modèles membranaires *in vitro*.** A. monocouche, B. bicouche lipidique supportée, C. liposomes et D. nanodisque. Le bleu clair (A et B) et le noir (B) représentent respectivement l'eau et un substrat. Les nanodisques contiennent des protéines d'échafaudage membranaire, représentées en vert[80].

2.1.1. Monocouche de Langmuir

Les lipides sont des molécules amphiphiles, ils ont donc la caractéristique de s'auto-orienter à l'interface air/eau (entre la phase gaz et liquide, limitant l'énergie libre de surface) et de former un film monomoléculaire insoluble appelé « monocouche de Langmuir ». Cette formation porte le nom du Prix Nobel de Chimie en 1932 pour ses découvertes sur les molécules amphiphiles, les monocouches et leurs propriétés thermodynamiques. Pour obtenir cette monocouche, il suffit de déposer une solution lipidique avec un solvant volatile et non miscible tel que le chloroforme, à la surface d'eau pure. Une fois le solvant évaporé, le film interfacial se forme avec une orientation de têtes polaires des lipides immergées dans l'eau[81]. Les monocouches de Langmuir sont souvent associées à l'utilisation de la microscopie à l'angle de Brewster (BAM) qui est adaptée à l'observation en temps réel de la morphologie de surface de monocouches lipidiques lors de phase de compression/décompression et lors d'interaction avec diverses biomolécules comme des protéines ou des médicaments (*non détaillé*).

2.1.2. Vésicules lipidiques

Les vésicules lipidiques, ou « liposomes », sont des modèles biomimétiques disposés en bicouches lipidiques sphériques (fermées) avec un compartiment interne aqueux. Ils sont utilisés pour imiter les membranes biologiques ou comme « véhicule » de cargaison lipidique (outils thérapeutiques pour transporter des médicaments par exemple). Les liposomes sont classés en fonction de leur lamellarité (Figure 13a)[12]: (i) vésicules unilamellaires (UVs), (ii) multilamellaires (MLVs), (iii) oligolamellaires (OLVs) et (iv) vésicules multilamellaires. Concernant les UVs, un autre classement se fait en fonction de leur tailles[82]: (i) SUVs (petite vésicule unilamellaire, < 100nm de diamètre), (ii) LUVs (large UVs, 100-1000nm de diamètre) et (iii) GUVs (géante UVs, > 1-100µm de diamètre). En fonction de leur taille, les liposomes ne seront pas utilisés par les mêmes techniques. En effet, par leur taille submicroscopiques, les SUVs et les LUVs représentent un excellent modèle pour étudier les propriétés physicochimiques et les interactions protéines – lipides par des analyses microscopiques et spectroscopiques. Contrairement aux GUVs, qui par leur taille comparable à celle des cellules peuvent être observés directement par microscopie optique.

Les SUVs sont souvent préparés en séchant un film lipidique puis en le réhydratant et vortexant pour obtenir des MLVs. C'est la dernière étape par sonication ou extrusion qui permet de réduire la taille des liposomes en SUVs. Elles peuvent ensuite être utilisées dans plusieurs méthodes pour analyser les interactions protéines – lipides par microscopie ou spectroscopie par exemple. Une fois « ouvertes » sur un support solide, elles permettent d'obtenir des bicouches lipidiques supportées (SLBs)[83].

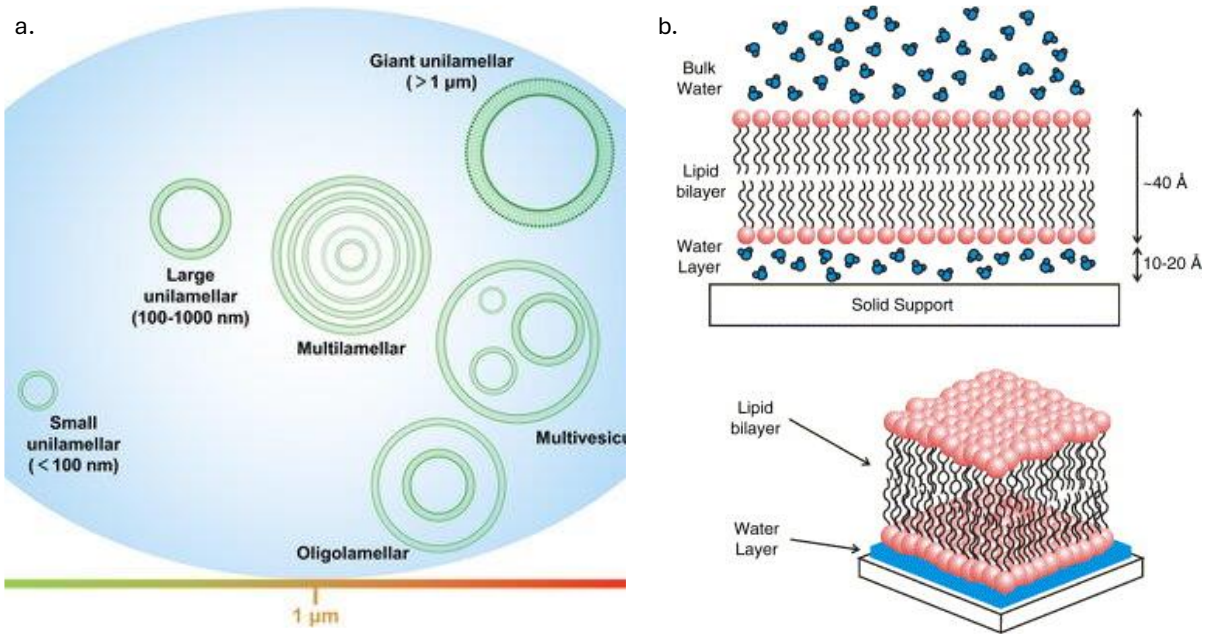


Figure 13 : **Vésicules et bicouche lipidique supportée. a.** Classification de la taille des vésicules et de la lamellarité. Les petites vésicules unilamellaires (SUV) ont un diamètre inférieur à 100 nm ; les grandes vésicules unilamellaires (LUV) ont un diamètre compris entre 100 et 1000 nm ; et les vésicules unilamellaires géantes (GUV) ont un diamètre supérieur à 1 µm. Les vésicules oligolamellaires (OLV), multilamellaires (MLV) sont composées de plusieurs bicouches concentriques, tandis que les vésicules multivésiculaires (MVV) encapsulent plusieurs bicouches non concentriques de liposomes[82]. **b.** Schéma d'une bicouche phospholipidique sur support solide. La membrane est séparée du substrat par une couche d'eau de 10 à 20 Å d'épaisseur[84].

2.1.3. Bicouches lipidiques supportées

Les bicouches lipidiques supportées (SLBs) sont d'excellent modèles biomimétiques pour étudier la chimie de surface des membranes biologiques ou les interactions protéines – lipides. Elles sont constituées d'une bicouche lipidique bidimensionnelle (2D) plate supportée sur une surface solide (telle que du verre, du mica, de l'or...) avec la face supérieure exposée à la solution aqueuse (Figure 13b). Cela en fait un modèle biomimétique stable et robuste. De plus, la composition (mixte ou non de lipides synthétiques et natifs) et l'asymétrie lipidique des SLBs peuvent être contrôlées[12]. Il est important de noter qu'une couche d'eau (d'environ 15 Å) est emprisonnée entre le substrat et la bicouche permettant de garder la fluidité membranaire de la SLB, ce qui en fait un avantage[84]. En effet, cette caractéristique étant conservée, les lipides peuvent diffuser au sein de la membrane biomimétique, ainsi que les protéines membranaires lorsqu'elles sont insérées ou en interactions avec la membrane. Cependant, l'incorporation d'une protéine transmembranaire fonctionnelle dans une bicouche lipidique est un défi et nécessite un

choix minutieux des méthodes d'insertion et de solubilisation utilisées, par exemple par des « protéoliposomes »[80,85].

2.1.4. Protéoliposomes

Les protéoliposomes (PLs) sont des systèmes modèles idéaux pour l'analyse des protéines membranaires. Les PLs sont des vésicules lipidiques contenant des protéines membranaires imitant partiellement leur environnement d'origine. Il est certain qu'étudier les protéines membranaires dans des conditions proches des conditions natives est nécessaire afin de mieux comprendre les interactions protéines – lipides. Ces systèmes reconstitués permettent également un choix plus souple de techniques biochimiques, biophysiques et de microscopie pour caractériser ces interactions. Il existe différentes méthodes pour reconstituer les protéines transmembranaires dans les liposomes[85]: (i) déshydratation-réhydratation, (ii) de fusion induite par les peptides, (iii) de reconstitution directe (à l'aide de détergents), (iv) de fusion spontanée, (v) de transfert de gouttelettes et (vi) de jet microfluidique. La méthode utilisée couramment par les biologistes est la reconstitution dite « directe ». Le processus demande beaucoup de connaissance et de minutie lors des différentes étapes. Premièrement il faut récupérer la protéine : 1) clonage du gène d'intérêt codant pour la protéine dans un plasmide, 2) surexpression du gène d'intérêt, 3) casser et fractionner les cellules, 4) solubiliser les membranes (par des détergents, étape critique pour l'orientation rationnel de la protéine par la suite[86,87]), 5) extraire et purifier la protéine. Une fois que la protéine est prête, elle est insérée dans des liposomes préformés avec le mélange lipidique voulu. Cependant, modifier la composition lipidique peut influencer la structure – fonction de la protéine indépendamment des interactions spécifiques[36]. Pour garder l'environnement membranaire de la protéine et, étudier les orientations protéiques et les interactions protéines – lipides, il existe deux autres procédés : (i) les bulles cellulaires (vésicules à partir de membrane natives)[88] et (ii) les nanodisques (des protéines d'échafaudage assemblent la protéine membranaire et son environnement lipidique locale sans l'utilisation de détergent)[89,90]. *Ces deux modèles ne seront pas détaillés.*

2.2. Outils pour étudier les interactions protéines – lipides

Etudier l'organisation structurelle et la dynamique des membranes biologiques demande un accès à une haute résolution spatio-temporelle. Au cours des dernières décennies, de nombreuses grandes avancées techniques et scientifiques expérimentales et informatiques ont évoluées afin de mieux comprendre les membranes biologiques et répondre aux questions liées à l'identification des sites de liaison lipidique à la surface des protéines, au type de lipides associés aux protéines et à la manière dont ces lipides influencent la fonction des protéines[33]. Bien que de nombreux systèmes analytiques aient été établis pour étudier

les interactions protéine – protéine, ces techniques ne sont pas facilement applicables pour caractériser les interactions entre les protéines/peptides et les membranes[91]. Brièvement les technologies de pointe qui ont considérablement enrichi notre compréhension des interactions spécifiques entre les lipides et les protéines membranaires, ainsi que du comportement collectif des membranes à une haute résolution spatio-temporelle sont les techniques de[76,92–94] :

- imageries optiques : Microscopie confocale, microscope à l'angle de Brewster (BAM), de fluorescence et de super-résolution,
- de spectroscopies : de masse native (MS), Résonance magnétique nucléaire (RMN) et Résonance paramagnétique électronique (RPE) et Résonance plasmon de surface (SPR),
- structurales : Cristallographie aux rayons X (*X*-rays), Cryo – Microscopie électronique à transmission (Cryo-MET) et Microscopie à Force Atomique (AFM)
- d'informatiques : les simulations de dynamiques moléculaires (MD) permettent de prédire les structures protéiques ainsi que leurs sites de liaisons aux lipides.

2.2.1. Microscopie à Fluorescence

Les techniques de microscopie d'imagerie optique n'ont cessé de s'améliorer, offrant la possibilité d'observer et d'étudier les organes, les tissus, les cellules et même la structure et les fonctions des membranes. Ces avancées technologiques ont fait de la microscopie un outil incontournable pour l'étude des membranes biologiques grâce à sa haute sensibilité.

La fluorescence repose sur la propriété de certaines molécules, appelées fluorophores, à absorber la lumière (photons) à une longueur d'onde spécifique (longueur d'onde d'excitation) et à émettre à des longueurs d'ondes plus longues (longueur d'onde d'émission) après un bref intervalle appelé durée de vie (Figure14a). Ce processus, où le photon émis a moins d'énergie que le photon absorbé, est appelé changement de Stokes et peut être représenté par le diagramme énergétique de Jablonski (Figure 14b). La microscopie à fluorescence utilise ce principe pour exciter les fluorophores et obtenir une image de la lumière émise[95].

Tous les fluorophores ont des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission qui leur en sont spécifiques, dépendant de leur structure chimique. Certaines molécules, comme la chlorophylle, émettent naturellement de la lumière fluorescente (autofluorescence), tandis que d'autres nécessitent un marquage fluorescent (fluorophores). Pour étudier la diffusion ou l'organisation des protéines et des lipides membranaires, des sondes fluorescentes telle que la Green Fluorescent Protein (GFP), les fluorochromes de synthèse (Rhodamine…), les biosondes et les quantum dots peuvent être utilisés[96].

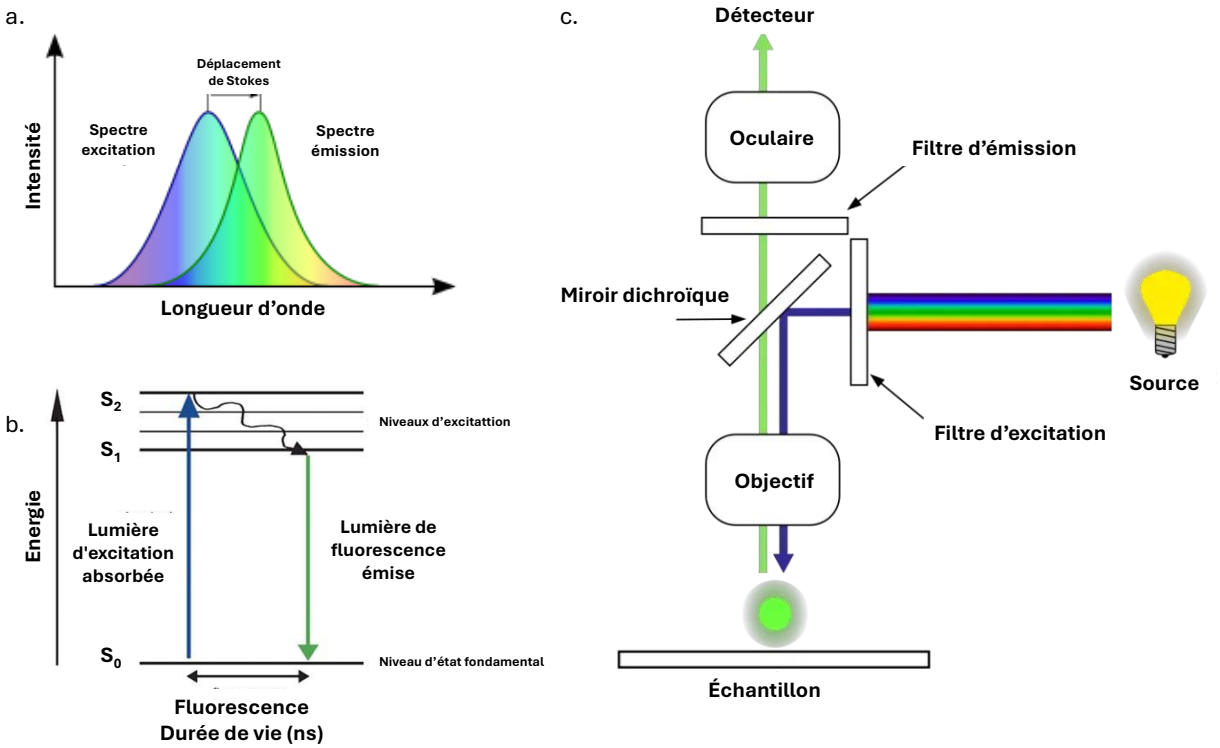


Figure 14 : **La Microscopie à fluorescence : principe et microscope. a.** Spectres d'excitation et d'émission. **b.** Diagramme de Jablonski. Le schéma représente les principaux fondamentaux de la fluorescence. Les flèches représentent les longueurs d'ondes des photons. Le niveau d'état So correspond aux molécules qui n'absorbent pas d'énergie. Lorsqu'un fluorophore absorbe des photons à la longueur d'onde appropriée, ses électrons sont excites vers un niveau d'énergie plus élevé S2. A mesure que ces électrons excites se "détendent" vers le niveau fondamentale S0, l'énergie vibratoire est perdue, et par conséquent, le spectre d'émission est déplacé vers des longueurs d'ondes plus longues. La flèche verte représente le photon de plus basse énergie qui peut être émis par cette molécule lorsqu'elle retombe de l'état excite de plus haute énergie de S1 à S0 (*adapté de Lleres D. et al*[97]). **c.** Représentation schématique d'un microscope à fluorescence.

Le principe fondamental de la microscopie à fluorescence repose sur l'irradiation d'un échantillon à des longueurs d'ondes spécifiques, puis de distinguer les longueurs d'onde de sa lumière émise de la lumière d'excitation. La lumière d'excitation ayant une énergie plus élevée, des filtres optiques sont généralement nécessaires pour filtrer cette lumière d'excitation intense afin de visualiser la fluorescence relativement faible. Le miroir dichroïque est l'élément optique principal qui réfléchit et sépare la lumière. Le filtre d'excitation assure que seule la longueur d'onde spécifique de la lumière d'excitation est transmise. Enfin, le filtre d'émission bloque la lumière d'excitation et garantit que seule la lumière émise atteint le détecteur[98].

Bien que les concepts de fluorescence et de séparation optique à l'aide de filtres restent similaires (Figure 14c), la conception des microscopes varie dans le but d'augmenter le contraste de l'image et la résolution spatiale[95]. Grâce aux progrès en microscopie laser et en photodétection, la microscopie à fluorescence à élargi ses applications pour étudier le rôle fonctionnel et l'organisation structurelle des lipides et des protéines dans les cellules et les systèmes biomimétiques.

La microscopie à super-résolution contourne la limite de diffraction (barrière physique limitant la résolution optique pour distinguer deux objets séparés par une distance latérale). Les méthodes de super-résolution actuelles sont basées sur des microscopes à grand champ, à réflexion interne totale (TIRF ; excite les fluorophores dans une région axiale extrêmement fine[99]) ou confocaux (un sténopé concentre la lumière en un point et permet de collecter la lumière à partir de ce plan focal) et diffèrent fondamentalement dans la manière dont les échantillons marqués par fluorescence sont excités et dont les photons émis sont détectés[100]. Les techniques de super-résolution les plus communément utilisées sont les microscopies de : déplétion par émission stimulée (STED), reconstitution optique stochastique (STORM), par localisation photo-activable (PALM), à illumination structuré (SIM) et optique en champ proche (NSOM). Cependant, ces techniques ont une résolution latérale maximale de quelques dizaines de nanomètres, et peuvent être lentes dans leur processus de collecte de données.

2.2.2. Techniques structurales

Les études structurelles des membranes biologiques à l'échelle nanométrique sont réalisées à l'aide de techniques structurales à haute résolution, telles que la Microscopie Electronique (ME) et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

La spectroscopie RMN est une technique de spectroscopie utilisée pour étudier la structure et la dynamique des macromolécules biologiques telles que les protéines membranaires[101]. Elle permet de déterminer la structure tridimensionnelle des protéines et d'analyser leur interactions avec d'autres molécules en solution. La RMN permet d'étudier (i) les protéines membranaires déterminant les interactions protéines-lipides membranaires et (ii) la dynamique interne afin de comprendre leur fonction biologique[102]. Cependant, les protéines transmembranaires ont besoin d'être étudier dans un environnement lipidique. Leur caractérisation biochimique et structurelle nécessitent alors leur reconstitution dans des systèmes tels que les protéoliposomes et l'utilisation d'une méthode alternative plus adaptée : la microscopie électronique [103].

La Microscopie Electronique (ME), en particulier la microscopie électronique cryogénique (Cryo-EM), est devenue une technique centrale dans la biologie structurale intégrative. Elle permet l'étude de structures protéiques au sein d'échantillons très variées et hétérogènes à des résolutions très élevées. En utilisant un faisceau d'électrons, la Cryo-

EM éclaire l'échantillon biologique pour produire une image agrandie et nette. Sa résolution, environ 100 000 fois supérieure à celle des microscopes optiques, permet l'observation de structures moléculaires des protéines membranaires[93]. La tomographie cryo-électronique (Cryo-ET), une technique cryogénique complémentaire, peut être utilisée pour visualiser les protéines membranaires en 3D dans le contexte de membranes cellulaires intactes. Cette technique permet de s'affranchir du processus de purification et d'extraction, et de visualiser les protéines membranaires en 3D dans le contexte de membranes cellulaires intactes. Cependant, la résolution de la cryo-ET est encore limitée, contrairement à la cryo-EM qui, permet de donner la structure des protéines membranaires à des résolutions de l'ordre de l'Angstrom[104].

Ainsi, sur le plan expérimental, la base de données des structures de protéines membranaires à haute résolution s'enrichit, tout comme les capacités de sonder les échelles de temps et de longueur des interactions lipides-protéines et de relier ces interactions à la fonction des protéines dans une variété de protéines[33]. Cependant, malgré les avancées technologiques, il est encore difficile de caractériser les interactions protéines – lipides membranaires uniquement grâce à ces deux techniques expérimentales.

2.2.3. Simulations de dynamique moléculaire

Les simulations de dynamiques moléculaires (MD) offrent une approche complémentaire puissante à hautes résolutions spatio-temporelles pour obtenir des informations structurelles et énergétiques au niveau atomique des interactions entre les protéines et les lipides membranaires[105]. Brièvement, à partir de données expérimentales (structures PDB des protéines) les simulations résolvent numériquement des équations classiques de mouvement avec « un temps de pas » de 1 à 2fs aboutissant à une carte décrivant la position de tous les atomes en fonction du temps. Chaque atome est décrit explicitement. Les simulations à Coarse grain font la moyenne sur plusieurs atomes.

Cependant, la puissance informatique actuelle est limitante. En effet, les systèmes sont relativement simples avec une seule protéine dans un mélange lipidique choisis. Pourtant, les simulations des interactions protéines – lipides sont complexes engendrant des problèmes pratiques tel que le temps d'équilibrage du système, le nombre d'atomes (des milliers), les paramètres lipidiques, la dynamique interne de la protéine et la précision des champs de force à améliorer en fonction de la complexité du système. Tout ceci montre les défis techniques de calcul et la difficulté liée à l'interprétation des résultats obtenus par simulations. Ainsi, bien que les mesures informatiques fournissent des informations approfondies et valident certaines hypothèses, elles doivent être étayées par des approches expérimentales[36]. Actuellement, de nombreuses études ont prouvé l'intérêt de combiner les approches expérimentales et *in silico*. Par exemple, les études sur la GPCR[93] ou les canaux ioniques[106] ont démontré l'impact des lipides sur des protéines transmembranaires et leurs sites d'interactions.

Malgré les progrès technologiques considérables réalisés dans le domaine des techniques de microscopie à fluorescence, structurales et informatiques, notre compréhension de la régulation mutuelle entre les protéines membranaires et les lipides qui leur sont associés présente encore des lacunes. En effet, la microscopie à fluorescence est limitée par sa résolution spatiale qui n'est pas suffisante pour observer les interactions moléculaires (≥ 20nm). De son côté, la Cryo-EM nécessite que les échantillons soient statiques, ne reflétant pas les conditions physiologiques. Enfin, les simulations de MD sont limitées par le temps de simulation trop court (< 10µs) pour capturer les interactions protéine-lipide plus lentes.

3. HS-AFM et interaction protéine-lipides.

Nos connaissances actuelles de la régulation mutuelle entre les protéines et les lipides associés présente des manquements en raison de contraintes techniques qui imposent un choix entre les études structurelles ou les études dynamiques des composés membranaires[36]. C'est ainsi que la Microscopie à Force Atomique (AFM) rentre en jeu, et notamment l'AFM à haute vitesse (HS-AFM) qui permet de visualiser et de caractériser simultanément la structure et la dynamique des interactions protéines – lipides en temps réel. L'HS-AFM s'est donc rapidement imposée comme un outil structurel efficace, complétant les données obtenues par les microscopies à fluorescence et électronique[107–109].

3.1. La Microscopie à Force Atomique

L'invention de l'AFM en 1986 par les scientifiques G.Binnig et ses collaborateurs[110], constitue une des révolutions technologiques dans le monde des nanotechnologies et a ouvert de nouvelles perspectives en physique, en chimie, en biologie et en médecine[107]. Les capacités uniques de l'AFM en font un outil puissant pour la visualisation directe de tous types de surface et d'échantillons biologiques (tissulaire, cellulaires et moléculaires). En effet, en raison de sa capacité d'imagerie à haute résolution dans des conditions physiologiques, la microscopie à force atomique (AFM) est devenue un outil essentiel pour étudier la structure et la fonction des membranes cellulaires, en utilisant à la fois des cellules vivantes, des extraits membranaires et des membranes modèles[111].

L'AFM peut caractériser presque toutes les surfaces d'échantillons inertes (tels que le verre ou des polymères) et biologiques tels que les cellules[111], les virus[112], l'ADN[113], les membranes biologiques[114], ou encore les protéines[115]. Ainsi, l'AFM permet l'imagerie non-invasive, dans des conditions physiologiques, à température contrôlée d'échantillons biologiques non marqués. Elle permet d'étudier directement les interactions moléculaires entre les protéines et les lipides dans des bicouches lipidiques supportées.

Le principe fondamental pour acquérir une image topographique, montré en Figure 15a, est le balayage de la surface de l'échantillon par une microsonde pointue fixée à un levier flexible

pouvant se déplacer dans toutes les directions (X, Y, Z). Ce type de microscopie fonctionne en détectant les interactions attractives/répulsives qui ont lieu entre la pointe de la sonde AFM et les atomes à la surface de l'échantillon. Ces forces provoquent une déviation du levier qui est suivi et enregistré par un faisceau laser focalisé sur la face arrière du levier et réfléchi sur un photodétecteur sensible. La déviation est directement proportionnelle à la force d'interactions entre la sonde et l'échantillon[111]. Les informations de déviations enregistrées sont retranscrites en image topographiques colorées (la couleur correspondant à l'échelle de hauteur (position Z)). L'AFM peut fournir une visualisation 3D des surfaces biologiques à une résolution nanométrique sur une gamme d'échelles de longueur allant des cellules entières jusqu'aux molécules uniques.

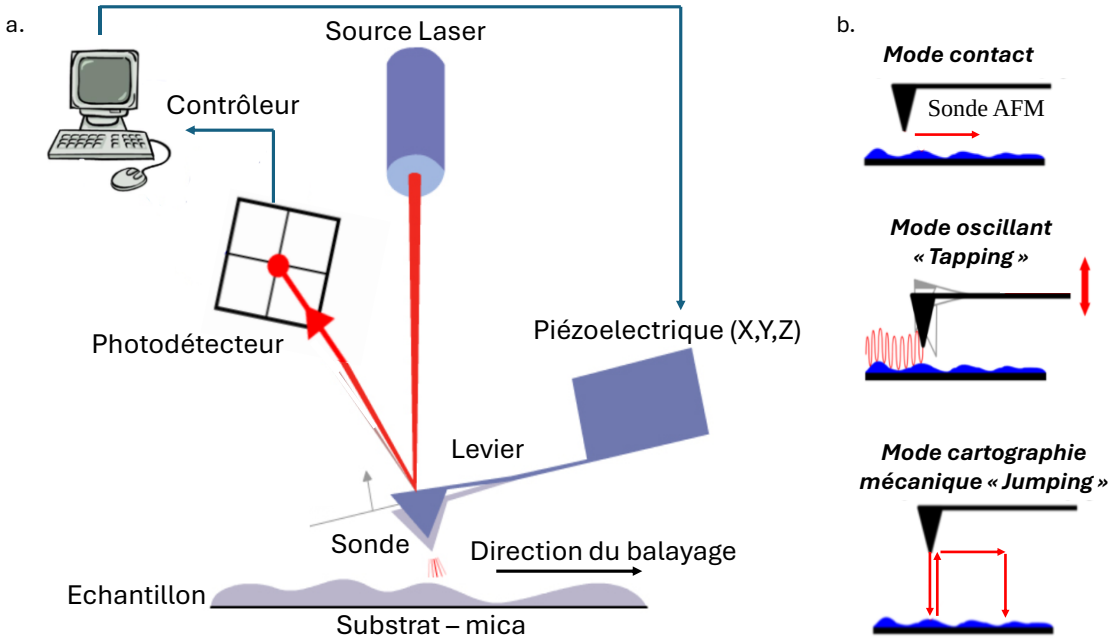


Figure 15 : **Principe de la Microscopie à Force Atomique (AFM). a.** Représentation schématique du principe de l'AFM. La pointe positionnée sur un micro levier balaye l'échantillon, les mouvements du micro levier permis grâce au piézoélectrique sont détectés par le laser de détection. Le rayon laser va se refléter sur le photodiode qui traduit les mouvements du micro levier en un signal observable sur l'ordinateur. **b.** Les différentes modes de balayage de l'échantillon par la sonde AFM. *Haut* Le mode contact : la sonde AFM reste en contact permanent avec la surface de l'échantillon. *Milieu* Le mode oscillant : la sont AFM oscille sur l'échantillon afin de reconstituer la topographie. *Bas* Le mode « Jumping » : la sonde AFM descend et remonte verticalement sur chaque pixel en se déplaçant horizontalement à l'échantillon afin de reconstituer la topographie.

Rapidement, un point sur le substrat utilisé sur lequel sont déposés les échantillons biologiques. Majoritairement, c'est le mica muscovite (phyllosilicate d'aluminium et de potassium) qui est utilisé. Peu coûteux, il est facile à exfolier, et rend les surfaces propres, chargée négativement et atomiquement plates[116]. Dans certains cas, il est nécessaire d'aider l'interaction entre le mica et les échantillons en modifiant la charge du substrat. Pour cela, l'ajout de nickel ou de divalents cationiques tel que le magnésium ou le calcium peut suffire. Si cela n'est pas assez suffisant, l'incubation de l'échantillon s'effectue après absorption de molécules cationiques telles que la polylysine[117], l'APTES[118] ou la streptadivine[119]. Par exemple, la poly-lysine favorise l'adhésion aux substrats solides en tant que « colle » en améliorant l'interaction électrostatique entre les ions chargés négativement de la membrane cellulaire et la surface du substrat.

Cependant, les substrats utilisés en AFM sont solides et rigides au détriment des échantillons minces et mou, tels que les membranes biologiques. Les membranes lipidiques planaires peuvent être formées sur diverses surfaces telles que le verre, le silicium, le mica ou des métaux nobles tels que le platine ou l'or[120]. Afin de surmonter la contribution du substrat sous-jacent à la membrane biologique, les substrats poreux constituent une stratégie élégante pour éviter de placer des biomembranes sur des substrats durs pour les études AFM[121]. Cette stratégie est d'utiliser des substrats poreux de silicium[122], d'alumine[123,124], de nitrure de silicium[125–127] ou de nitrure de silicium recouvert d'or[128]. Cependant, bien que la chimie de surface rende les substrats actuels plutôt difficiles à mettre en place.

Il existe différents modes pour « balayer » la surface de l'échantillon qui sont utilisés en fonction des applications (Figure 15b) :

- mode contact : la sonde est en contact permanent avec l'échantillon (force répulsive) et la force appliquée est constante en ajustant continuellement la distance verticale. Il est idéale pour l'imagerie structurelle.
- mode intermittent ou « amplitude modulation » ou « tapping »: la sonde oscille près de l'échantillon et l'amplitude ou la fréquence d'oscillation est maintenue constante via une boucle de rétroaction.
  En espaçant les contacts, les dommages sont limiter ce qui en fait le mode est le plus utilisé avec les échantillons biologiques.
- mode cartographie mécanique ou « jumping » : la sonde descend et remonte verticalement sur chaque pixel en se déplaçant horizontalement éloignée à l'échantillon. En plus de la topographie, ce mode permet d'obtenir des informations mécaniques telles que la raideur et l'adhésion de l'échantillon pour chaque pixel sondé.

Ainsi, le principal avantage de l'AFM est de pouvoir visualiser des échantillons biologiques en appliquant et en détectant les forces minimales (de l'ordre du nN au pN), sans

moyennage (contrairement aux techniques de RMN et de EM/cryoEM) et dans des conditions physiologiques fonctionnelles.

Puisque l'on « touche » l'échantillon en appliquant une certaine force (de l'ordre du nN au pN), l'AFM peut mesurer ces forces (en générant des courbes de force) et apporter des informations quantitatives sur les propriétés mécaniques. Cette application de l'AFM est appelée la Spectroscopie de force basée sur l'AFM (AFM-FS)[129]. Le principe L'AFM-FS permet (Figure 16a) : (i) d'étudier les propriétés viscoélastiques des échantillons en mesurant la résistance mécanique des cellules, des membranes et de complexes moléculaires[130] et (ii) de mesurer les évènements d'association et de dissociation moléculaires, ainsi que le comportement d'une molécule individuelle lorsqu'une force mécanique d'étirement est appliquée, permettant d'étudier les mécanismes de repliement (en fonctionnalisant les sondes AFM)[131,132]. En Figure 16b, une représentation schématique d'une courbe de force. *Cette partie ne sera pas développée.*

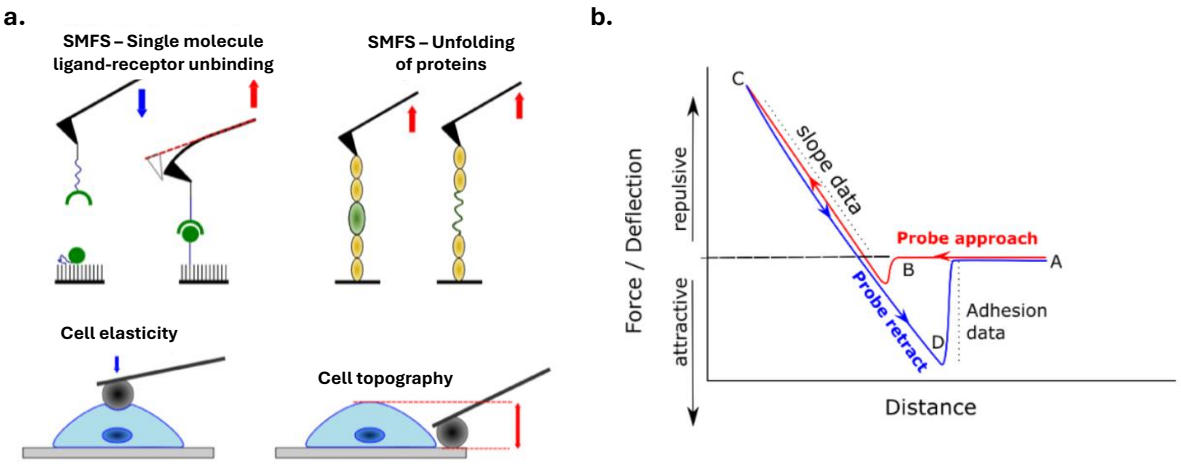


Figure 16 : **Représentation schématique de quelques utilisations par Spectroscopie de force (a.) et d'une courbe de force (b.).** [133] **a.** Schéma montrant les différentes utilisations de l'AFM-FS : mesurer les évènements d'association-dissociation moléculaires (*gauche*), étudier les mécanismes de repliement d'une protéine (*droite*) ou encore mesurer la topographie d'une cellule (*bas*).**b.** Représentation schématique d'une courbe de force approche-retrait.

Chaque technique ayant ses particularités, ses points forts et ses points faibles, il est intéressant de combiner les techniques entre elles. Des combinaison d'AFM conventionnel avec d'autres microscopes ont vu le jour au cours de ces dernières années afin d'apporter des informations complémentaires (Figure 17). En voici quelques exemple : un microscope AFM avec un microscope confocal à balayage laser[134], microscopie électronique à force atomique à lumière corrélative (CLAFEM)[135], un microscope AFM-TIRF[136,137] ou encore un

AFM corrélée à l'imagerie de fluorescence à super-résolution[138]. Toutes ces techniques ont pour but d'apporter des informations complémentaires aux informations topographiques et physique par la partie AFM, comme par exemple la reconnaissance sélectives des lipides et des protéines par la microscopie à fluorescence.

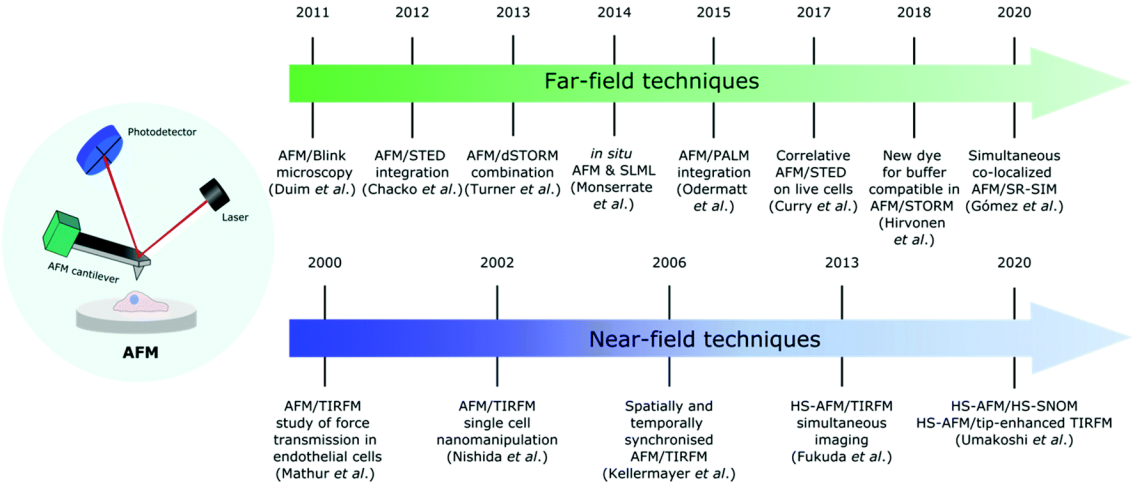


Figure 17 : **Chronologie montrant différentes techniques combinées à l'AFM.** En champ lointain (*haut*) et en champ proche (*bas*)[139].

3.2. La Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse

L'obtention d'une image par AFM conventionnel nécessite quelques minutes, ce qui n'est pas suffisant pour visualiser la plupart des processus dynamiques biologiques qui se déroulent généralement à des échelles de temps inférieurs à la seconde. L'introduction de l'AFM à haute vitesse (HS-AFM) en 2001 par le Pr. T. Ando (Université de Kanazawa, Japon) a ouvert la porte à la visualisation de la dynamique des processus biologiques[140]. L'HS-AFM a les même avantage que l'AFM, elle permet de visualiser les membranes ou les protéines par exemple, sans étiquette, à l'échelle nanométrique et sub-seconde dans des conditions physiologiques à température contrôlée. La différence, est la vitesse d'acquisition : fréquences de 1 à 50 images par seconde, selon la taille de l'image, la topographie et la fragilité de l'échantillon. Les événements moléculaires dynamiques apparaissent donc de manière non sélective dans un film d'HS-AFM, facilitant la compréhension du fonctionnement des molécules biologiques (protéines solubles, protéines membranaires et intrinsèquement désordonnées)[141] (Figure 18).

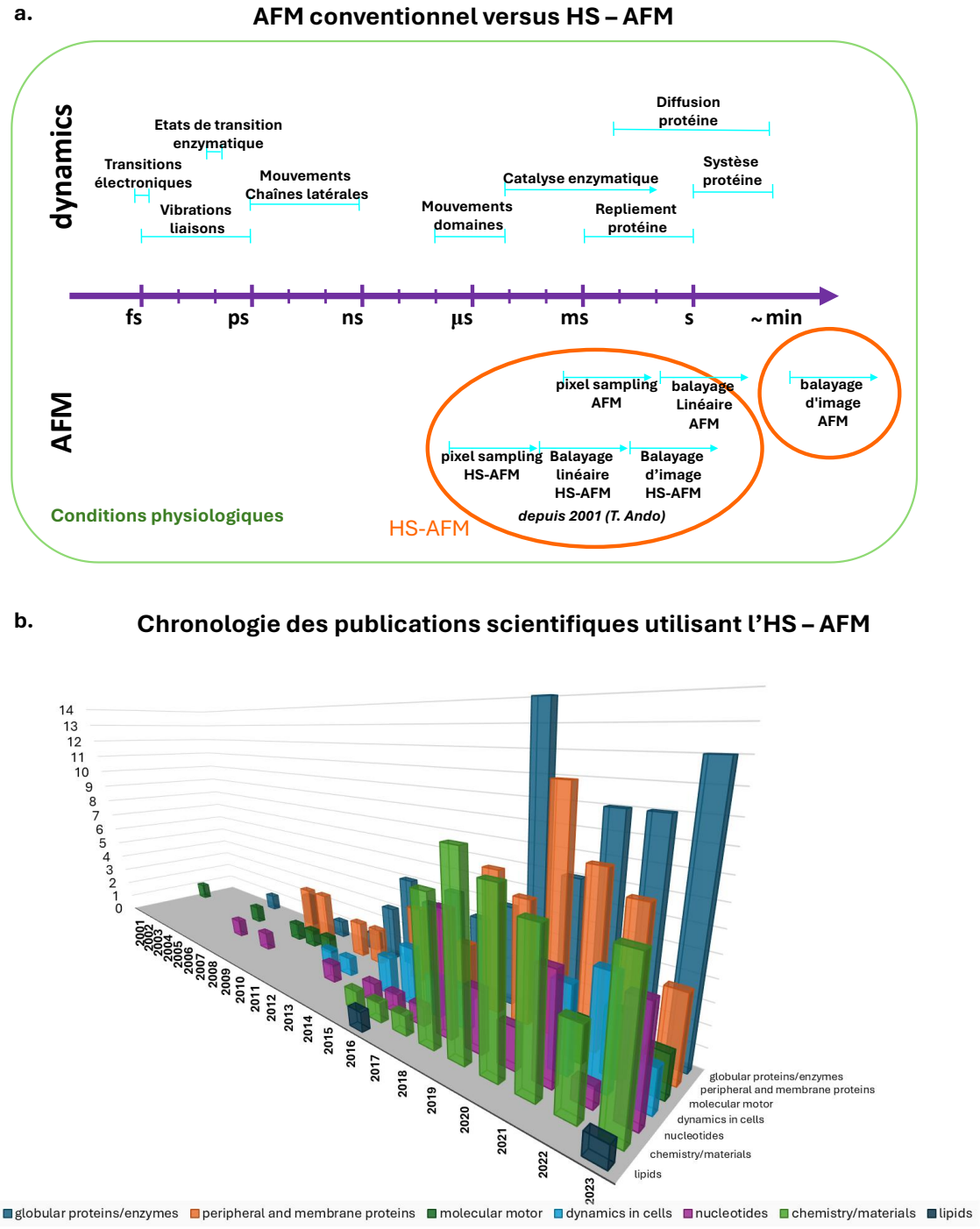


Figure 18 : **La Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse (HS-AFM). a.** Place de l'AFM conventionnel et de l'HS – AFM ne permettent pas la visualisation des mêmes processus biologiques, et une limite de temps d'acquisition explique l'inefficacité de la technique pour certains processus < ns. **b.** Chronologie quantitative des publications

scientifiques utilisant l'HS-AFM pour étudier les processus biologiques (*haut*) et par échantillons biologiques (*bas*).

Le principe de l'HS-AFM repose sur la miniaturisation des composants mobiles de l'AFM (levier et scanner) afin d'augmenter la vitesse de scan 1000x supérieur à l'AFM. Pour la sonde, le gain de vitesse n'impose pas de perte de performance. Cependant, dans le cas du scanner, la réduction de la plage de déplacement en X, Y et Z est de 1:10 par rapport à celui d'un AFM conventionnel[109]. Mais grâce à cette réduction et ce gain de vitesse, les systèmes et les processus biologiques de l'ordre du nanomètre et de la sub-seconde peuvent être observés. Ainsi, l'HS-AFM est une technique combinant les informations structurelles et la dynamiques. Comme avec l'AFM conventionnel, l'HS-AFM a été étendue aux applications de spectroscopie de force à grande vitesse (HS-FS) atteignant des vitesses de tractions directement comparables aux simulations de MD[142].

A ce jour, une myriade de références bibliographiques montrent et confirment les performances de l'HS-AFM pour décrire les processus biologiques, montré en Figure 18b. En effet, l'HS-AFM a permis de mettre en lumière des processus telles que les moteurs moléculaires[143], le remodelage de la membrane par des protéines associées[61,144,145], les grands systèmes macromoléculaires[146], les complexes protéines-ADN[147,148], la dynamique structurelle des protéines transmembranaires types canaux[149–151] et transporteurs[70,152], la dynamique des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP)[153], les interactions protéines-protéines[115,154,155], les structures membranaires[156], les interactions protéines-lipides[157,158] et les actions de perturbation et/ou de destructions membranaires par des molécules médicamenteuses[159–161].

L'HS-AFM offre également la possibilité de pouvoir modifier en direct, lors des acquisitions, quelques paramètres tels que les solutions (concentrations, pH, les sels), la température, la lumière ou encore la force appliquée. Ces modifications engendrent des changements structurels, fonctionnels ou dynamiques des échantillons en direct, facilitant la compréhension des processus biologiques sous-jacent[162]. Cependant, certains processus biologiques (dynamique des boucles dans les protéines, mouvements des domaines protéiques, processus enzymatiques et dynamique des transporteurs) sont plus rapides que la résolution temporelle offerte par l'HS-AFM (Figure18a)[163].

Tout comme l'AFM conventionnel, l'HS-AFM ne fait pas défaut à la règle de l'association technique avec d'autres microscopes afin d'apporter des informations complémentaires : un microscope hybride HS-AFM et optique[164] ou encore avec un microscope TIRF[165].

L'analyse informatique post-expérimentale jour un rôle de plus en plus important dans la compréhension des mesures AFM. La simulation AFM devient primordiale pour compléter les observations expérimentales. La prédilection des données HS-AFM à partir de données structurelles obtenues par les techniques structurales classiques (CryoEM, X-rays et RMN) ont récemment amélioré la compréhension des images topographiques AFM mesurées[166,167].

Objectifs de la Thèse

Comme expliqué précédemment, les interactions protéines – lipides jouent un rôle fondamentale dans la structure et la fonction des membranes cellulaires, influençant de nombreux processus biologiques essentiels. L'influence mutuelle entre les lipides membranaires et les protéines reste mal comprise à ce jour en raison de leur localisation dans les membranes biologiques et de la complexité de les étudier dans des conditions au plus proche du physiologique. Afin de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux qui régissent ces interactions et leurs impacts mutuels sur chaque entité, j'ai utilisé différentes systèmes biologiques et des avancées techniques d'imagerie en Microscopie à Force Atomique à Haute Vitesse (HS-AFM).

Chaque système biologique utilisé a permis de découvrir ou mettre en évidence des connaissances sur les interactions entres les protéines membranaires et leurs environnements lipidiques.

Chaque chapitre correspond à un système biologique distinct et, par conséquent, à un projet unique explorant une propriété biophysique spécifique de la membrane biologique :

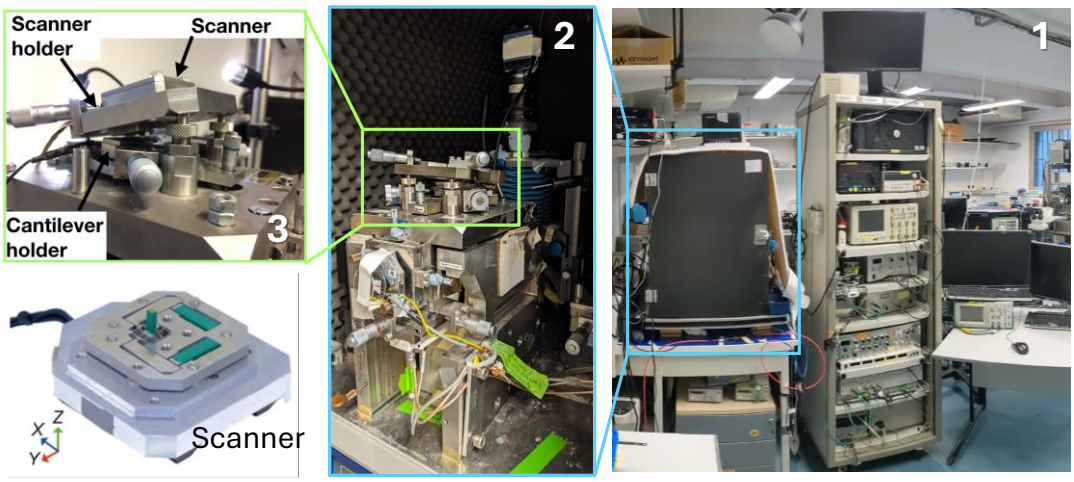
- Le Chapitre 1 : déterminer l'implication de la protéine bactérienne MurG dans la formation de domaines en phase fluide.

- Le Chapitre 2 : déterminer l'influence des lipides membranaires sur l'organisation structurelle d'un canal ionique de la membrane mitochondriale, VDAC1, en mimant la membrane externe de la mitochondrie.

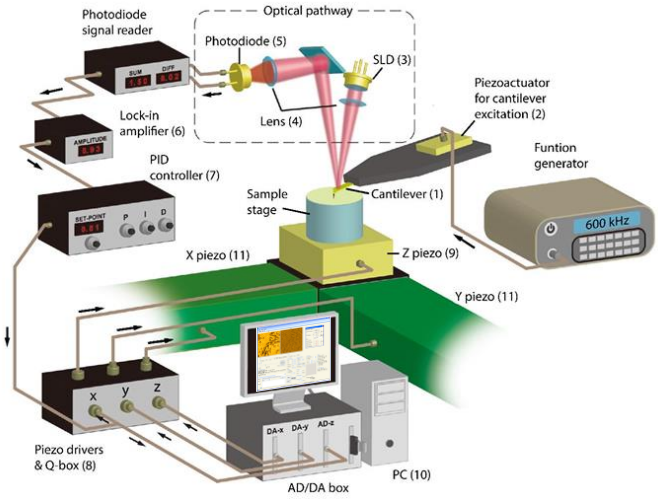
- Le Chapitre 3 : déterminer l'impact de la Lysenine, une protéine de la famille des Toxine Formant-Pore, sur la courbure membranaire.

- Le Chapitre 4 : créer un système biologique plus mimétique au sein de l'HS-AFM, deux orientations techniques ont été testés afin de mimer un gradient électrochimique de part et d'autre de la bicouche lipidique supportée.

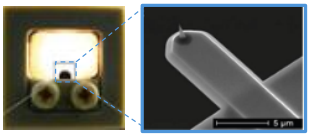
a.



b.



c.



Caractéristiques des sondes	Valeur	Moyenne	Chapitre et projet associé
NanoWorld USC-F1-2k**0.15** (NW.0.15)			
Fréquence de résonnance (air/liquide)	1200kHz	800 – 1600	• Chap. 2 • Chap. 3 • Chap. 4
Constante de force	0.15 N/m	0.06 – 0.30	
Longueur	7 µm	6 – 8	
Largeur	2 µm	1.5 – 2.5	
Epaisseur	0.08 µm	0.06 – 0.10	
NanoWorld USC-F1-5k**0.6** (NW.0.6)			
Fréquence de résonnance (air/liquide)	1500kHz	1200 – 1800	Chap. 1
Constante de force	0.6 N/m	0.2 – 1.1	
Longueur	7 µm	6 – 8	
Largeur	3 µm	2.5 – 3.5	
Epaisseur	0.1 µm	0.08 – 0.12	
Olympus BL-**AC40**TS (AC40)			
Fréquence de résonnance (air/liquide)	110kHz	75 – 145	Chap. 3
Constante de force	0.1 N/m	0.02 – 1.4	
Longueur	38 µm	35 – 41	
Largeur	16 µm	14 – 18	
Epaisseur	0.1 µm	0.18 – 0.22	

*Données obtenues à l'air.
**Forme pyramidale conventionnelle.

Figure 19 : **Le Microscope à Force Atomique à Haute Vitesse. a.** Photographie de l'HS-AFM. ***1*** Photographie d'un HS-AFM SS-NEX avec une boite thermorégulant. ***2*** Photographie de l'intérieur de la boite et de la tête de l'HS-AFM. ***3*** Photographie d'un scanner HS-AFM montrant le scanner positionné, le support du scanner et de la pointe AFM. *Bas Schéma d'un scanner HS-AFM*. **b.** Représentation schématique de l'HS-AFM modifié pour ajouter un module optique (entouré en pointillé). **c.** Sondes d'HS-AFM. *Haut* Photographie du support de sonde d'HS-AFM utilisé montrant le positionnement et la « piscine » permettant de garder l'échantillon en milieu aqueux. A sa droite, l'image d'une sonde HS-AFM NW.015 obtenue par Microscopie Electronique à Balayage. *Bas* Tableau récapitulatif des caractéristiques des sondes AFM fournies par les industriels et utilisées lors de la thèse.

Méthode & Matériels

Dans cette partie, nous aborderons la partie plus protocolaire en généralisant les informations concernant la préparation des échantillons (liposomes et Bicouches Lipidiques Supportées (SLBs)), les informations d'acquisition par l'HS-AFM et la partie traitement – analyse des données obtenues. Les informations propres aux projets, notamment les échantillons, seront détaillés dans les chapitres associés.

1. HS-AFM et acquisition des images

Lors de ces travaux de thèse, l'imagerie à haute résolution et à grande vitesse a été possible grâce au microscope AFM sous la version du système HS-AFM de type Ando "SS-NEX" (RIBM, Tsukuba, Japon)[140] modifié pour ajouter un système de Fluorescence[164] présenté en Figure 19a. Pour ajouter ce module le laser a été remplacé par une diode superluminescente (SLED, emission wavelength: 750 nm; EXS 7505-B001, Exalos, Schlieren, Switzerland) et le chemin optique a été modifié pour collecter l'image optique. L'amplificateur de verrouillage a également été remplacé par un analyseur de Fourier rapide plus puissant (Hinstra, Transcommers, Budapest, Hongrie). Un schéma de l'appareil est présenté à la Figure 19b.

Les principales caractéristiques sont les suivantes : (i) vitesse de scan maximum de 1µs/pixel, (ii) paramètres des piézo-électriques (x = 4µm, y = 4µm, z = 2µm) et (iii) la résolution en Z d'environ ~0,1nm.

Les films HS-AFM ont été obtenus en optimisant les paramètres d'imagerie à haute résolution (vitesse de scan, taille de l'image, forme de la pointe).

Les caractéristiques des sondes courtes (longueur ~7µm) conçues pour l'HS-AFM qui ont été utilisés sont présentées dans la Figure 19c. Les sondes utilisées proviennent de la société NanoWorld (Neuchâtel, Suisse) pour les modèles USC-F1-2k0.15 (NW.0.15) et USC-F1-5k0.6 (NW.0.6) (pour les expériences obtenues en mode « tapping »), et de la société Olympus (Watsonville, USA) pour le modèle BL-AC40TS (AC40) (pour les expériences en mode « jumping »). Les sondes NW0.15 et NW0.6 sont constituées d'un matériau semblable au quartz recouvertes d'une fine couche d'or de 20nm sur les deux côtés afin d'améliorer la réflectance du laser sur la sonde. La pointe est fabriquée à partir de carbone haute densité/diamant par dépôt de faisceaux d'électrons (EBD, *Electron Beam Deposition*). Les sondes ont une hauteur d'environ 2,5 µm, avec un rapport d'aspect de l'ordre de 5:1 et une tip apex rayon inférieure à 10 nm. Les sondes AC40 sont constituées en silicium recouvertes d'une couche d'or de 70nm à l'arrière de la sonde, sur un levier en nitrite de silicium. La sensibilité du système AFM à la déviation de la sonde était de 0,1 $V.nm^{-1}$. L'amplitude libre était de ~ 10-100 Å et le point de consigne de l'amplitude d'imagerie était fixé à ~ 90 % de

l'amplitude libre. Dans ces conditions, la force appliquée par la pointe HS-AFM sur l'échantillon a été estimée à < 100 pN.

Voici les modes utilisés lors de mes expériences :

Pour la majorité des études effectuées, le mode intermittent (ou « amplitude de modulation » ou « tapping ») a été utilisé avec le microscope présenté en Figure 19. Pour ce mode, la sonde oscille près de l'échantillon et près de sa fréquence de résonance. L'amplitude est maintenue constante via une boucle de rétroaction. En espaçant les contacts, les dommages sont limités pour l'échantillon et pour la sonde, ce qui en fait le mode le plus utilisé avec les échantillons biologiques.

Le mode cartographie mécanique dit « jumping » a été le principal mode pour l'étude du *Chapitre 3*. Les mesures ont été effectuées avec un HS-AFM SS-NEX modifié, lors de ma thèse, et incorporant une nouvelle électronique de contrôle (Nanotec Electrónica S.L., Madrid, Espagne) en mode Jumping Plus[168]. La pointe se déplace le long de l'axe Z jusqu'à ce qu'une force d'interaction prédéterminée soit atteinte. Des données topographiques sont acquises, puis la pointe se désengage de la surface et se déplace latéralement d'un pixel pour répéter le processus. Ce déplacement latérale loin de l'échantillon minimise les interactions. Pendant l'imagerie, des cartes de rigidité peuvent être obtenues, calculées à partir des données topographiques, et normalisées en fonction de la pente de la zone de contact et du nombre de points de contact. Le paramètre de normalisation est calculé en effectuant une courbe de force sur mica afin d'obtenir la valeur maximale de la rigidité dans la carte topographique. Après un ajustement de la sensibilité et de la constante de ressort de la sonde, nous pouvons convertir les cartes de rigidité obtenues en V/nm en pN/nm. Pour identifier la rigidité locale de l'échantillon, des essais d'indentation unique ont été effectués, avec enregistrement de courbes individuelles de force d'indentation (FIC). La topographie des échantillons a été contrôlée avant et après l'enregistrement de chaque courbe d'indentation. Les propriétés mécaniques de l'échantillon, telles que la constante élastique (k), ont été obtenues à partir de ces FIC et comparées à la rigidité mécanique des cartes de rigidité.

2. Traitement / Analyse des données HS-AFM

Les données fournies par l'HS-AFM sont des films, permettant l'accès à la dynamique moléculaire. Plusieurs traitements de données sont généralement nécessaires pour corriger les problèmes liés à l'acquisition de ces films. Les principaux problèmes sont la dérive du scanner (quelques nanomètres corriger en aligner les images entre elles) et le décalage entre la sonde et le plan de l'échantillon (non parallèle, une pente se crée). La correction de la dérive en XY, l'ajustement au plan et l'aplatissement des images ainsi que l'analyse des images sont effectués par les logiciels ImageJ[169] et WSxM[170].

Afin de faciliter la comparaison entre les résultats expérimentaux obtenus en AFM et les simulations, dans certains cas, nous avons utilisé le logiciel BioAFMViewer créer par les chercheurs R. Amyot *et al.*[166] BioAFMviewer est un logiciel qui simule les structures biomoléculaires à partir des fichiers structurels PDB (Protein Data Bank) en représentations graphiques AFM similaires aux résultats des expériences AFM. Les paramètres de résolution AFM et de géométrie de pointe utilisés sont : angle de cône de 8° et rayon de pointe de 1nm Le logiciel comprend également une fonction d'analyse électrostatique, qui calcule l'attraction entre une molécule et une surface et prédit l'orientation de la molécule sur cette surface (en utilisant les paramètres par défaut : mica). Il teste plusieurs orientations et calcule l'énergie potentielle électrostatique pour chacune d'entre elles, ce qui indique la stabilité de la position. BioAFMviewer affiche les cinq orientations ayant les énergies les plus faibles parmi celles testées, représentant les positions les plus stables[171].

3. Préparation des échantillons

3.1. Formation des liposomes type SUVs et des SLBs

Pour chaque projet et en fonction de leurs besoins, des liposomes de compositions lipidiques différentes ont été préparés et montrés dans le tableau 2.

Tableau 2 : **Composition lipidique des différentes SUVs produites et utilisées pour chaque projet associé.**

Chap. 1 :	Chap.2 :	Références des lipides
100% POPG	100% POPG	**POPG** : *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)* – ref. 840457, **DOPG** : *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)* – ref. 840475, **DPPG** : *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)* – ref. 840455, **POPE** : *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* – ref. 850757, **CL ou CA** : Cardiolipine, *1',3'-bis[1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho]-glycerol* – ref. 710333, **E.coli Extract Total*** : ref. 100500, **Egg SM** : *sphingomyéline* – ref. 860061, **Chol** : *cholesterol* – ref. 700100, **DOPC** : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine – ref. 850375, **DOPS** : *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine* – ref. 840035, **DPPC** : *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* – ref. 850355. *Composition de l'extrait lipidique **E.coli Extract Total** (wt/wt%) : 57.5 PE, 15.1 PG, 9.8 CA, 17.6 Inconnu.
100% DOPG	100% Egg PC	
100% DPPG	POPC:POPE (65:35)	
E.coli Extract Total	POPC:POPE (50:50)	
POPE:POPG (3:1)	POPC:POPE:Chol (59:31:10)	
POPG:CA (8:2)	POPC:POPE:Chol (59:31:7,5)	
Chap. 3 :	POPC:POPE:Chol (59:31:5)	
SM:Chol (1:1)	POPC:POPE:Chol (64:34:2)	
Chap. 4 :	POPC:Chol (90:10)	
DOPC:DOPS (8:2)	POPC:Chol (95:5)	
DPPC:DOPS (8:2)	POPC:Chol (98:2)	
SM:DOPS (1:2)		
SM:Chol:DOPS (40:40:20)		

Pour le Chap. 2 : Protéoliposomes – protéine : VDAC1 produit par notre collaboratrice (plus de détails dans le Chap.)

Pour former des liposomes de type petites vésicules unilamellaires (SUVs), les lipides ont été achetés chez Avanti ® (Avanti Polar Lipids Inc. Al. US) et ont été conservés en poudre ou dans des solutions de stock de chloroforme à -20°C. Les lipides ont été dissous dans une

solution préalablement préparée dans du chloroforme pour atteindre une concentration finale de 1 mg.mL^{-1}. Le solvant organique a été doucement évaporé sous un flux d'azote. Puis, ils ont été placés pendant une nuit sous vide, afin d'éliminer les traces éventuelles de solvant organique. L'échantillon a été réhydraté avec un « tampon de réhydratation » (10 mM HEPES, 150 mM KCl, pH 7.4) chauffé à ~ 65 °C. Ensuite, l'échantillon a été plongé dans un bain thermique à 65 ºC pendant 45 secondes et vortexé pendant 45 secondes. Ce cycle de chauffage/vortex a été répété 5 fois. Enfin, la solution de liposomes a été soniquée pendant 30 minutes dans un bain à ultrasons afin de former les SUVs (Figure 20a).

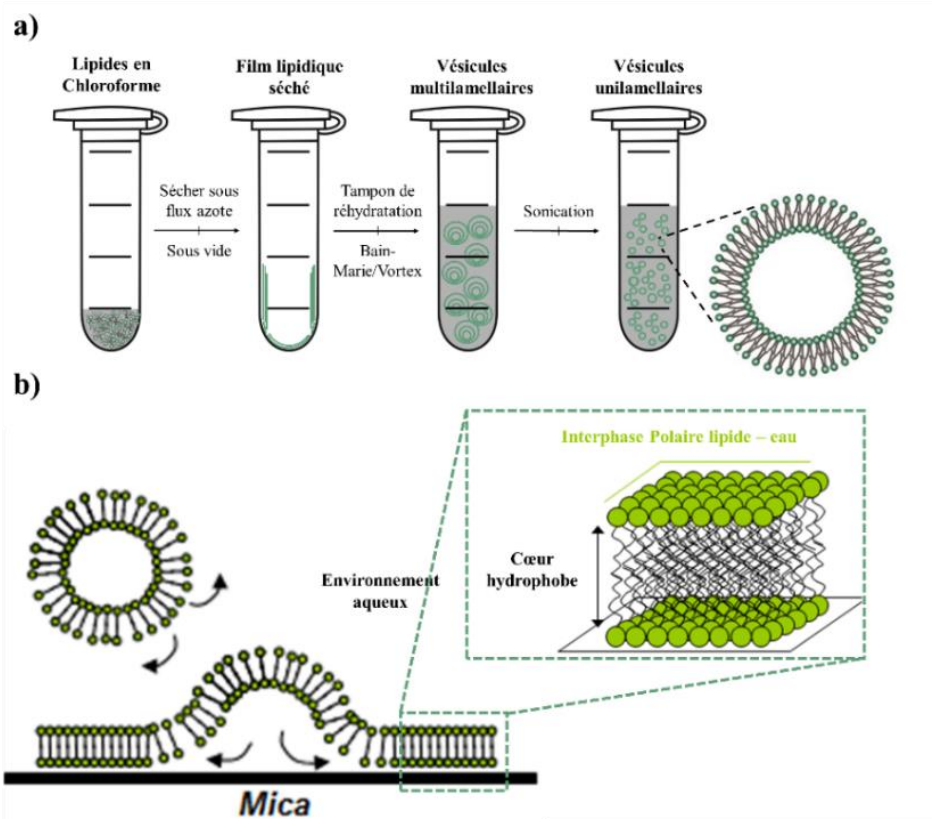


Figure 20 : **Préparation des liposomes et des bicouches lipidiques supportées en AFM. a.** Préparation des petites vésicules unilamellaires (SUVs). Les lipides sont mélangés à des rapports de poids ou molaires souhaités (*voir tableau X*) dans du chloroforme, puis séchés sous un flux d'azote afin d'être laissés dans une chambre sous vide pendant plus de 2 heures minimum (pour continuer l'étape du séchage). Le film lipidique séché est hydraté dans un tampon aqueux. La solution subit 5 cycles de 45s de Bain-Marie et 45s de vortex pour former des vésicules multilamellaires. La sonication est utilisée pour produire des vésicules unilamellaires. **b.** Représentation schématique du processus des bicouches lipidiques supportées sur un substrat de mica.

Pour former une bicouche lipidique supportée homogène, un mélange de SUVs (1mg.mL^{-1}) et de « tampon de réhydratation » composé d'ions divalent (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl2) ont été déposés sur un disque de mica muscovite fraîchement clivé pendant ~ 30min à température ambiante selon les lipides qui composent les SUVs (Figure 20b). Le Ca^{2+} permet d'aider la formation de la SLB en jouant le rôle de pont électrostatique dans l'interaction des lipides et la mica qui est chargée négativement. Afin d'aider l'ouverture des liposomes et assurer une fluidification complète (une bicouche lipidique recouvrant toute la surface de la mica), l'incubation peut être placée sur une plaque chauffante (température > au *Tm* du/des lipide(s)) et dans une chambre humide pendant ~ 30min. L'échantillon est rincé 20 fois par le même tampon afin d'éliminer les excédents de lipides non fixés, puis placé dans le système HS-AFM dans un « tampon d'imagerie » (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl2). L'acquisition des données peut être effectuée à température ambiante ou à ~ 35°C (montrée en Figure 19a) où la température est suivie et contrôlée afin de mimer des conditions physiologiques.

Le protocole spécifique d'incubation des liposomes (en fonction des lipides qui les composent) sur un disque de mica est détaillé pour chaque projet dans le chapitre associé dans une partie dédiée : Chap. X 2.Materials.

3.2. Incubation des protéines

Il y a différentes méthodes pour étudier l'implication d'une protéine membranaire et comprendre l'interaction entre les lipides et la protéine d'intérêt. La méthode utilisée est choisie en fonction de la catégorie de la protéine membranaire (associée ou transmembranaire) et en fonction de la question biologique du projet associé.

La protéine peut être incubée directement sur le disque de mica fraîchement clivé ou préalablement préparée avec une SLBs de composition lipidique souhaitée. Si le processus d'interaction et d'organisation entre la SLB et la protéine sont étudiées, la protéine peut être injectée au cours d'une acquisition de la bicouche lipidique. Pour les protéines transmembranaires, la reconstitution de la protéine dans des liposomes préformées (formation de protéoliposomes) sont préparées avant d'incuber l'échantillon sur un disque de mica fraichement clivé (conditions à adaptées comme pour l'incubation d'une SLB : température, temps, tampon).

3.2.1. Chapitre 1 : The ancient mechanism of membrane compartmentation of the glycosyltransferase enzyme MurG discovered by HS-AFM.

Pour analyser l'auto-organisation de MurG, 1µL de solution de protéine MurG à 0,5mg.mL-1 a été directement déposé sur un disque de mica fraîchement clivé et incubé

pendant 5 min à température ambiante sous une hotte humide. Ensuite, l'échantillon a été directement monté sur le HS-AFM pour réaliser les expériences.

Pour visualiser l'effet de la protéine MurG sur les SLBs (ici les différents mélanges de lipides testés sont de 1 mg.mL-1 : POPG ; DOPG ; DPPG ; E.coli Total Lipids et POPG:CL (5:1)), 1µL a été déposé sur un disque de mica, avec des SLBs homogènes et montés directement sur le HS-AFM pour l'imagerie.

Pour visualiser l'effet du substrat, UDP-GlcNAc, 2µL à ~13 nM, a été injecté après l'observation des domaines lipidiques afin d'enregistrer son effet sur l'organisation de la bicouche.

3.2.2. Chapitre 2 : Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1.

Pour analyser l'oligomérisation de VDAC1 dans une membrane mimant celle de la membrane externe de la mitochondrie, VDAC a été produit, purifié et reconstitué dans des membranes composées de POPC, POPE et de cholestérol à différentes ratios.

Pour former une SLB homogène contenant des protéines, un mélange de 15 µl de la suspension de protéoliposomes (1 mg/ml) et de 85 µl de "tampon d'incubation" (10 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 15 mM CaCl2) a été incubé pendant 1 heure à température ambiante sur un mica fraîchement clivé sous une hotte humide. L'échantillon a été rincé 10 fois et imagé par HS-AFM dans le "tampon d'imagerie" (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl2) à 35 °C pour vérifier l'homogénéité de la membrane formée et être au plus proche des conditions physiologiques.

3.2.3. Chapitre 3 : Lysenin induces curvature membrane.

Pour analyser les assemblages de lysénine, 1µM de solution de protéine de Lysénine a été directement déposé sur un SLB de SM:Chol (1:1), dans un tampon de 2mM Hepes pH 7.4, 5mM MgCl2, 10mM NaCl, incubé pendant 30 min à température ambiante sous une hotte humide. Puis l'échantillon a été rincé avec le même tampon 10 fois. Enfin, l'échantillon a été directement monté sur le HS-AFM pour réaliser les expériences.

3.2.4. Chapitre 4 : Gradient

Bactériorhodopsine :

Annexine V :

Le protocole spécifique à l'étude associée est détaillé dans la partie dédiée : Chap. X 2.Materials.

3.3. Mica perforées

En utilisant la microscopie AFM ou HS-AFM, nous devons déposer notre échantillon sur un support rigide telle que la mica. Comme présenté en *Introduction 3.1. La microscopie à force atomique*, les substrats poreux constituent une stratégie pertinente pour éviter de placer des biomembranes souples et minces sur des substrats durs. Cependant, le principal inconvénient des substrats poreux actuellement utilisés pour les études AFM est lié à la chimie de leur surface, ce qui rend difficile l'obtention d'une formation large et homogène de bicouches lipidiques et d'éventuelle rupture spontanée des membranes sur les grands pores (centaines de nm à micromètres) arriver fréquemment[172].

Grâce à une collaboration avec les Dr. Laura Picas (Centre de Biochimie Structurale (CBS), Montpellier) et Dr. Adrian Carretero-Genevrier (Institut d'Électronique et des Systèmes (IES), Montpellier), nous avons pu utiliser des substrat de mica muscovite composés de nanopores dont la taille des pores est de quelques nanomètres. Dans les *Chapitre 3 et 4* de cette thèse, vous pourrez voir deux utilisations de ces mica avec nanopores.

Pour produire des micas nanoporeux, l'approche expérimentale est similaire à celle décrite dans le document 17REFrejectPICAS. Le processus s'effectue en deux étapes. Premièrement, les plaques de mica sont irradiés avec des ions Xe lourds (plutôt que des ions ou particules plus légers[173]) et à haute énergie (420 MeV) accélérés à l'aide d'un Cyclotron (Cyclotron Research Center, Louvain-la-Neuve, Belgique et GANIL, Caen, France). L'exposition à des ions hautes énergies produit des défauts locaux profonds sur quelques dizaines de microns. Puis, deuxièmement, les plaques de mica ont été immergés pour subir un traitement chimique, ici 20% en poids de HF (11,4M), pendant un temps défini, permettant une gravure chimique douce des nanopores. Cela permet une distribution aléatoire de nanopores de forme rhombique avec une dimension de pore contrôlée, comme le montre la caractérisation topographique AFM des nanopores en FIGURE21 Le temps de traitement défini la taille des pores gravés. La relation entre le temps de gravure (min) et le diamètre des pores (nm) obtenus est illustrée à la figure X+30X+90 et estimé à partir d'images AFM de substrats de mica nanoporeux. A noter que la profondeur des nanopores est nette et stable sur plusieurs cycles d'exfoliation.

Les micas nanaporeux ont été poinçonné à la taille standard des mica pour une utilisation en HS-AFM qui est de 0,5 cm. Afin de garantir une surface propre pour les incubations biologiques ultérieures, les micas sont poinçonnées « à la minute », soit le jour

de l'expérience et collés sur le scanner avec de la colle UV pendant 30min. L'exposition à la lumière violette permet de fixer la mica mais également de maintenir une surface propre. Nous avons pu noter que la surface des mica nanoporeux avaient une tendance à se salir plus rapidement.

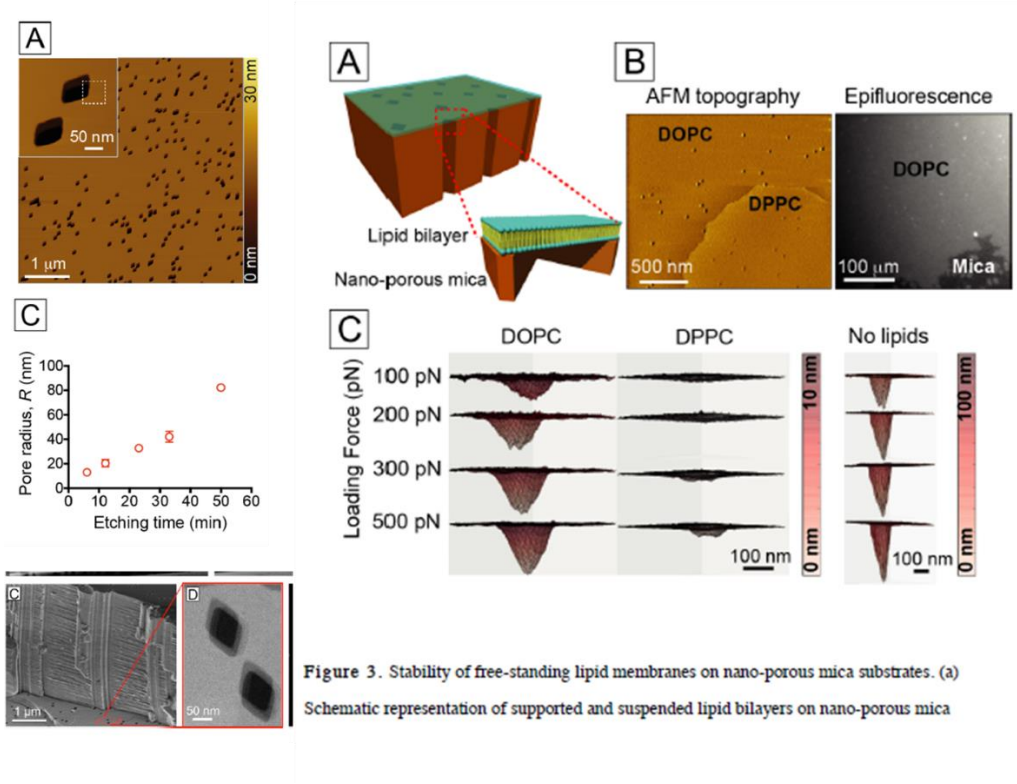


Figure 21 : **Caractérisation de la surface de substrats de mica nanoporeux.**

Chapter I – The ancient mechanism of membrane compartmentation of the glycosyltransferase enzyme MurG discovered by HS-AFM

Chapter I :
The ancient mechanism of membrane compartmentation of the glycosyltransferase enzyme MurG discovered by HS-AFM

1. Introduction

As explained in the *Introduction*, the plasma membrane is an internal structure in prokaryotes, protected by a cell wall and, in some cases, an additional outer membrane. It plays a crucial role in regulating the entry and exit of substances into and out of the cell. In bacteria, the cell wall can be classified into two main categories: Gram-positive and Gram-negative, using the Gram stain[174]. Gram-positive bacteria (purple) have a cell wall made up of a thick layer of peptidoglycan, while Gram-negative bacteria (pink) have a thin layer of peptidoglycan and an additional outer membrane made up of lipopolysaccharides called the periplasm, as shown in Figure 22.

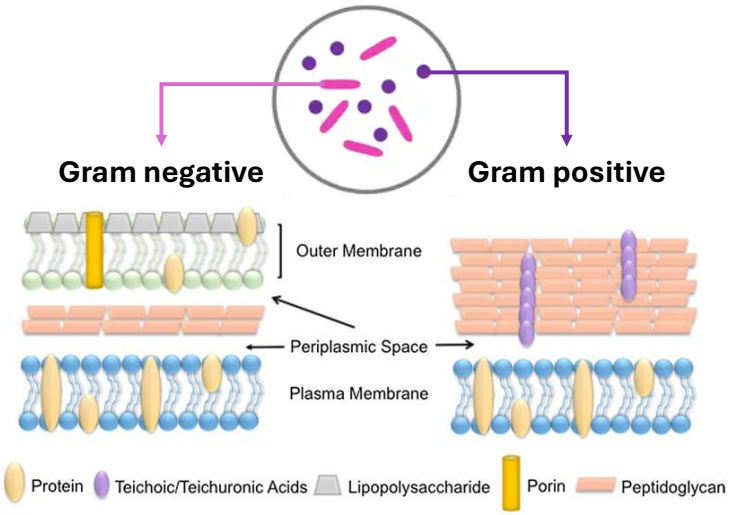


Figure 22 : **Comparison of bacterial cell wall structure.** Schematic representation of the composition of Gram-negative and Gram-positive bacterial membranes and the results under the microscope after Gram staining. Gram staining is used in medical bacteriology to colour bacterial walls and distinguish them by their ability to bind gentian violet (Gram+ cocci) or fushin (Gram- bacilli) (*adapted from Slavin et al.*)[175].

Peptidoglycan, also called murein, is a biopolymer present in all bacteria that provides protection from the external environment, especially osmotic pressure[176]. This three-dimensional mesh is made up of di-saccharide subunits (N -acetylglucosamine (NAG) and an N -acetylmuramic acid (NAM)) linked by peptides, the whole forming the polymer. The chemical nature of peptides differs between bacteria.

The biosynthesis of the peptidoglycan chain is a complex process that takes place in every part of the bacterium. The biosynthesis of the peptidoglycan chain is a complex process that takes place in every part of the bacterium[177] shown in Figure 23a. It is common to all Gram-positive or Gram-negative bacteria. It is therefore important to understand the different stages and, above all, the role of each player involved in the process. Each enzyme involved in this biosynthesis is important; inhibition of any one of them would lead to bacterial lysis. Among the enzymes involved, the Mur ligase family has attracted attention because of its exclusive presence in bacteria. Located in the cytoplasm, Mur ligases catalyse the formation of a peptide bond with the corresponding amino acid on the substrate, specific to each of these enzymes. These enzymes, from MurA to MurG, produce Lipid II, which is then translocated to the outer surface of the membrane by a flippase. The monomer formed is polymerised in the periplasm to form mature peptidoglycan[178].

This study focuses on the MurG protein, which is an *N*-acetylglucosamine transferase that catalyses the transfer of Uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) to Lipid I to produce the lipid-disaccharide known as Lipid II (Figure 23b). It is located in the inner leaflet of the bacterial membrane with a membrane contact at its *N*-terminal domain and a cytoplasmic contact[179] shown in Figure 23c. This essential enzyme is highly conserved in all bacterial species[176]. The crystallographic structure of MurG has been solved, as well as its mechanism of interaction with its substrate[180–183] (Figure 23c). X-ray structural studies revealed that the interaction between the MurG enzyme and its substrate UDP-GlcNAc induces a conformational change in the enzyme, making it more closed compared with its free form[180,183]. This change is mainly due to a rigid rotation of the C-terminal domain relative to the *N*-terminal domain, reducing the width of the gap between these domains by 2 Å. Substrate binding stabilises certain regions of the protein, essential for its enzymatic function as a glycosyltransferase. A comparison of MurG:UDP-GlcNAc structures between *E. coli* and *P. aeruginosa* shows a close overlap with a sequence similarity of 45%[184]. The relative orientation of the *N*- and *C*-terminal domains is not conserved, resulting in a widening of the inter-domain gap and a 6 Å displacement of the substrate in *E. coli*. Finally, studies have also shown that MurG is capable of interacting with other proteins, such as MraY and MreB[185], or the MurE-MurF dimer complex which allows the substrate to evolve with small distances within this protein-protein complex[186].

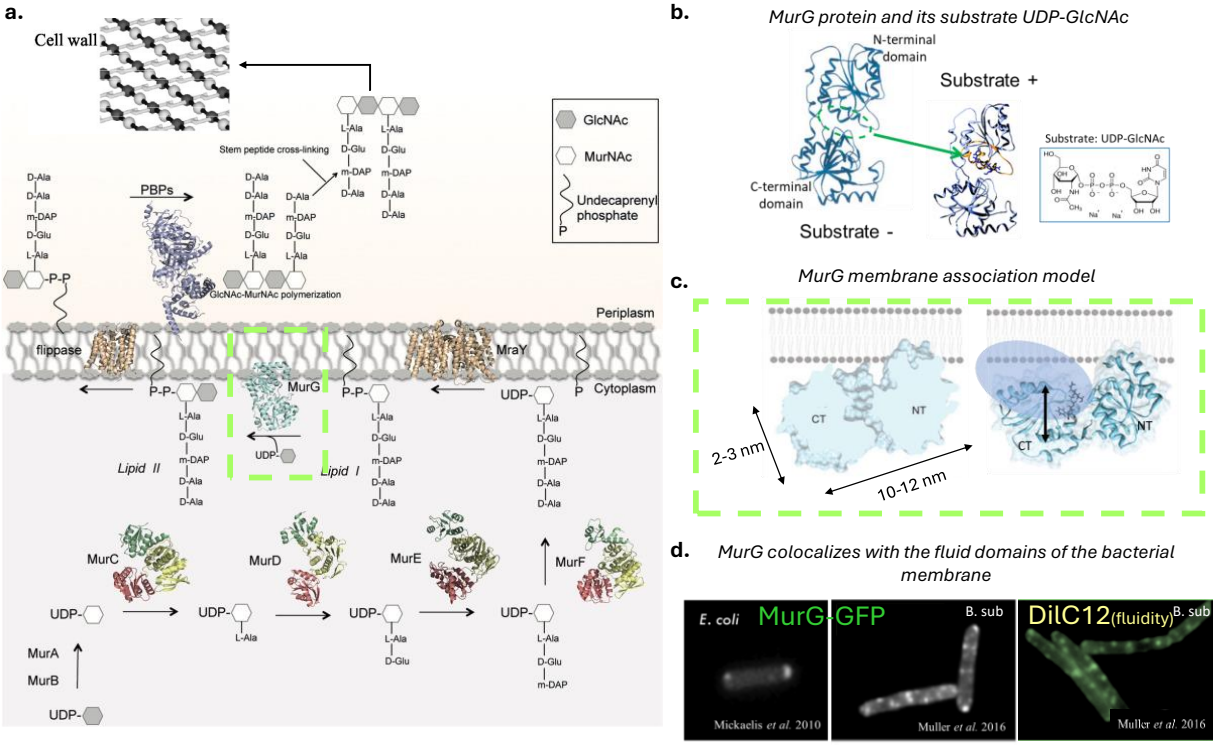


Figure 23 : **Presentation of MurG protein. a.** Diagram of the stages of peptidoglycan biosynthesis (*adapted from Laddomada et al.)*[186]. Step 1 is in the cytosol where *N-acetylglucosamine* is converted to *N-acetylmuramic acid* via various Mur enzymes. Stage 2 occurs on the inner surface of the cytoplasmic membrane, where membrane-bound MraY and MurG membrane proteins catalyse formation. Step 3 corresponds to the incorporation of the precursor into the existing peptidoglycan by Penicillin-Binding Proteins (PBPs). **b.** Structure of MurG protein with and without its UDP-GlcNAc substrate positioning between the *N*- and *C*-terminal domains (PDB: GT28)[183]. **c.** *Left* Representation of membrane-associated MurG model positioning in the internal leaflet of the bacterial membrane. *Right* The model proposes two modes of orientation possible when UDP-GlcNAc substrate interact with MurG : high-low displacement ("embedding") or rotational ("rolling") of the *C*-terminal domain (*adapted from Albesa-Jové et al.*)[179]. **d.** Localisation of MurG in *B.subtilis* and *E.coli* strains (*murG-msfgfp*). *Right* MurG localizes to natural RIFs in *B. subtilis* thanks to DilC12 (*adapted from Muller et al.*)[187].

Membranes have a certain fluidity due to the hydrocarbon chains in the phospholipids. This fluidity allows the different components of the membrane (lipids and proteins) to move over relatively long distances. This is known as lateral diffusion[188]. In bacteria, there are cases where proteins can move within the membrane and locate themselves in key regions for membrane production or cell division[189–191]. This dynamic is made possible by the lipid bilayer's ability to remodel its fluidity when it interacts with proteins, ensuring the presence of domains with lipids in an ordered conformation and less ordered proteolipid domains[192]. This bacterial-specific compartmentation mechanism has been termed "regions of increased fluidity" (RIFs)[193,194]. These membrane microdomains have been recently identified

in Gram-positive and Gram-negative bacteria by the use of fluorescence probes, such as Laurdan and DilC12, which identify lipids in a fluid state (liquid and disordered). Certain peripheral proteins such as MreB associate with lipids that are in a fluid, liquid and disordered state[193]. The binding of peripheral proteins, including cholera toxin subunit B (CTB) and Annexin V, has been suggested to regulate the lateral membrane heterogeneity of ordered and disordered liquid domains in vivo[195,196], vice versa, lateral lipid partitioning regulates the localisation of peripheral proteins[197]. In 2016, Muller and colleagues[198] reported that the mutual interaction between lipids and proteins influences the fluidity of the Bacillus subtilis membrane, leading to the preferential interaction of proteins and/or the induction of fluid domains in the bacterial cell membrane (Figure 23d). (This essential enzyme is highly conserved in all bacterial species[176].

I used HS-AFM imaging to demonstrate the involvement of bacterial proteins in the lipid partitioning process. Using this imaging, it was possible to visualise the dynamic interaction and membrane organisation of the MurG protein without labelling it, at the nanometer and sub-second scales, in a temperature-controlled physiological buffer[140]. o MurG proteins, *B.subtilis* and *S.schwarzengrund*, representing Gram-positive and Gram-negative bacteria respectively, were tested to check whether a difference in behaviour was observed. To exclude the effects of lipid-lipid interactions in the observations, I tested MurG activity using complex to minimal systems consisting of model lipid bilayers composed of a single type of phospholipid. The use of minimal systems makes it possible to clearly differentiate the effects due to protein-lipid interactions from those due to lipid-lipid interactions, and complements the information obtained using multicomponent model membrane approaches. In this way, only the contribution of MurG protein activity was analysed.

In addition, the MurG protein is a promising target for studying antibiotic resistance and finding new antibacterial molecules. In 2016, Muller and colleagues also hypothesised that the antibiotic Daptomycin[187] would target MurG to destroy the membrane. Other molecules such as Ramoplanin[199], or new inhibitors[200] such as diazepanone[201] or pyrimidinetrione[176], would target MurG in their mode of action.

Bacteria have developed resistance mechanisms in response to antibiotic treatments[202]. Infections caused by resistant bacteria, combined with the decreasing effectiveness of antibiotics, are a real global health threat, and the World Health Organisation (WHO) considers it to be the challenge of the 21st century[203,204]. Antibiotics have 5 modes of action, 2 of which target bacterial permeability by binding to the membrane or interfering with wall biosynthesis. The difference in bacterial wall composition may explain the difference in antibiotic efficacy, so it is necessary to continue developing new antibiotics and exploring new targets, or confirming targets such as MurG.

In this work, we addresses the question of protein domain formation in bacterial membranes using the HS-AFM visualization technique. We used the MurG protein that is a membrane-bound enzyme, and we assessed its macromolecular dynamics on a panel of

membranes at the molecular level, label-free and in physiological conditions. To our knowledge, this is the first AFM study of MurG. Our results show that the distribution and dynamics of MurG is highly influenced by the fluidity of the membrane and, importantly, that lipid-protein domains appear by the interaction of MurG with monovalent lipid bilayers (one lipid species), hence, unequivocally, our finding shows that the protein can self-create domains where it diffuses; contrary to what could be expected. By our coordinated AFM and fluorescent microscopy assay we show that the MurG protein induces cell membrane partitioning by creating regions of increased fluidity RIFs equivalent to those found in bacteria, and whose origin and composition are, to date, an open debate[205–207]. Finally, I show that MurG is a key step in the mode of action of the antibiotics Daptomycin and Laspartomycin in their efficacy.

2. Materials

2.1. MurG protein & UDP-GlcNAc substrate

B. subtilis: MurG protein was purchased by MyBioSource (ref. MBS1166403; MyBioSource Inc.,San Diego, US) in a purified form. The stock solution was diluted in "Imaging buffer" (10 mM *4*-(2-hydroxyethyl)-1-iperazineethanesulfonic acid HEPES, 100 mM NaCl and 1 mM $CaCl_2$, pH 7.4) at the concentration of 0.5 mg.mL^{-1}, so 13,2 µM.

S. schwarzengrund: MurG protein (sequence in Figure 2) was purchased by ProteoGenix (ref. PX-P4516; Schiltigheim, France) in a purified form. The stock solution was diluted in PBS (pH 7.4) at the concentration of 0.5 mg.mL^{-1}, so 12,8 µM.

UDP-GlcNAc substrate was purchased by Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich-Merck, Saint-Louis; US). The stock solution was diluted in Milli-Q water at the desired ratio UDP-GlcNAc:MurG 1:2; therefore at a concentration of ~13 nM.

2.2. Sample preparation

To analyse the self-organization of MurG, 1µL of MurG protein solution at 0.5mg.mL^{-1} was directly deposited on a freshly cleaved mica disk and incubated for 5 min at room temperature under a humid hood. Then, the sample was directly mounted on the HS-AFM to perform the experiments.

To visualize the effect of MurG protein on SLBs. The SLB was formed on a freshly cleaved mica disc. The piece was immersed in a drop of 50 µL of the liposome's solution + 50 µL of the "Incubation buffer" (10 mM HEPES, 100 mM NaCl and 5 mM CaCl2, pH 7.4) on a hotplate as an incubation step. Here are the different lipid mixtures tested are 1 mg.mL^{-1}: POPG; DOPG; DPPG; *E.coli* Total Lipids and POPG:CL (5:1). Then, the disc was immersed in "Imaging

Buffer" (10 mM HEPES, 100 mM NaCl and 1 mM $CaCl_2$, pH 7.4) for 10 min before being rinsed 20 times in the same buffer for cleaning away the excess. A thermal stabilization is finally necessary in order to have a homogeneous bilayer where, according to the PG lipid type, time and conditions were different. The incubation time as well as the temperature for POPG, DOPG, *E.coli* Total Lipids and POPG:CL (5:1) were 20 min at 65°C and DPPG lipid was 40 min at 110°C. The temperature melting (T_m) of POPG (-2°C) and DOPG (-18°C) guarantees fluid state at room temperature but in the case of *E.coli* Total Lipids (major lipid: POPE (+25°C)) and DPPG (+41°C), a higher temperature of the hotplate was necessary to assure the complete fluidization of the lipid. At this point the SLBs have been left thermalized at least 15 min in the HS-AFM system to cool down and promote a homogeneous spreading of bilayer. Finally, to visualize the effect of MurG, 1µL was deposited onto a mica disk, with homogeneous SLB and mounted directly on the HS-AFM for imaging. All experiments were performed at 35±1°C, by introducing the HS-AFM microscope inside a temperature-controlled box.

To visualize the effect of MurG protein on SLBs, 1µL was deposited onto a mica disk, with homogeneous SLB and mounted directly on the HS-AFM for imaging. The UDP-GlcNAc substrate, 2µL at ~13 nM, was injected after lipids domains were observed in order to record its effect on the bilayer organization.

2.3. Change of the composition of the experiment's solution during the imaging

To visualize the binding of MurG to the SLB, 4 µL of MurG was directly injected into the sample chamber during SLB imaging, resulting in final concentrations of approximately 0.53 µM for *B.sub* MurG and 0.52 µM for *S.schw* MurG

The salinity changes were achieved through addition of 10µl of 1M NaCl solution, obtaining a solution before of 0.1M and after of 0.18M. A homemade pump was used to inject the solution directly into the sample pool.

2.4. Dynamical imaging

HS–AFM observations were performed in oscillating mode optimized high–resolution imaging parameters REF. Short cantilevers designed for HS–AFM with a length of ~ 6 µm, a nominal spring constant of 0.1 – 0.2 N/m, a resonance frequency of 600 kHz and a quality factor of ~ 2 in solution were used bearing an electron beam deposition tip (NanoWorld k = 0.6 N.m-1, $f_{resonance}$ = 600 kHz) at the end of the cantilever. The sensitivity of the AFM system to probe deflection was 0.1 $V.nm^{-1}$. The free amplitude was ~ 10 Å and the imaging

amplitude setpoint was set to ~ 90% of the free amplitude. Under such conditions, the force applied by the HS-AFM tip on the sample was estimated to be < 100 pN.

3. Bacterial MurG membrane proteins can modulate lipid fluidity for compartmentation

This part consists of the transcription of the article submitted to Xdate in X.

Résumé

Les cellules eucaryotes et procaryotes compartimentent leurs membranes pour accomplir des fonctions spécifiques. Pour cela des protéines et des lipides spécifiques sont transitoirement réunis. Dans les cellules eucaryotes, les stérols lipidiques sont essentiels pour comprendre les mécanismes de compartimentation des membranes. Cependant, la plupart des cellules procaryotes ne contiennent pas de stérols dans leurs membranes. À ce jour, on sait peu de choses sur la compartimentation membranaire dans les cellules procaryotes qui contrôle, parmi de nombreux autres processus, la synthèse de l'enveloppe cellulaire dans les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. MurG est une enzyme de 38 kDa conservée dans les espèces bactériennes Gram-positives et Gram-négatives, et qui n'a pas d'équivalent dans les cellules de mammifères. Nous avons découvert que les enzymes MurG de *B. subtilis* et de *S.schwarzengrund* partitionnent dynamiquement les membranes biomimétiques de bactéries, sans qu'il soit nécessaire de recourir à des forces motrices de ségrégation des lipides. Dans des conditions de type infectieux, sur des membranes à un seul composant lipidique, notre microscopie à force atomique à grande vitesse découvre des "grappes de protéines", qui n'étaient jusqu'à présent prévues que théoriquement. Un modèle est fourni prédisant correctement les observations et les réactions à des stimuli tel que la variation de la force ionique. De plus, grâce à nos essais corrélatifs AFM-fluorescence, ces amas sont identifiés comme des "régions de fluidité accrue" (RIFs), semblables à celles que l'on trouve dans les bactéries vivantes. En outre, lorsqu'elles sont exposées à des antibiotiques, nos RIF se comportent comme celles que l'on trouve dans les bactéries, ce qui souligne l'importance biomédicale de notre découverte pour la recherche de médicaments.

PAPIER

4. Conclusion

Over the past decades, increasing evidence has shown the presence and importance of protein and lipid domains in bacterial membranes. However, the debate remains open on how bacteria form these domains since they lack certain components that generate the compartmentalization of eukaryotic membranes, such as cholesterol.

Work on the formation of protein domains by MurG in bacterial membranes, using the HS-AFM visualization technique—without labels and under physiological conditions—has shown that: (i) the distribution and dynamics of MurG are strongly influenced by membrane fluidity, and (ii) lipid-protein domains appear through the interaction of MurG with monovalent lipid bilayers (a single species of lipid), meaning the protein can itself create domains where it diffuses. These results contradict the general assumption that lipids, not proteins, are the main driving force of cell membrane partitioning, suggesting that lipid domains form first, followed by protein recruitment[208–210].

Here, confirmed by combined AFM and Fluorescence microscopy, the MurG protein induces cell membrane partitioning by creating regions of increased fluidity (RIFs) equivalent to those found in bacteria, whose origin and composition are still unclear. It seems that bacteria have evolved multiple mechanisms to organize their membrane with different properties and sensitivities than those used by eukaryotic cells. However, the results raise new questions: Does the interaction region with the membrane change with functional partner proteins like MurE[211]? And are these regions of increased fluidity what allow the recruitment of MurG partners?

Moreover, if MurG induces RIFs in the membrane where it diffuses and recruits partners, could this facilitate the development of new antimicrobial treatments in the future? To address the antibiotic resistance crisis, new antibiotics are needed, and the biophysical properties and processes of the membrane are becoming relevant as antimicrobial targets. As we have seen, MurG is crucial in the action mechanism of the antibiotics Daptomycin and Laspartomycin. The fluidity of the bacterial membrane linked to MurG is associated with the action of the drugs Rhodomyrtone[208] and Laspartomycin[212], and the multifaceted destabilization of the lipid bilayer's structural integrity is used and proven by Daptomycin[159,187].

5. Contribution to the work.

I carried out all the work presented that was obtained by HS-AFM. The data obtained by the AFM-TIRF microscope was carried out by Dr. Carlos Cuello and Dr. Adai Colom in Bilbao, Spain.

Chapter II – Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1

Chapter II :
Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1

1. Introduction

Mitochondria play a central role within cells. They are often described as the "powerhouses" producing energy in the form of ATP[213]. In addition to this key role, they are also involved in the regulation of intracellular calcium, signaling, proliferation, differentiation, aging, and apoptosis (programmed cell death). A dysfunction of this machinery can therefore lead to a wide range of pathologies such as myopathies, diabetes, and degenerative diseases such as Alzheimer's.

Furthermore, mitochondria have a unique feature: they are surrounded by two structurally and functionally distinct membranes (Figure 24a): (i) the Outer Mitochondrial Membrane (OMM) and (ii) the Inner Mitochondrial Membrane (IMM). These two mitochondrial membranes thus have very different roles and compositions, allowing for proper functioning[214]. The OMM serves as a relatively permeable barrier to small molecules and ions due to the presence of numerous ion channels such as Voltage-dependent Anion Channel (VDAC). It primarily acts as a barrier. In contrast, the IMM is much more impermeable and defines the mitochondrial matrix by forming folds (called cristae) to increase the exchange surface area. It contains the complexes of the respiratory chain and ATP synthase that produce ATP. This impermeability creates an electrochemical transmembrane gradient that provides the energy necessary for ATP synthesis. This difference in permeability and functional role between the two membranes is reflected in a distinct lipid and protein composition. This ensures the efficient execution of various essential biological functions of the mitochondrion within the cell. Due to this functional and distinct diversity, the lipid composition of the membranes can vary[213,215]. Within the same mitochondrion. Indeed, the lipid composition of the OMM can vary significantly due to interactions with neighboring membranes, such as contact sites between the IMM-OMM or between the OMM-ER (endoplasmic reticulum), which facilitate lipid transfer; but also in cases of disease. In neurodegenerative conditions such as Alzheimer's disease, alterations in mitochondrial lipid profiles have been observed[216], such as an increase in mitochondrial cholesterol levels[217,218].

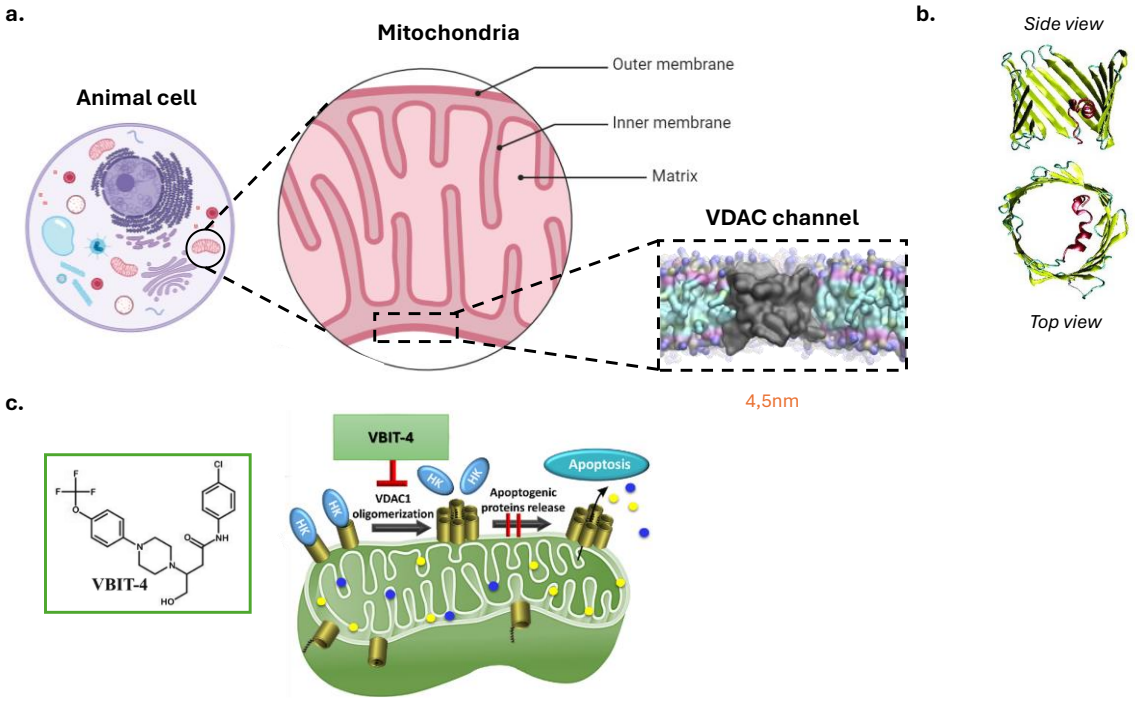


Figure 24 : **VDAC is a major transport channel of the mitochondrial outer membrane (MOM). a.** Schematic representation of mitochondria, its double-membrane with inner (IM) and outer (OM) membranes, with VDAC embedded in the MOM. **b.** Side and top views of mouse VDAC1 isoforme by *X*-ray cristallography (mVDAC1, PDB: 3EMN). In the side view, part of the β-barrel is cropped to show the N-terminal α-helix (in red)[219]. c. Formula of VBIT-4 inhibitor produced by Ben-Hail's team and schematic representation of the effects of VBIT-4 on VDAC1 (*adapted from Ben-Hail and al.*)[220].

To facilitate exchanges between the inside and outside of the mitochondrion, mitochondrial membranes contain several important types of ion channels. The VDAC is by far the most abundant protein in the OMM (>50%)[221], as shown in Figure 24a. Playing a crucial role in many cellular functions. In addition to facilitating the passage of ions and metabolites such as ATP and ADP across the membrane, VDAC is involved in numerous mitochondrial regulatory processes such as apoptosis, calcium homeostasis, mtDNA release, or lipid remodeling[222,223]. VDAC acts as a gatekeeper of the mitochondria. To date, the "VDAC" scientific community suspects up to 100 partners[224], including pro-apoptotic proteins like Bax and Bak[225], tubulin[226] or synuclein[227]. VDAC's ability to engage in multiple and sometimes opposing signaling pathways (pro- and anti-apoptotic) requires precise regulation of its interactions with its partners. In mammals, VDAC has three isoforms, each associated with distinct proteins involved in different pathways[228].

VDAC adopts a structure of 19 antiparallel beta-barrels connected by flexible loops forming a pore in the OMM with a diameter of 5nm, as well as an N-terminal region 26 residues long located inside the pore[229] (Figure 24b). VDAC1 adopts a 21-screw axis in the DMPC bilayer[230], i.e. along a crystallographic axis the protein alternates between upright and

inverted orientation. In vitro, VDAC can adopt different oligomeric conformations (monomer, dimer, oligomer) as evidenced by various techniques[231–233]. The oligomeric organization of VDAC in the membrane and its strong influence by protein-lipid interactions add another level of regulation, playing a major role in its function. Lipid composition can regulate its interactions with several partner proteins, and cholesterol and neurosteroid binding sites have been identified on VDAC. In particular, VDAC tends to oligomerize in lipid environments, with certain lipids promoting oligomerization[234,235].

This oligomerization being involved in mitochondria-mediated apoptosis[236,237], VDAC could be a promising target for new drugs to modulate apoptosis. In 2016, Shoshan-Barmatz and her team[220] developed new candidate drugs capable of inhibiting the oligomerization of VDAC1 and apoptosis. Through bioluminescence resonance energy transfer (BRET), they demonstrated that the inhibition of VDAC1 oligomerization by VBIT-4 would induce the inhibition of apoptosis. However, very recently, it was shown that at the same concentrations of VBIT-4, the inhibitor would suppress mitochondrial respiration by impacting the mitochondrial membrane potential, which would lead to cell death[238].

Studying the assembly of VDAC at the single-molecule level in lipids is challenging, but atomic force microscopy (AFM) is well-suited for evaluating the organization of proteins in membranes. In 2007, two independent AFM studies on yeast-derived OMM[221] and potato tuber[239] described multiple assemblies of VDAC in native membranes, with a predominance of large assemblies. Although these two studies are crucial for understanding the behavior of VDAC in the membrane, other proteins besides VDAC are present in the native membrane, and the specific lipid composition of the membrane was not controlled. Given the dynamic nature of membrane composition under physiological and pathological conditions, elucidating the influence of lipid composition on VDAC organization is essential.

In this study, we first use a combination of AFM and MD simulations in a controlled lipid environment to explore the influence of the main lipids of the OMM, POPC and POPE, and cholesterol on the organization of VDAC1. To determine the orientation of VDAC into assemblies, We developed a new method named “nanobead-mediated orientation determination,” where a gold nanoparticle of 5 nm, functionalized with a Ni-NTA group, is attached to the 6His-tag of VDAC1 facing the intermembrane space (IMS) side of the protein. In this work, we propose that VDAC clustering, favored by increased cholesterol content in MAM (mitochondria-associated membrane), facilitates efficient calcium import into the mitochondria. Then, in a second phase, we examine the effects of the inhibitor VBIT-4 on the oligomerization of VDAC1 in a controlled MOM.

2. Materials

2.1. Proteoliposome of VDAC1

The samples of VDAC1 into liposomes were produced and supplied by Lucie Bergdoll.

2.1.1 VDAC production and purification

The mouse VDAC1 gene bearing a 6-his tag in N-terminus inserted into the pQE9 vector was transformed into M15 E. coli cells for protein expression. Cells were grown at 37°C in LB medium to A600= 0.8 and induced with 0,4 mM IPTG for 4 h. Cells were harvested and resuspended in 50mMTris HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 20% sucrose, 0,6% Triton X-100, 0,1 mg/ml lysozyme. The resuspended pellet was sonicated and centrifuged (12,000xg, 15 min) to obtain inclusion bodies. The inclusion body pellet was washed with wash buffer [20 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 2 mM CaCl2], repelleted and solubilized in equilibration buffer [20 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 8 M urea]. VDAC1 was purified from solubilized inclusion bodies by Ni-NTA metal affinity column, equilibrated in equilibration buffer, washed with equilibration buffer containing 30 mM imidazole and eluted with equilibration buffer containing 150 mM imidazole. The urea-solubilised protein was concentrated to 250-300uM in an Amicon-10. 1ml of urea-solubilised protein was then rapidly diluted in 9ml of chilled 20mM tris buffer pH 8.0, 150mM NaCl, 1.5% LDAO, 5mM DTT and kept for 5-6 hours at 4°C on rotation. The 10ml protein solution was then transferred to a 7-kDa dialysis bag and dialysed against 1L of chilled 20mM tris buffer pH 8.0, 150mM NaCl, 2mM DTT overnight at 4°C. The next day, refolded protein was collected and ultracentrifuged at 355,000g for 45 minutes to remove aggregates. Protein was concentrated in an Amicon-50 and injected on a Superdex 200 increase 10/300 GL column equilibrated with 20mM tris buffer pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% LDAO, 2mM DTT. The monomeric VDAC peak was collected and concentrated to 2mg/ml. Stocks were flash frozen in liquid nitrogen and stored in 20% glycerol at -80°C. Samples were ultracentrifuged after thawing before reconstitution into liposomes to remove any possible aggregates.

2.1.2. Reconstitution into liposomes

POPE, POPC and cholesterol lipids were purchased from Avanti polar lipids in chloroform, mixed at the desired ratios and dried under nitrogen gas. The resulting lipid film was resuspended by vortexing in 150mM KCl, 20 mM Tris pH8 to a final concentration of 12,5 mg/ml of lipids. The suspension was heated at 37°C for 10 min then sonicated for 1 min or until formation of small unilamellar vesicles (100nm), as measured by dynamic light

scattering (DLS). Detergent n-Octyl-Beta-D-Glucopyranoside (β-OG) was added to a 0.65 detergent/lipid ratio (w:w). Proteins were added to the destabilized liposomes to a 3:1 lipid:VDAC ratio (w:w). Detergent removal was achieved by addition of Bio-beads at a Bio-bead/detergent ratio of 30 (w:w) overnight. The liposomes were analyzed by DLS after reconstitution.

2.2. Sample prepration

To form a homogeneous protein containing supported lipid bilayer (SLB), a mixture of 15 µl of the proteoliposome suspension (1 mg/ml) and 85 µl of "Incubation buffer" (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 15 mM CaCl2) was incubated 1h at room temperature on a freshly cleaved mica under a humid hood. The sample was rinsed 10 times and imaged by HS-AFM in "Imaging buffer" (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl2) at 35 °C to check the homogeneity of the formed membrane.

2.3. Dynamical imaging

HS-AFM movies were acquired in amplitude modulation mode optimised high–resolution imaging parameters with a modified HS-AFM (SS-NEX, RIBM, Tsukuba, Japan). Short cantilevers (length ~7 µm) designed for HS–AFM, presenting an electron beam deposition (EBD) tip, were used (USC-F1.2-k0.15 Nanoword, Switzerland). They are characterised by a nominal spring constant k = 0.15 N/m, a resonance frequency in liquid of fres = 500 kHz and a quality factor Qc ~ 2 (in liquid). HS-AFM sensitivity to probe the deflection was 0.1 V/nm. The imaging amplitude setpoint was set to ~90% of the free amplitude (~10 Å). All experiments were performed at 35°C, by introducing the HS-AFM microscope inside a temperature-controlled box.

3. VDAC1 diffuses into EggPC membrane

3.1. Contexte

The lipid composition of MOM varies according to cell type and organism. However, an approximate breakdown of the main lipid types is shown in table 3.

Table 3 : **Composition lipidique de la Membrane Outer Mitochondria (MOM).**

Lipid	Percentage
Phosphatidylcholin (PC)	~ 40-50%
Phosphatidylethanolamin (PE)	~ 30-40%
Cholesterol	~ 5-10%
Phosphatidylinositol (PI)	~ 5-10%
Phosphatidylserin (PS)	~ 3-5%
Cardiolipin	~ 2-5%

PC is in the majority in the outer membrane of mitochondria, playing a crucial role in membrane structure and fluidity. Firstly, we wanted to check the impact of POPC alone on VDAC1. In order to have a point of comparison, EggPC, a natural mixture of different phosphatidylcholines present in eggs, was used. Unlike POPC, which has a defined structure with very specific fatty acid chains, EggPC is a complex mixture (Figure Xa) that better reflects the diversity of lipids in biological membranes.

For a first approach, the comparison of the behaviour of VDAC1 in these two reconstituted membranes (pure POPC vs. pure EggPC) can provide a first indication of the impact of lipids on VDAC1.

3.2. Results & Discussion

The behaviour of VDAC1 is different in the reconstituted membranes of POPC alone and EggPC alone.

POPC is a synthetic phospholipid with specific fatty acid chains (one saturated and one unsaturated). This gives a well-defined fluidity and membrane thickness. In contrast, EggPC is a mixture of phospholipids extracted from eggs, comprising various fatty acid chains, both saturated and unsaturated, with variability in their composition by 14% compared to pure POPC (Figure 25a). The EggPC blend can make the membrane more heterogeneous and

flexible compared to a more uniform POPC membrane, thus impacting on membrane fluidity, thickness and curvature[74].

Shown in Figure 25b, we can observe that VDAC1 has a tendency to diffuse locally in EggPC membranes unlike in POPC, where VDAC1 is more static. The standard deviation shows static areas in blue and moving areas in red. The difference in diffusion of VDAC1 is obvious. In addition, in the pure EggPC membrane, we were also able to observe small assemblies of VDAC1 with a certain dynamic. Zooming in on this area reveals a VDAC1 pore (white circle).

This observed difference in diffusion can be attributed to several factors linked to the composition and physical properties of the membranes.

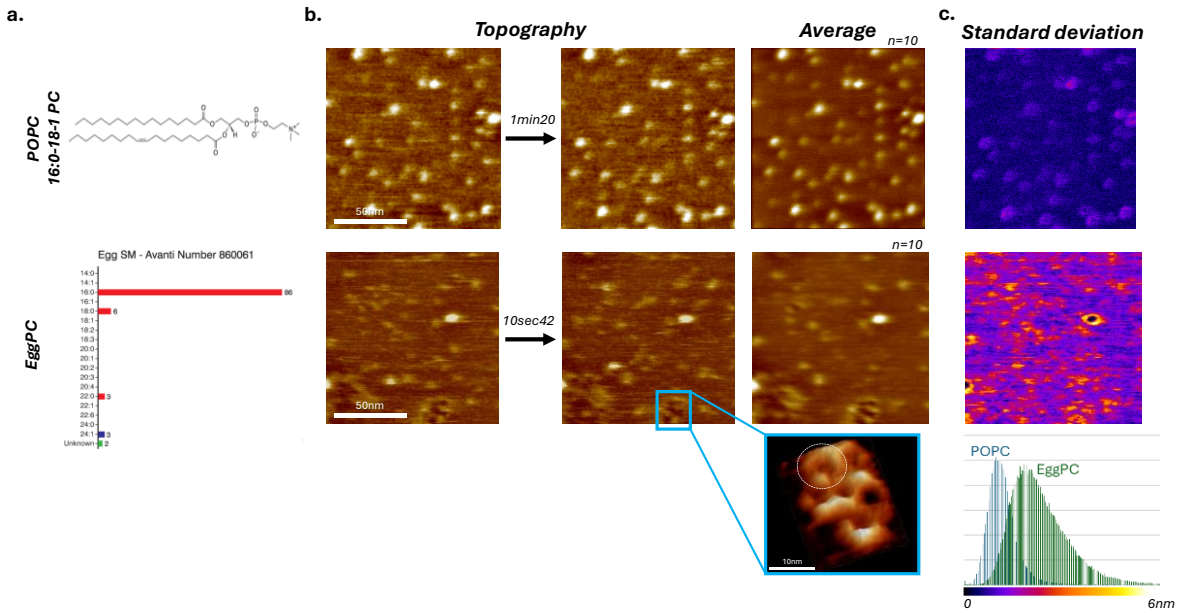


Figure 25 : **VDAC1 diffuses into the EggPC membrane. a.** Representation of the POPC lipid and the composition of the EggPC mixture. **b.** AFM topographic images of VDAC1 reconstituted in a pure POPC (top) and pure EggPC (bottom) membrane. A pore assembly of VDAC1 in the pure EggPC membrane is shown in the blue square and zooming in on this area reveals a VDAC1 pore (white circle). **c.** Standard deviation showing the diffusion of VDAC1 in the membrane of pure POPC (top) and pure EggPC (bottom). The histogram represents the difference in the behaviour of VDAC1 in the lipid membranes tested: red represents VDAC1 diffusing into the membrane and blue represents VDAC1 static in the membrane.

Lipids interact with ion channels via hydrophobic or electrostatic bonds. REF2006HIANIK The varied composition of EggPC may offer a different range of interactions compared to POPC, thus affecting the interaction between lipids and VDAC1. In addition, natural

membranes such as those made from EggPC may contain cholesterol and other minor lipids (2% unknown in this case) influencing membrane fluidity.

In conclusion, differences in lipid composition, fluidity, specific interactions with channels and the possible presence of cholesterol and other lipids explain why VDAC1 behaves differently in POPC-only membranes compared with EggPC-only membranes. It would appear that VDAC1 is highly sensitive to its lipid environment. To understand the impact of lipids on the VDAC1 channel in mitochondrial environment, POPC will be used for the rest of the study, enabling a controlled biomimetic membrane.

4. Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1

This part consists of the transcription of the article submitted to 27/06/2024 in Nature Communication, and on bioXriv : DOI: 10.1101/2024.06.26.597124

Résumé

La physiologie des mitochondries est étroitement liée à l'oligomérisation des canaux anioniques dépendants du voltage (VDAC), qui jouent le rôle de gardiens des mitochondries. Cependant, les déterminants moléculaires de l'oligomérisation des VDAC restent mal compris. Ici, nous avons utilisé la microscopie à force atomique pour étudier les effets de trois lipides de la membrane externe mitochondriale (MOM) sur les assemblages de VDAC. Nous avons observé que VDAC forme des grappes sensibles aux lipides, appelées « nids d'abeilles », et que leur compaction est régulée par le cholestérol. Les simulations de dynamique moléculaire ont révélé l'affinité de VDAC pour le cholestérol et la phosphatidyléthanolamine, qui influencent tous deux la formation de ces « nids d'abeille ». Bien que nous ayons identifié des assemblages en « nid d'abeille » semblables à ceux de la MOM native, les écarts par rapport à la composition lipidique physiologique ont entraîné divers degrés de perturbation de ces structures natives. Cela souligne l'impact profond de l'environnement lipidique sur l'organisation de VDAC. Ces résultats soulignent l'importance physiologique de l'hétérogénéité des lipides et des changements au sein des membranes biologiques résultant de contacts membranaires ou de pathologies dans la modulation du comportement des VDAC.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Lipid composition of the membrane governs the oligomeric organization of VDAC1

Elodie Lafargue[1#], Jean-Pierre Duneau[2#], Nicolas Buzhinsky[1], Pamela Ornelas[3], Alexandre Ortega[1], Varun Ravishankar[2], James Sturgis[2], Ignacio Casuso[1*], Lucie Bergdoll[2*]

[1]U1325 DyNaMo INSERM, Aix-Marseille Université, Turing Centre for Living System, Marseille, France, [2]Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, CNRS - Aix Marseille Université, 31 Chemin Joseph Aiguier, Marseille, [3]Department of Structural Biology, Max- Planck- Institute of Biophysics, Frankfurt 60438, Germany
* : corresponding authors
#: these authors contributed equally to this work

Mitochondrial physiology is intricately linked to the oligomerization of voltage-dependent anion channels (VDAC), acting as gatekeepers to mitochondria. However, the molecular determinants of VDAC oligomerization remain poorly understood. Here, we used atomic force microscopy to **investigate the effects of three lipids of the Mitochondrial Outer Membrane (MOM) on VDAC** assemblies. We observed that VDAC forms lipid-sensitive clusters, termed honeycombs, and their compaction is regulated by cholesterol. Molecular dynamics simulations revealed VDAC's affinity for cholesterol and phosphatidylethanolamine, both of which affect the formation of these honeycombs. Although we identified honeycomb-like assemblies akin to those in the native MOM, deviations from the physiological lipid composition resulted in varying degrees of disruption of these native-like structures. This emphasizes the profound impact of the lipid environment on VDAC organization. These findings underscore the physiological significance of lipid heterogeneity and changes within biological membranes arising from membrane contacts or pathologies in modulating VDAC behavior.

Introduction

The Voltage-Dependent Anion channel (VDAC) is by far the most abundant protein (>50% molar)[1,2] in the Mitochondrial Outer Membrane (MOM), playing crucial roles in many cellular functions. In addition to facilitating the passage of ions and metabolites like ATP and ADP across the membrane, VDAC is involved in numerous mitochondrial regulatory processes such as apoptosis[3–5], calcium homeostasis[6,7], mtDNA release[8] and lipid scrambling[9]. VDAC act as gatekeepers to the mitochondria, anchoring different cytosolic proteins that interact with the organelle and are suspected to have up to 100 partners[10], including pro-apoptotic proteins Bax and Bak[4,11], tubulin[12,13], synuclein[14,15], TSPO[16] and hexokinase[17].

VDAC's ability to engage in multiple and sometimes opposing signaling pathways (e.g., anti- and pro-apoptotic) requires precise regulation of the interactions of VDAC with its partners. In mammals, VDAC has three isoforms, each partnering with distinct proteins involved in different pathways[4,15]. The oligomeric organization of VDAC in the membrane adds another level of regulation, influencing its functional adaptability in various cellular contexts. *In vitro*, VDAC can adopt diverse oligomeric states, as evidenced by multiple techniques[18–22], which could serve as platforms to recruit specific partners.

VDAC is embedded in the lipid bilayer, with protein-lipid interactions playing a major role in its function[23–25]. Lipid composition can regulate VDAC interactions with several partner proteins[14,26], and cholesterol and neurosteroid-binding sites have been identified on VDAC1[27–29]. VDAC tends to oligomerize in lipid environments[19,21,30], with some lipids favoring oligomerization[19].

Investigating VDAC assembly at the single-molecule level in lipids is challenging, but Atomic Force Microscopy (AFM) is well-suited for assessing protein organization in membranes. VDAC, a 19-strand β-barrel, has a specific AFM signature of a 4.5-nm pore (Fig. 1d). In 2007, two independent AFM studies on MOM derived from yeast[1] and potato tuber[2] described multiple assemblies of VDAC in native membranes, with a predominance of large assemblies. While both studies are pivotal to understanding VDAC behavior in the membrane, additional proteins beyond VDAC are present in the native

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

membrane, and the specific lipid composition of the membrane was not controlled. This is significant because the lipid content can vary under different physiological conditions or diseases (cancer, apoptosis and neurodegeneration)[31–33]. Besides, lipid distribution in biological membranes is heterogeneous and dynamic and can vary rapidly at contact sites (with the mitochondrial inner membrane or the endoplasmic reticulum (ER) membrane). Given the dynamic nature of membrane composition under physiological conditions and in pathological states, elucidating the influence of lipid composition on VDAC organization is of utmost importance.

In this study, we use a combination of AFM and Molecular Dynamics (MD) simulations in a controlled lipid environment to explore the influence of principal MOM lipids, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) (the main species being POPC and POPE), and cholesterol on VDAC1 organization. We revealed that VDAC1 precisely tunes its surrounding lipids, leading to the formation of specific assemblies controlled by membrane lipid composition. This sensitivity of VDAC assembly to lipids enables flexible and rapid reorganization of VDAC in the MOM in response to changing conditions, serving as a regulatory mechanism for interaction of VDAC with its different partners, thus tuning its function.

Results

To allow for the study of VDAC assembly in an environment close to the MOM, while allowing the control of all parameters, we used a system composed of purified VDAC1 reconstituted in controlled lipid environments containing various mixtures of the three main lipids of the MOM: two phospholipids (POPC and POPE) and cholesterol at various ratios. VDAC-containing liposomes were then adsorbed onto a mica surface and imaged by AFM (Fig. 1). Several lipid to protein ratios (LPR) were tested, and LPR 3:1 (w:w, corresponding to a 40:1 molar ratio) was selected as it led to a surface density similar to that observed in native MOM[1,2]. All experiments were performed in triplicate at temperatures above 33°C to avoid lipidic phase separation and membrane partitioning (SFig. 1).

VDAC adopts different organizations in different lipid compositions

Using POPC, POPE, and cholesterol, we explored various lipid ratios and compositions for VDAC1 reconstitution. SFig. 2 is a gallery of images showing drastically different shapes, compaction, and density of VDAC proteins, visible in lighter colors on a homogenous dark-brown lipid background. These observations, reproducible across experiments, highlight the diverse organizational patterns triggered by changes in lipid composition, and hence the crucial role of lipids in regulating VDAC assemblies. In particular, dense assemblies of tightly packed clusters (SFig. 2f, g), in contrast to the more loosely arranged configurations (SFig. 2b,d), highlighting the variability in assembly due to lipid types and their ratios. In subsequent sections, we focus on these structures, their specific configurations under different lipid conditions, and their impact on VDAC assembly.

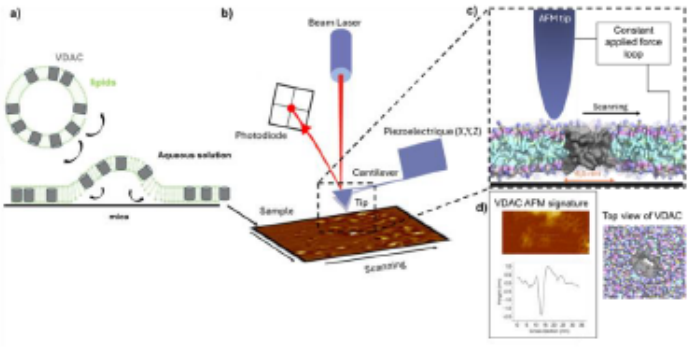


Fig. 1: General schematic of AFM experiment. a VDAC1 reconstituted in vesicles of different lipid compositions was adsorbed on a mica surface. **b** Diagram of AFM principle. The tip, positioned on a lever, scans the sample. A laser beam is used to detect the bending of the lever during the scanning. The laser is reflected by the lever on the photodiode. **c** Zoom from b on the interaction between the tip and the sample surface. The sample-to-tip distance is controlled by the feedback loop to keep the force applied to the sample constant. **d** AFM signature of a VDAC pore and its profile showing a diameter similar to the expected size of 4.5nm

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

VDAC forms protein-lipid clusters : honeycombs

We initially reconstituted VDAC in two primary lipids found in the mitochondrial outer membrane (MOM), POPC and POPE, in ratios closely resembling those of the native MOM (65:35 w:w, Table S1 describes the lipid ratios in the MOM under healthy conditions[34]). We observed the emergence of very stable (over several minutes) and densely packed assemblies composed of VDAC molecules and lipids, which we term "honeycombs," due to their resemblance to the hexagonal structure made by bees (Fig. 2a).

Appearing organized at first glance, a more detailed analysis based on a computerized model derived from the locations of the proteins identified by AFM (Fig. 2b, see methods) reveals intrinsic disorder within these assemblies, arranged in a non-crystalline manner, also termed glass-like organization. The term "glass-like" characterizes both disorganized crowding and amorphous assembly[35]. Our computerized model of the VDAC honeycomb, generated based on the AFM position of the VDAC molecules and MD simulations (see Methods and below), reveals both protein-protein and protein-lipid interactions mediated by lipids. This underscores the critical role of lipids in honeycomb formation. The outermost lipid shell, depicted in yellow in Fig. 2b, represents lipids directly interacting with the protein (approximately 20 per leaflet; SFig. 3). Notably, these honeycombs are very stable as the lipids act as "mortar" keeping the proteins in close proximity to each other, but not always in direct contact. Interestingly, the honeycomb structures (formed within membranes containing only POPC and POPE) closely resembled the organizational patterns observed in a subset of the population within the native MOM of potato tuber[2] and yeast[1] previously visualized by AFM. Additionally, negative staining imaging of outer membrane vesicles derived from *Neurospora crassa* revealed a similar pattern of VDAC organization within the native membrane (Fig. 2c,d). Collectively, these findings point to the physiological relevance of honeycomb organization.

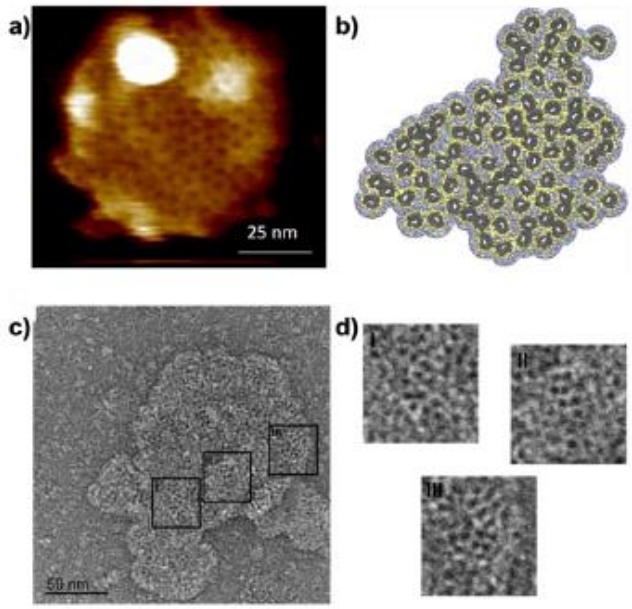


Figure 2: VDAC forms honeycombs. a AFM topography of VDAC1 in the POPC/POPE (65/35 w:w) membranes. All AFM measurements were performed at least in triplicate. **b** Computer model derived from AFM image in **a** (see methods). VDAC is depicted as a dark solid surface, with the first lipid shell in yellow, and the other interstitial lipids in an atom color-coded representation. **c** Electron micrograph of outer membrane vesicles from *Neurospora crassa* mitochondria stained with uranyl formate at 68,000 x magnification, showing VDAC honeycomb-like assemblies. **d** the higher resolution of the three different areas from **c**, shows that individual VDAC pores assemble as honeycombs.

The Honeycombs are parallel organizations of VDAC1

VDAC1 adopts a 2_1 screw axes symmetry in DMPC bilayers[36]; that is, along one crystallographic axis, the protein alternates between the right-side up and upside-down orientations. Such an antiparallel arrangement is frequently observed with membrane proteins and mainly arises from two factors: inherent asymmetry of the protein and charge asymmetry of the membrane bilayer. Hence, forming an anti-parallel organization with alternating orientations improves protein-protein interactions.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

However, such an orientation cannot be physiological; therefore it is crucial to establish the orientation of VDAC in the honeycombs.

We developed a new method named "nanobead-mediated orientation determination," where a gold nanoparticle of 5 nm, functionalized with a Ni-NTA group, is attached to the 6His-tag of VDAC1 facing the intermembrane space (IMS) side of the protein (Fig. 3a). Using this method, we showed that VDAC is associated into parallel organization within the honeycombs (Fig. 3b,c), forming domains of parallel proteins that extend for tens of nanometers. We were able to image both orientations, the IMS-facing and the cytoplasm-facing clusters (SFig. 4). During reconstitution, VDAC forms parallel honeycomb structures within vesicles, exhibiting both possible orientations (cytoplasmic or IMS side), subsequently adhering to mica for AFM imaging and revealing dual orientations. This, coupled with the presence of honeycombs in native MOMs, confirms the physiological relevance of this organization.

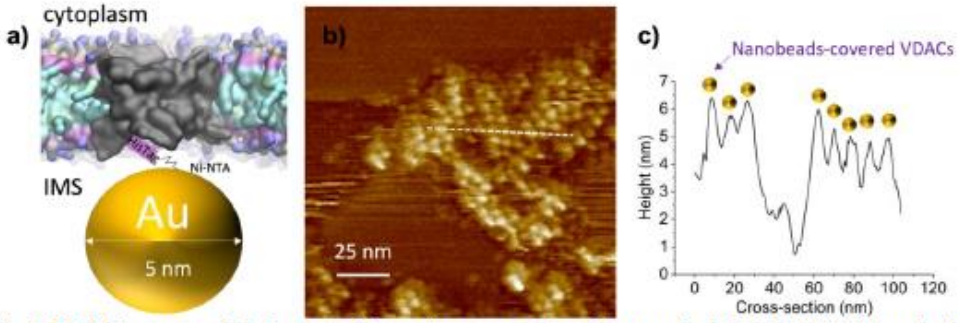


Fig. 3: VDAC forms parallel clusters. **a** Schematic representation of a new methods for orientation determination in AFM using gold nanoparticles coupled with Ni-NTA. The nanoparticles bind to the IMS-facing 6histag of VDAC and change the AFM profile. The distance between the bead and the His-tag is around 1.5 nm. **b** AFM imaging of honeycomb in presence of gold nanoparticles reveals a parallel orientation of the molecules. **c** Height profile from b) reveals peaks of the nanobead-covered VDAC, replacing the previous holes from the VDAC pores. Additional images are available on SFig. 4.

Cholesterol modulates honeycomb assembly

Cholesterol is a major component of MOMs (between 5% and 10% w:w; see Table S1) and is known to interact directly with VDAC at several identified binding sites[34,37]. The risk when working with cholesterol is to observe lipid phase perturbations owing to its capacity to induce liquid ordered (Lo) phases, distinct from the gel phase (Lβ) and the liquid disordered phase. However, these phase appearances are more noticeable in mixtures with saturated lipids or those with different melting temperatures, unlike our study, which used a phospholipid mixture with a uniform acyl chain. NMR studies demonstrate cholesterol's high compatibility with such lipids, requiring substantial amounts (approximately 17% w:w) to significantly alter acyl chain ordering[38]. In our experiments above 33°C, cholesterol remained well mixed with phospholipids without forming phase separations, as tested beforehand in membranes lacking VDAC (SFig. 1).

Although honeycombs can form in POPC/POPE membranes without cholesterol, we investigated the effect of varying cholesterol concentrations (from 2% to 10%) on VDAC organization (Fig. 4). Even at modest cholesterol levels, we observed significant alterations in the assemblies, leading to a wide range of behaviors and oligomeric formations, as depicted in Fig. 4.

Remarkably, the addition of only 2% cholesterol to the POPC/POPE lipid mixture that created honeycombs resulted in a dramatic transformation of the assemblies, as evidenced by AFM micrographs (Fig. 4a-d): most of the molecules were no longer in honeycombs but aligned in strands of a few molecules in width, where the membrane tends to bend. The assembly of the proteins is less compact and more dynamic, making the individual pores of VDAC scarcely visible by AFM, rendering most protein positions in the 2% cholesterol conditions appear loosely defined, despite the high resolution of the micrographs. To better visualize this behavior we changed the parameters for protein identification and used three set of conditions which are either more or less stringent that the software assisted

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

parameters. This resulted in the image depicted in Fig. 4d, where a core of 35 proteins (blue) are robustly associated with all three collections. The two less stringent procedures yielded 63 (yellow) and 82 (magenta) proteins, respectively. The superposition also illustrates the overall good alignment of the core proteins across the three distinct evaluations.

Even more remarkably, when the cholesterol content was increased to 5%, the organization of VDACs progressively returned to honeycomb organization, although with smaller and more linear honeycombs compared to those observed in the POPC/POPE membranes at 65/35 (Fig. 2a). Under these conditions, small protein patches of honeycomb structures resembling those imaged in 2007 on native MOM[2] began to appear. When the cholesterol content increased to 7.5%, the linearity of VDAC assembly decreased, resembling native MOM conditions more closely. VDAC assemblies maintained a honeycomb structure, with more patches observed, similar to those seen at 5% cholesterol and in native MOM conditions. The linearity factor decreased and the compaction and extension increased. This trend is confirmed and more pronounced in PC/PE/10%Chol bilayers (Fig. 4l-o), where extended (up to several μm) and compact honeycomb assemblies alternate with lipid areas. Within the honeycombs, small lipid patches were also observed: VDAC selected its ideal lipid-protein ratio, while leftover lipids accumulated in these patches. Overall, we conclude that although cholesterol is not essential for honeycombs formation, it significantly influences their assembly, particularly impacting their compaction and linearity.

Physiological lipid ratios are essential for a native VDAC organization

To further explore the impact of variable lipid ratios on VDAC organization we tested different lipid compositions. In natural MOM, the lipid ratio PC/PE/Chol is approximately 60/30/10, and as already shown, this produces the honeycomb structure of VDAC observed on natural MOM (Table S1). Thus, the PC/PE/Chol 2% condition, forming small filaments of aligned VDACs, was beyond the physiological range, which is probably why it was not previously observed in the native MOM. Omitting cholesterol resulted in filaments and irregular lipid barriers of VDAC for a 50/50 mixture of POPC/POPE (SFig. 6a) but allowed for honeycomb formation using close to natural ratio 65/35 (Fig. 2a). Omitting POPE even at cholesterol concentrations up to 10% failed to rescue honeycomb formation (SFig. 6b) indicating the necessity of POPE for such structures.

Analysis of VDAC organization reveals molecular interactions

To better understand the lipid-VDAC relationship, we used protein positions from AFM micrographs to construct molecular models (Fig. 2 and 4 and described in Methods), allowing to establish distance relationships between proteins using Radial Distribution Functions (describing pore-pore distance probability, SFig. 7) and explore the lipid environment influencing these distances. We categorized interactions based on radial distribution functions into direct protein-protein interactions, lipid-bridged interactions, and mixed lipid-protein bridged interactions (Fig. 5). This classification clarifies protein-lipid interplay in the membrane, highlighting increased compaction with higher cholesterol levels. SFig. 5 shows the models at higher magnification to better visualize lipid roles. Discrete peaks in the Radial Distribution Functions (SFig. 7) reveal a "rule of 6 Å," representing the average size of successive lipid shells in lipid-bridged protein separations. However, as the distance increased, the distinction between lipid-bridged and protein-bridged VDAC-to-VDAC distance diminished.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

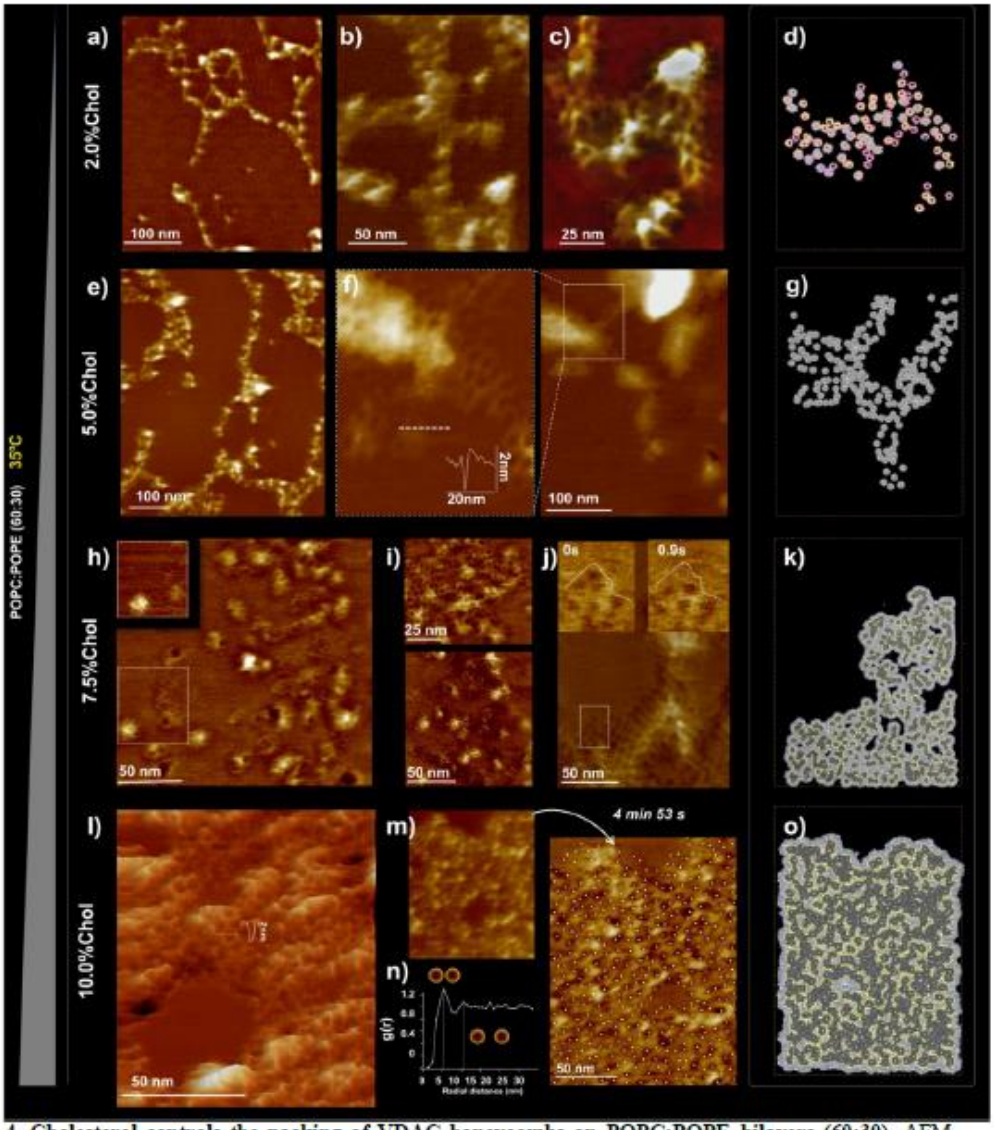


Fig. 4. Cholesterol controls the packing of VDAC honeycombs on POPC:POPE bilayers (60:30). AFM imaging at 33°C. The height of the false-color scale in all images was 11 nm. At 2.0% Chol **a**, **b**, and **c**, the assemblies were linear and curved the membrane. **e** At 5.0% cholesterol, the assembly was also linear, but significant honeycomb aggregations were observed. **f** Rows of VDAC are formed by one or a few pores in the transverse direction. **h** and **i** At 7.5% cholesterol, the honeycombs of VDAC were more prevalent. **j** Very rarely, an isolated pore moves to the border of the assembly, as shown in the inset. **l** At 10.0% cholesterol, the linearity of the VDAC arrangement was lost, and VDAC formed dense homogeneous assemblies with a rough topography. **m** The assemblies were stable as long as they were observed in all cholesterol conditions. **n** The inter-pore distance probability (radial distribution function) obtained from the positions of the pores in a dense assembly localized by cross-correlation showed that the most probable distance between VDACs is of 5.5 nm, and a second smaller peak shows at 10.5 nm. *Right panel*: Model of complexes. The development of a coarse-grained molecular model from the various assemblies **d** from **c**, **g** from zoom in **f**, **k** from **j**, and **o** from **m** allows us to accurately determine the context of protein-lipid interactions that support these distances. In **d**, only VDAC molecules are represented, with blue corresponding to the positions with higher confidence, yellow and magenta, with two lower degrees of confidence, respectively. In **g**, **k**, **o**, VDAC is depicted as a dark solid surface, with the first lipid shell in yellow

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

and the other interstitial lipids in an atom color-coded representation. The higher resolution of these models is shown in SFig. 5.

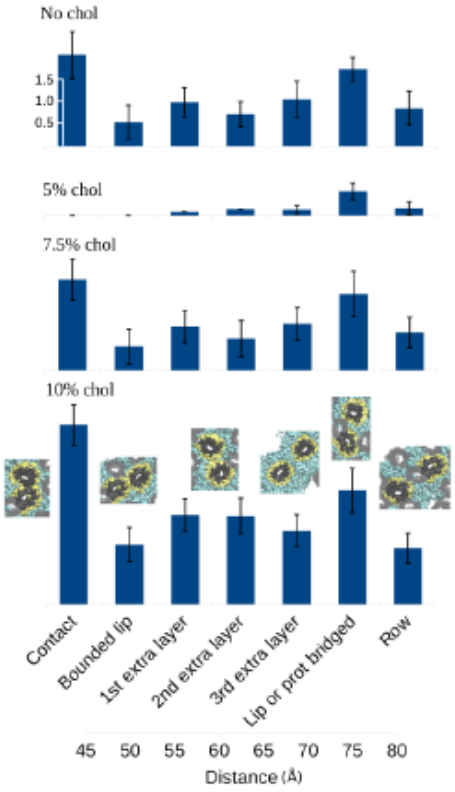


Fig. 5: Cholesterol triggers reassembly of VDAC clusters. The distance between the VDAC particles was obtained from the VDAC positions on the AFM micrographs. The following context was assigned on the basis of the computed assembly models: contact [<46 Å]; bounded lip [46-50 Å]; 1st extra layer [50-56 Å]; 2nd extra layer [56-62 Å]; 3rd extra layer [62-68 Å]; lipid or protein bridged [68-80 Å]; and row [80-86 Å]. The scale bar represents the number of occurrences (in percent) relative to all protein-protein distances observed in the various models. Error bars represent the standard deviation from multiple calculations (see Methods). Model vignettes were extracted from the molecular models corresponding to the given distance measurements. A bound lipid is a situation in which proteins are bridged by lipids assigned in MD, affecting the first lipid shell. The subsequent lipid layers correspond to the lipid shells observed in the MD simulations, illustrated in SFig. 7. At each distance, protein separation may result from a mixture of lipid- and protein-mediated interactions following local protein density.

VDAC has different affinities for MOM lipids

To understand VDAC-lipid interactions, we conducted MD simulations of monomeric VDAC1 in membranes mimicking two levels of MOM complexity: simple membrane 1 (SM1, POPC/POPE at 65/35 (w:w)) and simple membrane 2 (SM2, POPC/POPE/Chol/cardiolipin at 62.5/31.5/5.3/1.1 (w:w)). Despite initially random lipid distributions, convergence occurred across three independent MD simulations for each system on the microsecond timescale. Analysis of lipid positions over the final 10 µs revealed consistent distributions across replicates (SFig. 8). The probabilities of presence of each lipid from the simulations for SM1 (upper row) and SM2 (lower row) were averaged over 3000 frames and shown in Fig. 6.

In SM1 (Fig. 6a-c), POPE is preferentially positioned close to the protein, whereas POPC forms a ring of lipids farther away. The coarse-grained representation of lipids gives rise to a highly anisotropic distribution of both lipid types around VDAC1, despite subtle differences between the PC and PE head groups. This anisotropic distribution of lipids extended radially to the bulk, demonstrating long-range effects (at least 50 Å from the protein surface), as observed for other proteins[39]. Adding cholesterol and trace amounts of cardiolipins to SM1, we created SM2. On the timescale of our study (20 µs), the distribution of cardiolipins was meaningless and suffered from poor convergence owing to its low concentration. In contrast, the behavior of cholesterol showed strong convergence (Fig. 5d-e), challenging the role of POPE in the proximal layer, with less impact on PC densities.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

In both SM1 and SM2, the upper leaflet (cytosolic side) predominantly accommodated sites for interactions between PE and cholesterol, while the inter-membrane space leaflet exhibited a preference for PC lipid concentration (Fig. 5c,f, the side view of lipid distribution is asymmetric between membrane leaflets). Notably, both leaflets contained equal numbers of lipids. We conclude that VDAC can organize the lipids around itself, with a preference for cholesterol, that the POPE lipids are in direct contact with the protein, and that the POPC is in the second layer.

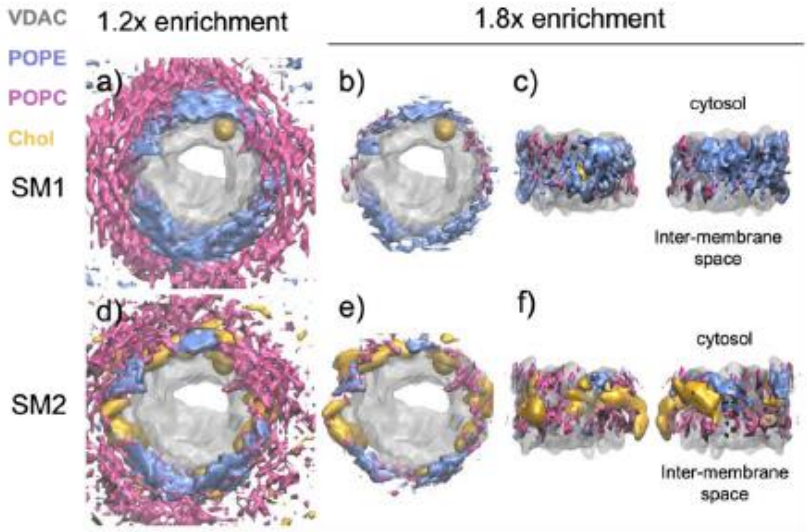


Fig. 6: VDAC organizes lipids. The displayed volumetric maps represent the individual lipid occupancies computed from molecular dynamics simulations of VDAC1. The enrichment of each lipid around VDAC is calculated relatively to the average density of each individual lipid. The upper row (**a, b, c**) show the data for the simple membrane 1 (POPC/POPE 65/35) and the lower row (**d, e, f**) is for the simple membrane 2 (POPC/POPE/Chol/CL 58/31/10/1). The mean occupancies of POPC (blue), POPE (magenta) lipids, and cholesterol (gold) were calculated over the last 10 μs of three 20 μs coarse-grained molecular dynamics simulations, the upper rows show the averaged map corresponding to the three distinct simulations of SM1. The lower row represents a similar extraction for SM2. . The top view is from the cytosol. Brown spheres indicate the position of E73, a charged amino acid, facing the membrane. The cytosolic side accommodates sites for interactions between PE and cholesterol, while the intermembrane space leaflet exhibits preference for PC lipids.

Discussion

Lipid composition and ratios govern VDAC assembly

The native MOM contains more than 30 different lipids with diverse polar heads and acyl chains. We demonstrated that within a narrow range of lipid compositions mimicking MOM with only its three main lipids, VDAC can adopt various oligomeric structures resembling those seen in native membranes[1,2], where both large, compact structures and smaller oligomers have been observed. VDAC organization observed in native MOM can only be replicated under conditions mimicking MOM composition, even with just two lipids. Consequently, we infer that VDAC organization is finely attuned to MOM lipid composition, with minor ratio changes triggering significant reorganization of VDAC assemblies.

Herein, our controlled, simplified two- or three-lipid system (POPC, POPE, and cholesterol) allowed for detailed investigation of the influence of each lipid on VDAC assembly. In membranes containing only POPC and POPE at MOM-like ratios, stable, compact assemblies resembling a "honeycomb" structure form. The addition of as little as 2% cholesterol led to more dispersed structures. We hypothesize that addition of 2% cholesterol disrupts the PE network at the protein contact, without being

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

able to replace it, thus triggering disorganization of the honeycomb cluster. When cholesterol content was increased, more cholesterol molecules bound around the protein and allowed the assembly of VDAC to return to a honeycomb structure, with 7.5% cholesterol content being very close to the situation without cholesterol (Fig. 5). Addition of 10% cholesterol increased even more the compaction of the VDAC structures (SFig. 5). A glass-like (i.e., amorphous and disorganized) organization[33] exists between lipids and proteins in all these assemblies, maintaining stability on the minute timescale of AFM imaging. These observations raise questions about (i) the molecular interactions driving VDAC's adaptable aggregation behavior and the stability of these assemblies, and (ii) how lipids can drive VDAC's reorganization in the membrane and its ability to form various assemblies. Both aspects are addressed in the following paragraphs.

Forces modulating membrane protein assembly

For any membrane protein, the balance between aggregation and dispersion is crucial for dynamic cellular responses, particularly signaling. VDAC experiences a hydrophobic mismatch with the membrane thickness, shown in SFig. 9, where the hydrophobic face of the protein is only 24 Å, significantly smaller than biological membranes. This mismatch acts as a long-range perturbator, generally leading to protein aggregation to minimize perturbation, similar to phase separation. In complex lipid mixtures, hydrophobic mismatches can lead to lipid sorting, particularly on the protein surface. Specific lipid binding and exchange influences protein association, especially if these interactions alleviate mismatch effects[39]. VDAC-cholesterol interactions, demonstrated experimentally[29] and in MD simulation (Fig. 6), explain VDAC's sensitivity to cholesterol concentration. The relatively small hydrophobic length of cholesterol compared with other lipids may buffer the tendency of such a short (2.4 nm) protein to aggregate, creating a physical barrier that opposes protein aggregation.

Both direct protein-protein and lipid-mediated interactions were present, varying significantly across different assemblies (models in Fig. 4 and SFig. 5), highlighting their sensitivity to lipid composition. Multiple cholesterol interaction sites on the VDAC surface make the effects of cholesterol addition on protein oligomerization complex, explaining the diversity observed by AFM. Binding site occupancy by cholesterol or other lipids influences whether aggregation or dispersion occurs, resulting in the observed balance between aggregated and lipid-separated proteins. In the interior of the highly dense honeycomb-like assemblies of VDAC proteins, we found lipid-only domains without proteins (Fig. 4l, m). We hypothesize that proteins select the optimal type and number of lipids to form specific assemblies, with leftover lipids segregating into patches.

Structural rigidity of assemblies

A common feature of all these assemblies is their stability, where lipids act as molecular "mortar" to stabilize VDAC organization in lipid-protein clusters. This lipid-mediated organization is similar to that observed in the *E. coli* outer membrane, where lipopolysaccharides primarily mediate protein-protein interactions[40]. Achieving structural rigidity with purely miscible lipids is challenging, as they do not undergo phase separation at relatively high temperatures (SFig. 1). Rigidity is achieved without cholesterol and at 10% cholesterol, with 80% of lipids within 40 Å of a protein center, in direct proximity to a protein surface. At 7.5% cholesterol, a distance of 48 Å (an additional lipid layer) is required to achieve similar rigidity. In these assemblies, most lipids are influenced by several proteins, collectively stabilizing the structural order of the mixed protein-lipid aggregates.

This scenario changes in the 5% cholesterol system, where lipids are predominantly distant from proteins, and less than 30% of lipids reside within 50 Å of any discernible protein. Lipids bridging successive proteins may be sufficiently immobilized to act akin to mortar.

VDAC preferentially binds POPE and cholesterol

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

MD simulations have elucidated VDAC's favored affinity for POPE and particularly cholesterol for both of which binding sites were identified on VDAC[25,29]. Affinity depends on local lipid concentration; hence, lipid ratios participate in controlling the precise lipid environment surrounding VDAC and can explain the presence of honeycombs at PE:PC (65:35) and not (50:50).

As we did not observe any glass-like structure of stable VDAC-lipid organization using only POPC and cholesterol, we conclude that our simplified three-lipid system POPE is necessary for honeycomb formation and cannot be replaced by cholesterol, even at higher concentrations. Furthermore, cholesterol exerts a significant influence on VDAC packing within the honeycomb structure, fostering larger, more compact clusters at higher concentrations (SFig. 5), whereas lower levels lead to smaller patches with reduced compaction, both assemblies previously identified in native membranes[1,2]. This suggests, as expected, that lipids are not homogeneously distributed in the native MOM, and the diversity of assemblies observed previously by AFM is probably a result of variations in the local lipid environment. We hypothesize that areas of different compactions could participate in the recruitment of certain partner proteins. PE and cholesterol have emerged as pivotal regulators of VDAC clustering.

Physiological relevance of organizations

We identified diverse organizations of VDAC, primarily characterized by a honeycomb pattern, consistent with previous findings on native membranes[1,2] and mitochondrial vesicles from *Neurospora crassa* by negative staining (Fig. 2), indicating the physiological relevance of these structures obtained in simplified membrane environments. The observed heterogeneity and lipid-rich nature of these honeycombs likely contribute to the multitude of oligomeric forms identified after detergent solubilization from native sources[41]. The diverse inter-protomer interaction areas potentially result in the dissociation of honeycomb structures and the preservation of only direct protein-protein interactions.

In MOM, VDAC exhibits a parallel organization attributed to its insertion process, whereas mVDAC1 has been observed to crystallize as antiparallel dimer in DMPC lipids[36,42]. Here, we observed parallel assemblies of mVDAC1 within honeycomb clusters (Fig. 3 and SFig. 4). We propose that the lipid asymmetry represented in our MD simulations between the leaflets (Fig 6) counterbalances protein asymmetry, thereby enabling parallel packing.

However, deviations in the lipid environment from the physiological MOM composition led to the disassembly of native VDAC structures, replaced by smaller, more dynamic, oligomers. This highlights the significant influence of the surrounding lipid composition on the stability and structural integrity of VDAC assemblies.

Lipid variations in the MOM

The sensitivity of VDAC oligomeric organization to lipid composition has significant physiological implications given the diversity in lipid composition across MOMs. Mitochondria are multifaceted, with distinct biological functions and can vary in lipid composition[43]. Furthermore, within individual mitochondria, MOM lipid composition can vary substantially owing to interactions with neighboring membranes, such as mitochondrial inner membrane (MIM)/MOM or ER/MOM contact sites, facilitating lipid transfer. Additionally, changes in MOM lipid composition occur under various physiological conditions; for instance, cancer cells exhibit altered lipid metabolism and membrane composition[31]. Furthermore, the dysregulated accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes influences their physical properties, modulating mitochondrial permeability transition pore dynamics during cell death induction by Bax and death ligands[44,45]. In neurodegenerative conditions such as Alzheimer's disease, a change in mitochondrial lipid profiles is also observed[32], including increased mitochondrial cholesterol levels[33,46,47], which is particularly relevant given VDAC's involvement in Alzheimer pathology[48]. Therefore, our findings suggest that lipid variation could serve as an effective mechanism for regulating VDAC organization, offering flexibility, given the MOM's propensity for rapid changes in lipid composition due to lipid flux and membrane interactions.

The importance of VDAC oligomeric state in the MOM

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

VDAC oligomerization is implicated in crucial physiological processes, notably in apoptosis[49] and diseases such as lupus[8]. During apoptosis, VDAC oligomerization has been observed using in-cell crosslinking, resulting in a proposed model involving the formation of a mega-pore inside a ring of multiple VDAC1 molecules[49]. We could not observe this VDAC mega-pore under any of our experimental conditions. Moreover, this model contradicts thermodynamic principles because of VDAC's hydrophobic exterior, which makes it challenging to form a hydrophilic pore. We suggest that the observed VDAC clustering in our study, particularly favored by increased cholesterol, may represent VDAC oligomerization. VDAC recruits pore-forming proteins Bax and Bak, which are responsible for MOM permeability[50,51]. Therefore, such clustering could serve as a platform for the recruitment of these partners and subsequent pore formation in the MOM. Supporting this hypothesis, some models suggest that Bax and Bak bind to multimeric VDAC complexes[52].

Mitochondrion-associated membranes (MAMs), where the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria interact, are the central hubs for lipid and calcium transport. Lipid exchange at MAMs involves the shuttling of ER-synthesized lipids, including cholesterol, into the outer leaflet of the MOM. These lipids are then transported to the inner leaflet and subsequently to MIM. Recent findings by Jahn et al. demonstrated that VDAC acts as a lipid scramblase at the MOM but is only active in a multimeric form[9]. Based on our observations, the higher cholesterol content in MAMs[53] likely favors the formation of VDAC clusters, which could provide more efficient lipid scrambling. Furthermore, substantial calcium flux between the ER and mitochondria occurs in MAMs, mediated by the inositol trisphosphate receptor (IP3R) in the ER membrane and VDAC in the MOM[54,55]. IP3R forms large mega-Dalton tetrameric complexes, in direct contact with VDAC, as shown by co-immunoprecipitation[56]. IP3R releases large amounts of calcium into the intermembrane space, which is channeled through VDAC into the MOM via passive diffusion. To provide efficient calcium transfer, a large number of VDAC molecules are necessary (Fig. 6d illustrates the difference in size between both proteins). We propose that VDAC clustering, favored by increased cholesterol content in MAMs, facilitates efficient calcium import into the mitochondria.

Another example of VDAC clusters in the MOM is VDAC organization in sperm mitochondria. Leung et al. used cryo-electron tomography to show that an array of VDAC is used as a platform to recruit glycerol kinase, serving to tether neighboring mitochondria together[57].

VDAC was initially discovered as an ion channel, although its role has expanded with implication in various pathways. There is debate surrounding whether VDAC oligomerization affects gating and conductance. Our findings demonstrate that 10% cholesterol triggers honeycomb formation, resulting in a locally high concentration of VDACs. However, even at higher cholesterol concentrations (25%), VDAC maintains consistent conductance and gating properties[24]. We propose that a higher local flow of ions and metabolites may be achieved by increasing the density of VDAC in the membrane through honeycomb formation without altering the single-channel characteristics.

VDAC can exist in different oligomeric forms in the MOM[1,2], fulfilling different physiological functions (Fig. 7): from single-channels that conduct ions and metabolites and can recruit partner proteins such as tubulin or α-synuclein[12,14], to small oligomers like dimers that scramble lipids, and large clusters serving as a platform for protein tethering at the MOM (Fig. 7c) or efficient calcium flow (Fig. 7d). These different assemblies can be regulated by the local lipid content in the membrane, allowing the formation of different VDAC assemblies in different areas of the MOM.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

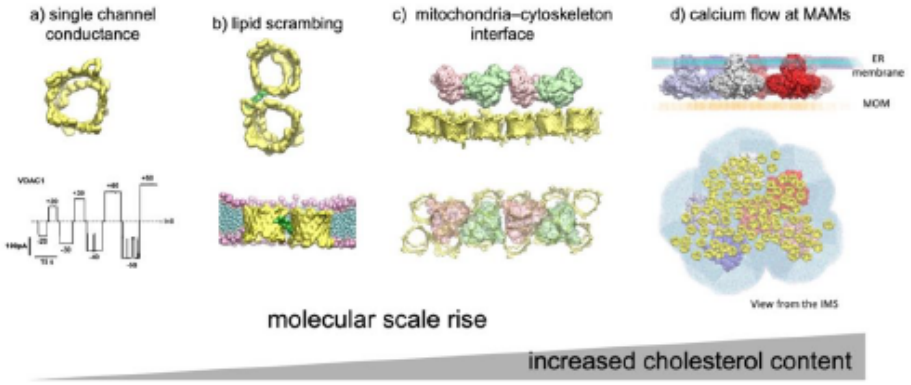


Fig 7: Lipid-induced clustering of VDAC can be associated with different biological events. a Single channel can conduct ions and metabolites. **b** Jahn et al.[9] identified a specific VDAC dimer interface involving strands β1,2 and 18-19 on the second protomer involved in lipid scrambling. In the honeycombs, we identified many protein-protein contacts that could serve to scramble lipids. **c** Arrays of VDAC serve as docking platform for glycerol kinase in sperm mitochondria (PDB ID: 7NIE).[57] **d** Model of the IP3R-VDAC complex implicated in calcium flow. Bartok et al.[56] demonstrated the presence of clusters of IP3R at ER-mitochondria contact sites, forming direct contacts with VDAC. As VDAC is thinner than the membrane, only proteins are depicted in the MOM.

Conclusion:

VDAC oligomerization and complex interaction networks are of great interest. They have implications in many major physiological processes, yet direct visualization of their organization in membranes at the molecular level remains challenging. AFM is the technique of choice for investigating membrane interactions. Expanding upon previous AFM imaging studies[1,2], our findings demonstrate that VDAC1 assembly in the membrane is profoundly influenced by lipid content, providing a mechanism for the flexible and rapid reorganization of VDAC in the MOM in response to changing conditions. Hence, VDAC can exist in various oligomeric assemblies ranging from more compact to less compact structures, which are finely tuned by the local lipid composition of the membrane. This likely serves as a regulatory mechanism for VDAC, potentially favoring local ion flows in the membrane or serving as platforms for the recruitment of specific partners to either monomeric or multimeric VDAC forms.

Methods

VDAC production and purification

The mouse VDAC1 gene bearing a 6-his tag in N-terminus inserted into the pQE9 vector was transformed into M15 *E. coli* cells for protein expression. Cells were grown at 37°C in LB medium to A_{600}= 0.8 and induced with 0,4 mM IPTG for 4 h. Cells were harvested and resuspended in 50mMTris HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 20% sucrose, 0,6% Triton X-100, 0,1 mg/ml lysozyme. The resuspended pellet was sonicated and centrifuged (12,000xg, 15 min) to obtain inclusion bodies. The inclusion body pellet was washed with wash buffer [20 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 2 mM CaCl2], repelleted and solubilized in equilibration buffer [20 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 8 M urea]. VDAC1 was purified from solubilized inclusion bodies by Ni-NTA metal affinity column, equilibrated in equilibration buffer, washed with equilibration buffer containing 30 mM imidazole and eluted with equilibration buffer containing 150 mM imidazole. The urea-solubilized protein was concentrated to 250-300uM in an Amicon-10. 1ml of urea-solubilized protein was then rapidly diluted in 9ml of chilled 20mM tris buffer pH 8.0, 150mM NaCl, 1.5% LDAO, 5mM DTT and kept for 5-6 hours at 4°C on rotation. The 10ml protein solution was then transferred to a 7-kDa dialysis bag and dialyzed against 1L of chilled 20mM tris buffer pH 8.0, 150mM NaCl, 2mM DTT overnight at 4°C. The next day, refolded protein was collected and ultracentrifuged at 355,000g for 45 minutes to remove

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

aggregates. Protein was concentrated in an Amicon-50 and injected on a Superdex 200 increase 10/300 GL column equilibrated with 20mM tris buffer pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% LDAO, 2mM DTT. The monomeric VDAC peak was collected and concentrated to 2mg/ml. Stocks were flash frozen in liquid nitrogen and stored in 20% glycerol at -80°C. Samples were ultracentrifuged after thawing before reconstitution into liposomes to remove any possible aggregates.

Reconstitution into liposomes

POPE, POPC and cholesterol lipids were purchased from Avanti polar lipids in chloroform, mixed at the desired ratios and dried under nitrogen gas. The resulting lipid film was resuspended by vortexing in 150mM KCl, 20 mM Tris pH8 to a final concentration of 12,5 mg/ml of lipids. The suspension was heated at 37°C for 10 min then sonicated for 1 min or until formation of small unilamellar vesicles (100nm), as measured by dynamic light scattering (DLS). Detergent β-OG was added to a 0.65 detergent/lipid ratio (w:w). Proteins were added to the destabilized liposomes to a 3:1 lipid:VDAC ratio (w:w). Detergent removal was achieved by addition of Bio-beads at a Bio-bead/detergent ratio of 30 (w:w) overnight. The liposomes were analyzed by DLS after reconstitution.

AFM and HS-AFM data acquisition

To form a homogeneous protein containing supported lipid bilayer (SLB), a mixture of 15 µl of the proteoliposome suspension (1 mg/ml) and 85 µl of "Incubation buffer" (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 15 mM CaCl2) was incubated 1h at room temperature on a freshly cleaved mica under a humid hood. The sample was rinsed 10 times in ultrapure water (MilliQ) and imaged by AFM/HS-AFM in "Imaging buffer" (10 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl2) at 35 °C to check the homogeneity of the formed membrane. All conditions have been performed in triplicates.
Conventional AFM imaging was performed in contact mode with a Nanoscope IIIe Multimode AFM (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) using OTR4 probes of k=0.1 N/m. The scan rate, gains and deflection setpoint were adjusted during acquisition to optimise the quality of acquired images.
HS-AFM movies were acquired in amplitude modulation mode optimised high–resolution imaging parameters with a modified HS-AFM (SS-NEX, RIBM, Tsukuba, Japan)[58]. The apparatus is equipped with our custom-made digital high-speed lock-in amplifier coded on a reconfigurable FPGA using LabView (National Instruments, Austin, USA). Short cantilevers (length ~7 µm) designed for HS–AFM, presenting an electron beam deposition (EBD) tip, were used (USC-F1.2-k0.15 Nanoword, Switzerland). They are characterised by a nominal spring constant k = 0.15 N/m, a resonance frequency in liquid of fres = 500 kHz and a quality factor Qc ~ 2 (in liquid). HS-AFM sensitivity to probe the deflection was 0.1 V/nm. The imaging amplitude setpoint was set to ~90% of the free amplitude (~10 Å). All experiments were performed at 35°C, by introducing the HS-AFM microscope inside a temperature-controlled box.

Image analysis

Acquired images were plane-fit and flattened using the AFM processing and analysis software provided by the instrument manufacturer. HS AFM image treatment was limited to the correction of XY drift and a first order X-line fit. Image analysis was performed using the general distribution of ImageJ[59] and of WSxM[60].
To study the particle distribution, the computation of the radial distribution function was implemented. This measure is obtained by computing the particle density in a ring of radius *r* and thickness *dr* for each particles and then averaging. To exclude, or not, the heterogeneity effect due to the border, particularly in small patches, a code has been developed (Python, scipy and shapely packages). It computes the enclosing region by determining the concave surface which include all the particles. Next, to correct the radial distribution, the density computation uses the intersection surface between the ring and the enclosing surface. The radial distribution function (RDF) was also used as the primary data to compute the normalized distribution of protein-protein distances shown in Fig. 5; where the error bars represent

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

the standard deviation from multiple calculations of the distribution (100, except for 89 in the smallest cluster). Each individual calculation was built using all proteins within a 200 Å radius around each randomly selected protein, and making the distance statistic from 0 to 100 Å. Averages and standard deviations across the multiple calculations were used to construct the histograms.

Coarse grain setup and molecular dynamics simulations

The coarse grain structure of hVDAC1 was based on that of mouse VDAC1 (PDB ID: 3EMN)[42] that contain only 4 conservative mutations over 254 residues. First the homology modeling was set up using MODELLER[61]. Then the protein was embedded in membranes using the CG membrane builder[62] tool from CHARM-GUI[63] using the MARTINI 2.2 force field[64] with elastic networks[65]. Two distinct membrane were build based on the main lipids of the MOM membrane[34] (Table S1). The first one (SM1) is made only of POPC and POPE (65:35 mol:mol, 64:36 w:w) and the second one (SM2) contain 10 % molar cholesterol. The final systems comprise 1100 lipids, that were randomly distributed in periodic rectangular boxes, that also contains 13000 CG water particles and 100 mM NaCl. Three distinct systems were built for each membranes. The various systems, were heated (to 323 K), equilibrated and run over 20 µs using the default protocol and parameters provided by Charmm-GUI. The simulation were run on the supercomputer facilities provided by the GENCI at the CINES - Montpellier – France- or at the TGCC (CEA) – Saclay France using Gromacs v2018[66].

Building of model assemblies

The coordinates extracted from the AFM micrographs, were used to position proteins and lipids extracted from MD configurations of the monomeric systems. Distinct configurations were randomly chosen from the last 10 µs of the various MD simulations. The proteins were extracted with a cylindrical extrusion of lipids with a radius of 50 Å about the protein center. Since the experimental orientation of the individual proteins is unknown, we randomly rotated the proteins and their associated lipids around the channel axis, which is perpendicular to the membrane plane. An optimization procedure was developed to select orientations that minimize clashes between proteins. In this python program, overlapping lipids from the added configurations were sequentially removed from the model. The resulting stereochemical models were used to evaluate lipid-protein and inter-protein contacts in order to gain insights into the assemblies at the molecular level.

Screening of outer membrane vesicles by negative staining microscopy

Outer membrane vesicles (OMVs) isolated from *Neurospora crassa* mitochondria were kindly provided by Prof. Stephan Nussberger (see [67]). Frozen OMVs were thawed and applied onto copper grids (400 mesh) backed with a continuous carbon layer, and subsequently stained with uranyl formate. Data was collected using a Tecnai Spirit Biotwin electron microscope at 120 kV (FEI), fitted with a CCD camera (Gatan). Micrographs were acquired with 2 s exposure at 49,000x, 68,000x and 76,000x nominal magnification.

Acknowledgements

This work was supported by the Aix-Marseille Université grant AMX-21-PEP-022 (L.B.), PhD fellowships from Aix-Marseille Université (E.L. and V.R.) and French grants ANR-21-CE42-0031 and ANR-19-CE11-0024 (I.C.). This work was performed using HPC resources from GENCI–IDRIS (Grant 2020-A0080707044, and 2021-A0110707044). Mitochondria and ER in Fig. 6 are from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servieris licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. Unported License (https://creativecommons.org/licenses/by/3. 0/)

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Author contributions
Conception: LB, JPD, IC. Sample preparation: LB, VR ; AFM imaging: EL, NB ; Computational and molecular modeling: JPD ; Data analysis: JPD, EL, AO, JS, IC, NB, LB ; Negative stain : PO. LB and JPD wrote the manuscript. All the authors reviewed it.

Competing interests
We declare no competing interests.

References:

1. Gonçalves, R. P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J. N. & Scheuring, S. Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes. *J. Mol. Biol.* **369**, 413–418 (2007).
2. Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A. & Fotiadis, D. The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *J. Mol. Biol.* **370**, 246–255 (2007).
3. Chin, H. S. *et al.* VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat. Commun.* **9**, 4976 (2018).
4. Roy, S. S., Ehrlich, A. M., Craigen, W. J. & Hajnóczky, G. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep.* **10**, 1341–1347 (2009).
5. van Delft, M. F. *et al.* A small molecule interacts with VDAC2 to block mouse BAK-driven apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 1057–1066 (2019).
6. Sander, P., Gudermann, T. & Schredelseker, J. A Calcium Guard in the Outer Membrane: Is VDAC a Regulated Gatekeeper of Mitochondrial Calcium Uptake? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 946 (2021).
7. Shankar, T. S. *et al.* Cardiac-specific deletion of voltage dependent anion channel 2 leads to dilated cardiomyopathy by altering calcium homeostasis. *Nat. Commun.* **12**, 4583 (2021).
8. Kim, J. *et al.* VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease. *Science* **366**, 1531–1536 (2019).
9. Jahn, H. *et al.* Phospholipids are imported into mitochondria by VDAC, a dimeric beta barrel scramblase. *Nat. Commun.* **14**, 8115 (2023).
10. Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E. N. & Krelin, Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress* **1**, 11–36 (2017).
11. Yuan, Z. *et al.* Key residues in the VDAC2-BAK complex can be targeted to modulate apoptosis. *PLOS Biol.* **22**, e3002617 (2024).
12. Rostovtseva, T. K. *et al.* Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18746–18751 (2008).
13. Rovini, A. Tubulin-VDAC Interaction: Molecular Basis for Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front. Physiol.* **10**, 671 (2019).
14. Jacobs, D. *et al.* Probing Membrane Association of α-Synuclein Domains with VDAC Nanopore Reveals Unexpected Binding Pattern. *Sci. Rep.* **9**, 4580 (2019).
15. Queralt-Martín, M. *et al.* A lower affinity to cytosolic proteins reveals VDAC3 isoform-specific role in mitochondrial biology. *J. Gen. Physiol.* **152**, (2020).
16. Shoshan-Barmatz, V., Pittala, S. & Mizrachi, D. VDAC1 and the TSPO: Expression,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

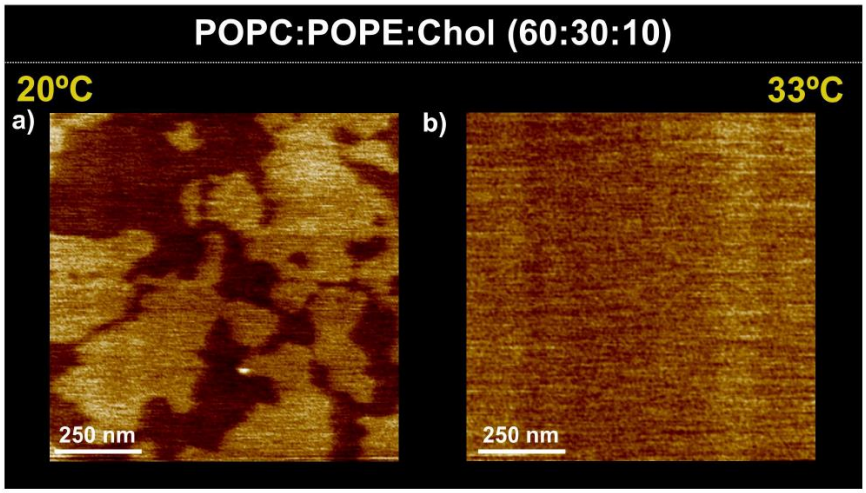
Interactions, and Associated Functions in Health and Disease States. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3348 (2019).
17. Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 171–182 (2008).
18. Dolder, M. *et al.* Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J. Struct. Biol.* **127**, 64–71 (1999).
19. Betaneli, V., Petrov, E. P. & Schwille, P. The role of lipids in VDAC oligomerization. *Biophys. J.* **102**, 523–531 (2012).
20. Bayrhuber, M. *et al.* Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15370–15375 (2008).
21. Bergdoll, L. A. *et al.* Protonation state of glutamate 73 regulates the formation of a specific dimeric association of mVDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E172–E179 (2018).
22. Schredelseker, J. *et al.* High resolution structure and double electron-electron resonance of the zebrafish voltage-dependent anion channel 2 reveal an oligomeric population. *J. Biol. Chem.* **289**, 12566–12577 (2014).
23. Rostovtseva, T. K., Kazemi, N., Weinrich, M. & Bezrukov, S. M. Voltage gating of VDAC is regulated by nonlamellar lipids of mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* **281**, 37496–37506 (2006).
24. Queralt-Martín, M. *et al.* Assessing the role of residue E73 and lipid headgroup charge in VDAC1 voltage gating. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1860**, 22–29 (2019).
25. Mlayeh, L., Krammer, E.-M., Léonetti, M., Prévost, M. & Homblé, F. The mitochondrial VDAC of bean seeds recruits phosphatidylethanolamine lipids for its proper functioning. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1858**, 786–794 (2017).
26. Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Chen, M.-Y. & Bezrukov, S. M. Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* **287**, 29589–29598 (2012).
27. Budelier, M. M. *et al.* Photoaffinity labeling with cholesterol analogues precisely maps a cholesterol-binding site in voltage-dependent anion channel-1. *J. Biol. Chem.* **292**, 9294–9304 (2017).
28. Budelier, M. M. *et al.* Click Chemistry Reagent for Identification of Sites of Covalent Ligand Incorporation in Integral Membrane Proteins. *Anal. Chem.* **89**, 2636–2644 (2017).
29. Cheng, W. W. L. *et al.* Multiple neurosteroid and cholesterol binding sites in voltage-dependent anion channel-1 determined by photo-affinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**, 1269–1279 (2019).
30. Hosaka, T. *et al.* Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **26**, 1749–1758 (2017).
31. Poulaki, A. & Giannouli, S. Mitochondrial Lipids: From Membrane Organization to Apoptotic Facilitation. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3738 (2022).
32. Kurokin, I. *et al.* Targeted Lipidomics of Mitochondria in a Cellular Alzheimer's Disease Model. *Biomedicines* **9**, 1062 (2021).
33. Fernández, A., Llacuna, L., Fernández-Checa, J. C. & Colell, A. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 6394–6405 (2009).
34. Horvath, S. E. & Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* **52**, 590–614 (2013).
35. Munguira, I. *et al.* Glasslike Membrane Protein Diffusion in a Crowded Membrane. *ACS Nano* **10**, 2584–2590 (2016).
36. Ujwal, R., Cascio, D., Chaptal, V., Ping, P. & Abramson, J. Crystal packing analysis

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

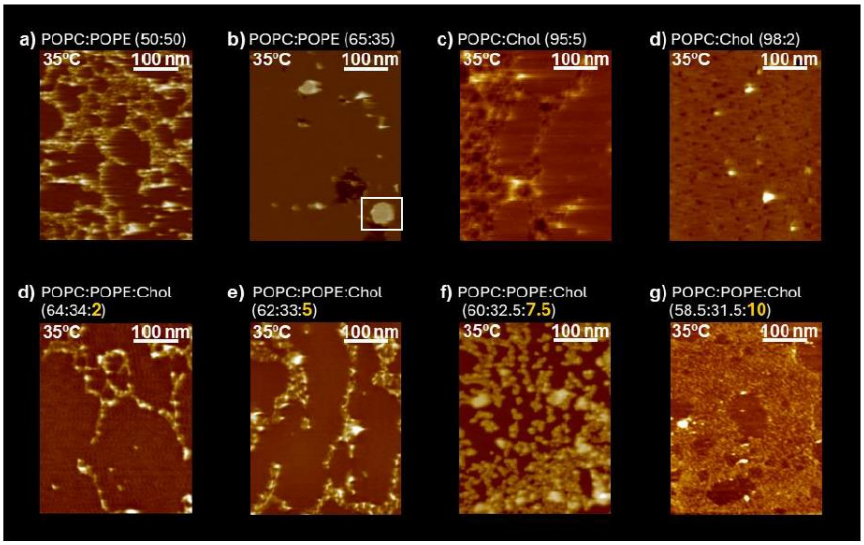
of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation. *Channels Austin Tex* **3**, 167–170 (2009).
37. Ardail, D. *et al.* Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* **265**, 18797–18802 (1990).
38. Ferreira, T. M. *et al.* Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state 1H–13C NMR and MD simulation studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 1976–1989 (2013).
39. Duneau, J.-P., Khao, J. & Sturgis, J. N. Lipid perturbation by membrane proteins and the lipophobic effect. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1859**, 126–134 (2017).
40. Webby, M. N. *et al.* Lipids mediate supramolecular outer membrane protein assembly in bacteria. *Sci. Adv.* **8**, eadc9566 (2022).
41. Zalk, R., Israelson, A., Garty, E. S., Azoulay-Zohar, H. & Shoshan-Barmatz, V. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* **386**, 73–83 (2005).
42. Ujwal, R. *et al.* The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 A resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17742–17747 (2008).
43. Monzel, A. S., Enríquez, J. A. & Picard, M. Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nat. Metab.* **5**, 546–562 (2023).
44. Montero, J. *et al.* Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1797**, 1217–1224 (2010).
45. Montero, J. *et al.* Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **68**, 5246–5256 (2008).
46. Colell, A., Fernández, A. & Fernández-Checa, J. C. Mitochondria, cholesterol and amyloid beta peptide: a dangerous trio in Alzheimer disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**, 417–423 (2009).
47. Barbero-Camps, E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid β neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *Am. J. Pathol.* **184**, 2066–2081 (2014).
48. Magri, A. & Messina, A. Interactions of VDAC with Proteins Involved in Neurodegenerative Aggregation: An Opportunity for Advancement on Therapeutic Molecules. *Curr. Med. Chem.* **24**, 4470–4487 (2017).
49. Keinan, N., Tyomkin, D. & Shoshan-Barmatz, V. Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5698–5709 (2010).
50. Ma, S. B. *et al.* Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ.* **21**, 1925–1935 (2014).
51. Lauterwasser, J. *et al.* The porin VDAC2 is the mitochondrial platform for Bax retrotranslocation. *Sci. Rep.* **6**, 32994 (2016).
52. Dadsena, S., Hassan, D. G. & Holthuis, J. C. M. Unraveling the molecular principles by which ceramides commit cells to death. *Cell Stress* **3**, 280–283 (2019).
53. Fujimoto, M., Hayashi, T. & Su, T.-P. The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 635–639 (2012).
54. De Stefani, D. & Rizzuto, R. Molecular control of mitochondrial calcium uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**, 373–376 (2014).
55. De Stefani, D. *et al.* VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca2+ signals to mitochondria. *Cell Death Differ.* **19**, 267–273 (2012).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.06.26.597124; this version posted June 26, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

56. Bartok, A. *et al.* IP3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer. *Nat. Commun.* **10**, 3726 (2019).
57. Leung, M. R. *et al.* In-cell structures of conserved supramolecular protein arrays at the mitochondria–cytoskeleton interface in mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2110996118 (2021).
58. Ando, T. *et al.* A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12468–12472 (2001).
59. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
60. Horcas, I. *et al.* WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 013705 (2007).
61. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **54**, 5.6.1-5.6.37 (2016).
62. Wu, E. L. *et al.* CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *J. Comput. Chem.* **35**, 1997–2004 (2014).
63. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–1865 (2008).
64. de Jong, D. H. *et al.* Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 687–697 (2013).
65. Periole, X., Cavalli, M., Marrink, S.-J. & Ceruso, M. A. Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 2531–2543 (2009).
66. Abraham, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1**, 19–25 (2015).
67. Ornelas, P. *et al.* Two conformations of the Tom20 preprotein receptor in the TOM holo complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, e2301447120 (2023).



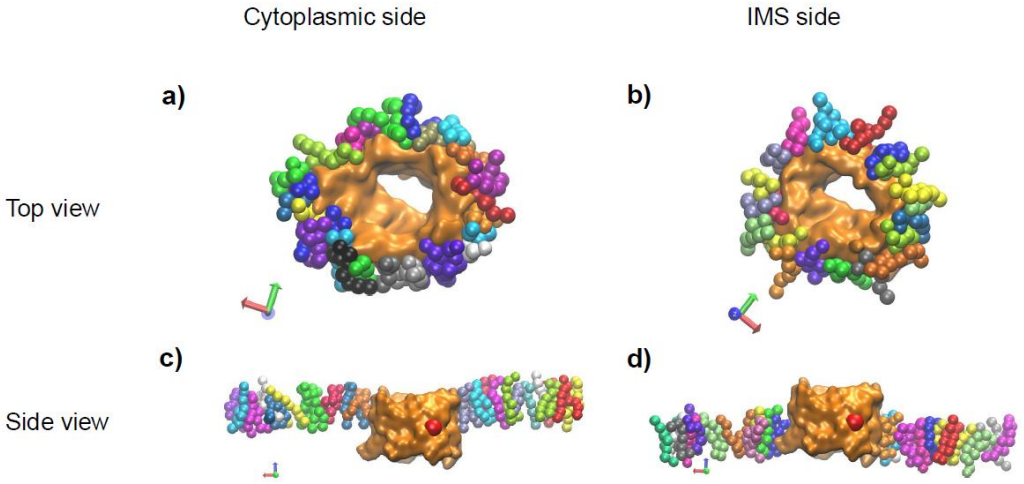
SFig 1: Cholesterol induces a phase separation at low temperature. AFM topograph of pure lipid membranes of POPC:POPE:Chol (60:30:10 w:w ratios) at a) 20°C shows a phase separation, and b) at 33°C without phase separation. Similar controls were performed for all conditions, all showing a single phase at 33°C.



SFig. 2: VDAC can adopt different assemblies in different lipid compositions. Gallery of AFM topographs of mVDAC1 in membranes of different lipid composition (w:w ratios). Height false color scale in all images is 11 nm. Each condition is described at higher magnification in following figures. Fig. 2a) is a zoom in the white square in b); a) and c) are described in Fig S6; d-g) are described in Fig. 4.

Lipide	% weight
PA	1
PC	54
PE	29
PS	2
PI	13
SM	0.5
Chol	9
CDL2	0.5

Table S1: Polar head lipid composition of the mitochondrial outer membrane in weight ratios, based on Daum & Vance 2013. Note that this is a composition from rat liver mitochondria outer membrane. Variation in lipid content of MOM can vary from the tissue, physiological state of the cell or mitochondria function.



Sfig. 3: Lipid accommodation on the surfaces of VDAC1. top (a-b) and side (c-d) views. Approximately twenty lipids are in contact with the protein in the first lipidation shell, either on the cytoplasmic side (a) or periplasmic side (b). Additionally, there are approximately 10 to 13 concentric layers that form the lipid shells around the protein. The color scheme highlights individual lipids. The red sphere on the surface of hVDAC1 represents the Glu 73 side chain, a charged aminoacid facing the membrane.

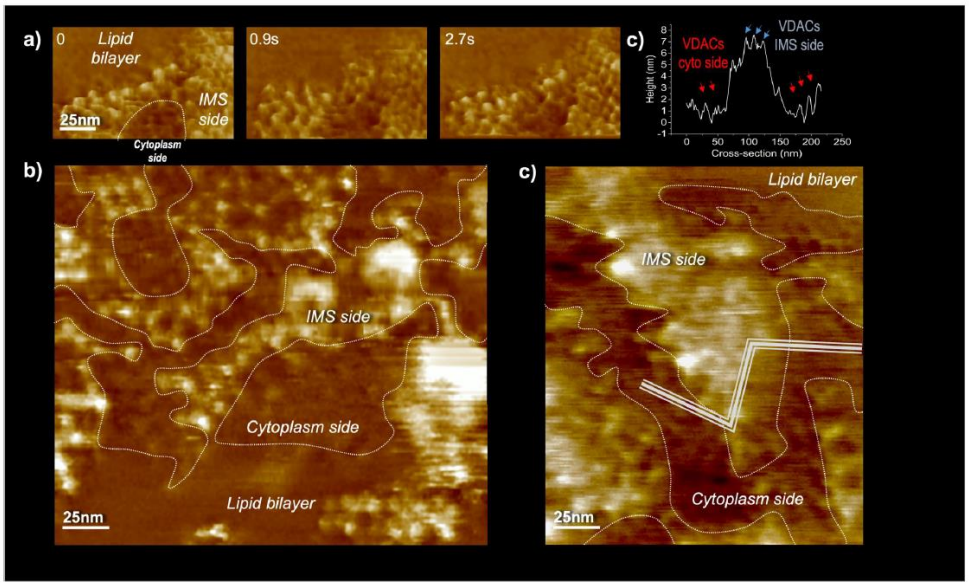
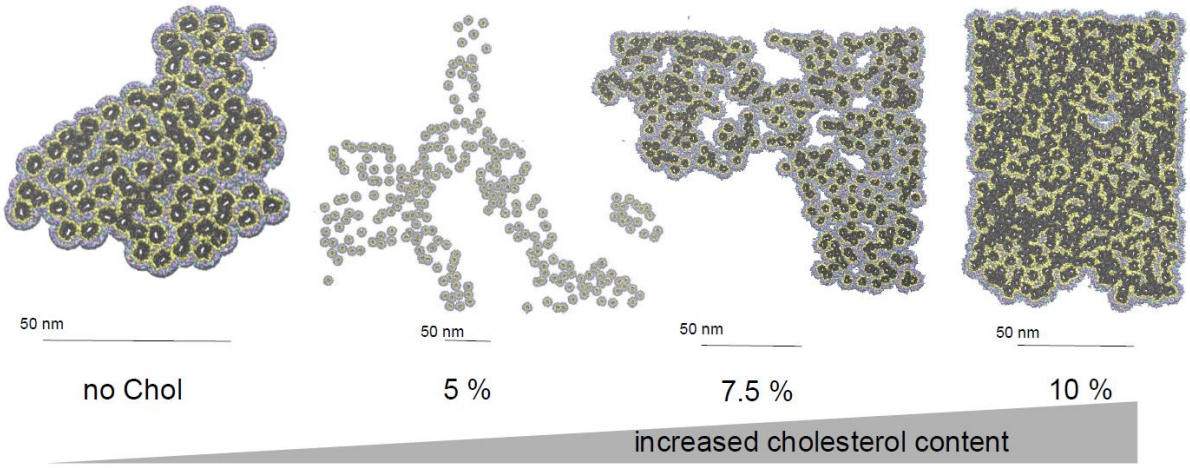
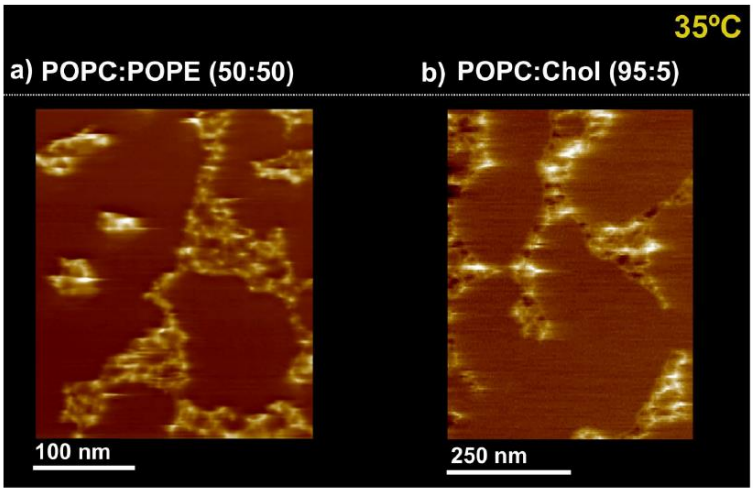


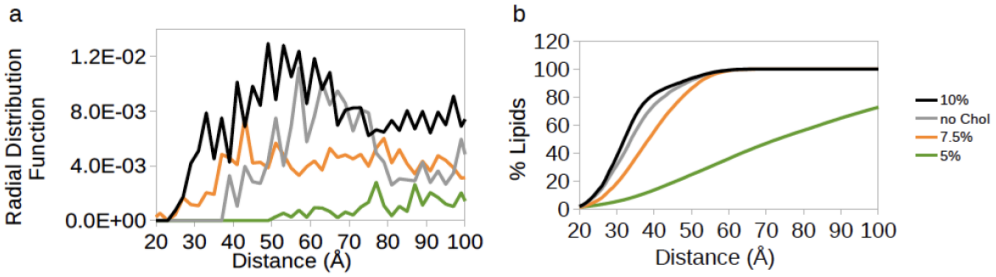
Fig S4 : AFM topograph show parallel clusters of VDAC in both orientations. Gold nanoparticles were added to VDAC1 reconstituted in POPC/POPE/Chol (60:32.5:7.5 w:w ratios) and imaged by AFM. a) stability of the gold nanoparticle on VDAC. b) Larger view of both orientations. c) Height profile of a cross-section showing both orientations of VDAC.



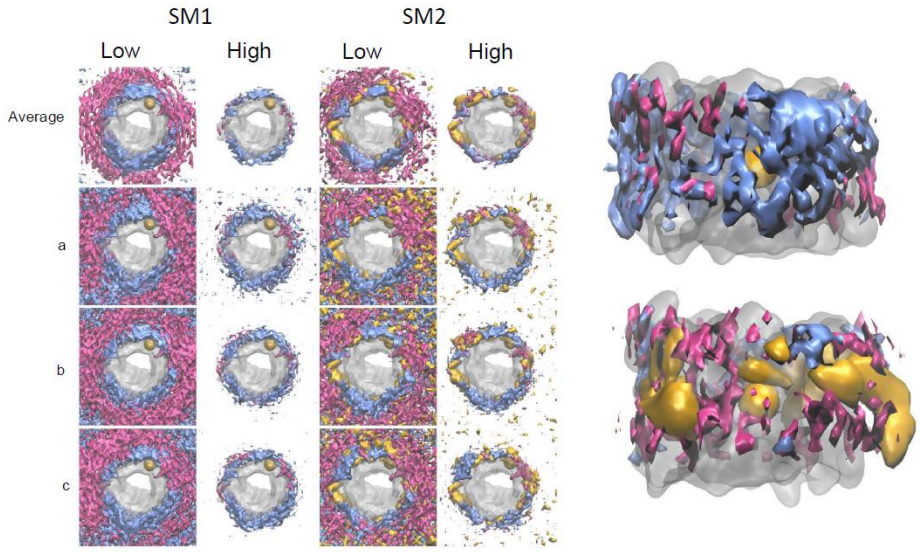
SFig 5: Cholesterol controls the compaction of VDAC clusters. Higher magnifications of moleculare models from Fig. 2 and 4. VDACs are in dark grey, bound lipids in yellow and the other interstitial lipids in an atom color-coded representation



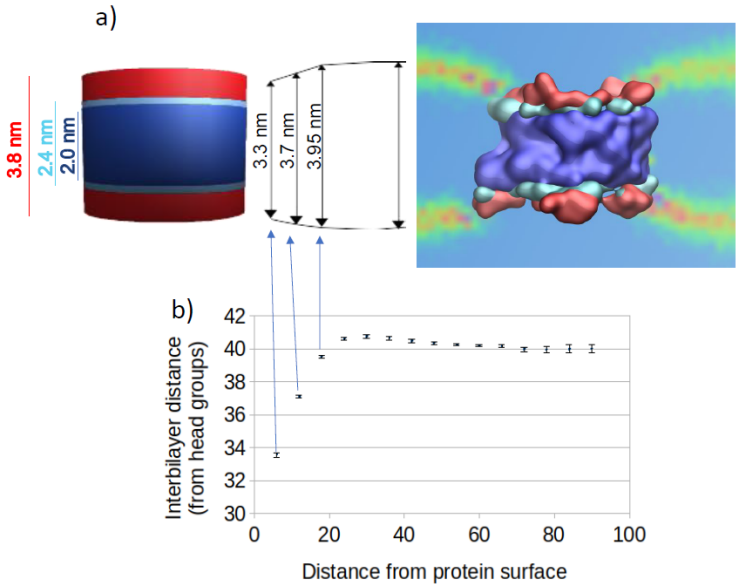
SFig 6: Lipid ratios outside of the physiological range fail to form glass-like assemblies. AFM topograph of VDAC in membranes composed of **a)** POPC:POPE (50:50 w:w ratios), or b) POPC:cholesterol (95:5 w:w) show more dynamic structures, different from the honeycomb-like glass-phase clusters observed in Fig. 2 and 4. Height false color scale: 11nm



Sfig. 7: Protein-Protein and Lipid-Protein proximities in the model assemblies. a VDAC-VDAC 2D radial distribution computed from the manually picked AFM positions within the range of 0 to 100 A. **b** Lipid-Protein proximities calculated as the fraction of lipids present at increasing distances around the proteins.



Sfig. 8: Volumetric maps of lipid occupancies in molecular dynamics simulations of VDAC1. Left panel : **t**he mean occupancy of POPC (magenta) , POPE (blue) and cholesterol (gold) was calculated over the last 10 µs of 20 µs coarse-grained MD simulations. Three systems (a, b, c) were independently built using the same composition but different distributions of randomly positioned lipids. The upper row shows the averaged map corresponding to the distinct maps shown in the following rows. Low and high densities represent an excess density of 20 and 80%, respectively, relative to the average density.



Sfig. 9: VDAC-to-bilayer adaptation during the last 10 µs MD simulation in Simple membrane 2 system. **a** The hydrophobic core, an intermediate area, and the hydrophilic extension of VDAC1 are represented using deep blue, cyan, and red, respectively. Thicknesses were evaluated from particle distributions projected on the membrane normal axis using hydrophobic and hydrophilic residues of the protein. The intermediate region corresponds to the area that separates the half-maximum positions of the two distinct peaks. The arrows represent the membrane thickness calculated for the first three successive lipid layers considered at 6, 12, and 18 Å from the protein surface. The last arrow is the thickness measured at a longer distance. Thicknesses were computed from the distribution of lipid head groups, including phosphate, glycerol, and cholesterol OH particles. **b** the evolution of the membrane thickness as a function of protein distance was further characterized using a Gaussian fit to the head group distribution. The error bars correspond to the error estimation on the fit.

5. Conclusion

Studied extensively for its function as a channel and therefore a potential medical target, VDAC is the gatekeeper of mitochondrial membranes.

In this study, we use a combination of AFM and MD simulations in a controlled lipid environment to explore the influence of the main MOM lipids, POPC and POPE, and cholesterol on the organisation of VDAC1. We were able to conclude that lipids had a real impact on the oligomerisation of VDAC1 and therefore on its function. To determine the orientation of VDAC in assemblies, we have developed a new method called 'nanobead orientation determination', in which a 5 nm gold nanoparticle, functionalized with a Ni-NTA group, is attached to the 6His tag of VDAC1 on the intermembrane space (IMS) side of the protein. In this work, we propose that the clustering of VDACs, promoted by increased cholesterol content in the MAM (mitochondria-associated membrane), facilitates the efficient import of calcium into mitochondria by an IP3R-VDAC complex.

6. Contribution to the work.

This project is a collaboration with Dr. Lucie Bergdoll and Dr. Jean-Pierre Duneau of the LISM. I carried out all of the work presented obtained by HS-AFM. The data obtained by the AFM microscope were produced by Nicolas Buzhinsky in the laboratory, and the MD simulation data were produced by Jean-Pierre Duneau. The samples of VDAC1 into liposomes were produced and supplied by Lucie Bergdoll.

Conclusion générale et perspectives

Mission complémentaire : Vulgarisation scientifique

Mission complémentaire : Vulgarisation scientifique

Le métier de chercheur suppose de maîtriser deux capacités : celle de concevoir et réaliser des projets de recherche, et celle de communiquer ses connaissances dans la communauté scientifique et dans la société. La diffusion du savoir est une compétence importante pour le métier de chercheur mais un exercice difficile à faire.

Quel que soit le domaine, les méthodes utilisées et les découvertes doivent être partagées car elles ont pour but de faire évoluer les connaissances de l'Homme. Le partage dans la communauté scientifique est bien établie : les publications, les conférences, les séminaires, … et les cours à l'université par des scientifiques permettent de faire partager les connaissances au fur et à mesure à des futures scientifiques. La partie la plus difficile finalement est de rendre passionnant et accessible la Science à un public moins averti qui ne connait mal ou pas cet univers.

Avant de commencer ma thèse, je participais déjà à des évènements de partage de la Science avec la Fête de la Science par exemple, au sein de mon laboratoire (en tant que stagiaire puis ingénieure). Cependant, en commençant ma thèse en Octobre 2020, je me suis aperçue qu'il était plus que nécessaire de savoir partager ses recherches mais également la Science de manière générale.

Au cours de ma thèse, j'ai donc eu le privilège de m'engager activement pendant 2ans au programme de Mission complémentaire de Vulgarisation scientifique proposé par la Cellule de culture scientifique et technique à l'Université Aix-Marseille. La liste de tous les événements auxquels j'ai participé à travers cette mission, ainsi que les autres évènements de mon propre chef, sont résumés dans la Rubrique *Liste de publications et des participation aux conférences/diffusion scientifique* au début du manuscrit.

Cette expérience enrichissante visait à rendre mes travaux, et mon domaine de recherche accessible à un large public. J'ai participé à des évènements locaux (Souk des Sciences, Transfert), nationaux (Fête de Science, Déclic), Européen (Nuit Européenne des Chercheurs) ou encore internationaux (Expérimentarium, Pint of Science). La Figure XX illustre ma participation à certains évènements. Lors de ces événements, j'ai eu l'occasion d'expliquer de manière simplifiée et encourageante, mes recherches sur les interactions protéine-lipide au sein des membranes cellulaires, mais également sur d'autres thématiques de recherches du laboratoire.

En parallèle, j'ai eu l'opportunité de participer au programme « Chercheur.se en classe » au sein de plusieurs établissements scolaires des Bouches-du-Rhône (privilégiant les collèges été les lycées). L'objectif était de : (i) présenter le monde de la Recherche dans

son ensemble, (ii) simplifier les concepts scientifiques de mes travaux de recherche et (iii) partager mon parcours scolaire/universitaire. J'ai adapté mon discours et mes exemples pour que les élèves puissent facilement comprendre l'importance et les applications pratiques de mes recherches.

J'ai décidé de donner une vraie place à cette mission complémentaire dans mon manuscrit, car cette expérience m'a permis de développer mes compétences en communication scientifique et pédagogique, tout en donnant un aperçu de l'impact potentiel de la Science dans la Société à un large public. Cela a également renforcé ma conviction quant à l'importance de partager ma curiosité et ma passion pour la recherche, et d'encourager les femmes à oser s'engager dans des carrières scientifiques.



Figure XX : **Montage de quelques photos à quelques évènements.**

Bibliographie

1. Ole G. Mouritsen. ‘Life – as a matter of fat’. The emerging science of lipidomics. Berlin: Springer-Verlag; Heidelberg: GmbH & Co. K. ISBN: 3-540-23248-6. *Chemistry and Physics of Lipids* **135**, 105–106 (2005).
2. van Meer, G., Voelker, D. & Feigenson, G. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 112–24 (2008).
3. Sohlenkamp, C. & Geiger, O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews* **40**, 133–159 (2016).
4. 1. La cellule et sa membrane plasmique [biologie cellulaire]. https://ressources.unisciel.fr/biocell/chap1/co/module_Chap1.html.
5. Chen, X., Al-Mualem, Z. & Baiz, C. Lipid Landscapes: Vibrational Spectroscopy for Decoding Membrane Complexity. Preprint at https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-2fc3w (2023).
6. *Structure and Dynamics of Membranes*. (1995).
7. Goñi, F. M. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1838**, 1467–1476 (2014).
8. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
9. Kusumi, A. *et al.* Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson’s fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 215–250 (2012).
10. Pabst, G. & Keller, S. Exploring membrane asymmetry and its effects on membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **49**, 333–345 (2024).
11. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 281–296 (2018).
12. Zhao, H. & Lappalainen, P. A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein–lipid interactions. *Mol Biol Cell* **23**, 2823–2830 (2012).
13. Malanovic, N. & Lohner, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* **9**, 59 (2016).
14. Doumane, M. Les membranes biologiques : des structures dynamiques. *Planet-Vie* https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/membranes/les-membranes-biologiques-des-structures-dynamiques (2020).
15. Epand, R. M. Introduction to membrane lipids. *Methods Mol Biol* **1232**, 1–6 (2015).
16. Kierszenbaum, A. L. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l’anatomie pathologique*. (De Boeck Supérieur, 2006).
17. Yang, S.-T., Kreutzberger, A. J. B., Lee, J., Kiessling, V. & Tamm, L. K. The Role of Cholesterol in Membrane Fusion. *Chem Phys Lipids* **199**, 136–143 (2016).
18. Bhattacharya, S. & Haldar, S. Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochim Biophys Acta* **1467**, 39–53 (2000).

19. Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 688–699 (2010).
20. Engel, A. & Gaub, H. E. Structure and Mechanics of Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 127–148 (2008).
21. von Heijne, G. Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 909–918 (2006).
22. Simunovic, M. *et al.* How curvature-generating proteins build scaffolds on membrane nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 11226–11231 (2016).
23. Miyagi, A., Chipot, C., Rangl, M. & Scheuring, S. High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nature Nanotech* **11**, 783–790 (2016).
24. Raynal, P. & Pollard, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1197**, 63–93 (1994).
25. Corin, K. & Bowie, J. U. How bilayer properties influence membrane protein folding. *Protein Sci* **29**, 2348–2362 (2020).
26. Hegde, R. S. & Keenan, R. J. The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 107–124 (2022).
27. Drew, D. & Boudker, O. Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem* **85**, 543–572 (2016).
28. Alam, S., Doherty, E., Ortega-Prieto, P., Arizanova, J. & Fets, L. Membrane transporters in cell physiology, cancer metabolism and drug response. *Dis Model Mech* **16**, dmm050404 (2023).
29. Demarche, S., Sugihara, K., Zambelli, T., Tiefenauer, L. & Vörös, J. Techniques for recording reconstituted ion channels. *The Analyst* **136**, 1077–89 (2011).
30. Alberts, B. *et al.* Principles of Membrane Transport. in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (Garland Science, 2002).
31. Dubyak, G. Ion homeostasis, channels, and transporters: An update on cellular mechanisms. *Advances in physiology education* **28**, 143–54 (2005).
32. DeMarco, K. R., Bekker, S. & Vorobyov, I. Challenges and advances in atomistic simulations of potassium and sodium ion channel gating and permeation. *J Physiol* **597**, 679–698 (2019).
33. Corradi, V. *et al.* Emerging Diversity in Lipid–Protein Interactions. *Chem Rev* **119**, 5775–5848 (2019).
34. Un bond en avant vers des médicaments plus performants. *CNRS Le journal* https://lejournal.cnrs.fr/nos-blogs/focus-sciences/un-bond-en-avant-vers-des-medicaments-plus-performants.
35. Bigay, J. & Antonny, B. Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Developmental Cell* **23**, 886–895 (2012).
36. Levental, I. & Lyman, E. Regulation of membrane protein structure and function by their lipid nano-environment. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 107–122 (2023).
37. van IJzendoorn, S. C. D., Agnetti, J. & Gassama-Diagne, A. Mechanisms behind the polarized distribution of lipids in epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1862**, 183145 (2020).

38. Sanderson, J. M. Resolving the kinetics of lipid, protein and peptide diffusion in membranes. *Mol Membr Biol* **29**, 118–143 (2012).
39. Pomorski, T. & Menon, A. K. Lipid flippases and their biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2908–2921 (2006).
40. Kuk, A. C. Y., Hao, A. & Lee, S.-Y. Structure and Mechanism of the Lipid Flippase MurJ. *Annu Rev Biochem* **91**, 705–729 (2022).
41. Frick, M., Schmidt, K. & Nichols, B. J. Modulation of lateral diffusion in the plasma membrane by protein density. *Curr Biol* **17**, 462–467 (2007).
42. Le Gall, A. H., Yeaman, C., Muesch, A. & Rodriguez-Boulan, E. Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin Nephrol* **15**, 272–284 (1995).
43. Omardien, S., Drijfhout, J. W., Zaat, S. A. & Brul, S. Cationic Amphipathic Antimicrobial Peptides Perturb the Inner Membrane of Germinated Spores Thus Inhibiting Their Outgrowth. *Front Microbiol* **9**, 2277 (2018).
44. Borovyagin, V. L. & Sabelnikov, A. G. Lipid polymorphism of model and cellular membranes as revealed by electron microscopy. *Electron Microsc Rev* **2**, 75–115 (1989).
45. van den Brink-van der Laan, E., Antoinette Killian, J. & de Kruijff, B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1666**, 275–288 (2004).
46. Escriba, P. 2014 BBA 3 Nacholeate 2-hydroxyoleic acid and sphingomyelin synthase in cancer. (2018).
47. Picas, L., Rico, F. & Scheuring, S. Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers. *Biophys J* **102**, L01–L03 (2012).
48. Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D. & Evans, E. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J* **79**, 328–339 (2000).
49. Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E. R., Webb, W. W. & Feigenson, G. W. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 2182–2194 (2007).
50. Elson, E. L., Fried, E., Dolbow, J. E. & Genin, G. M. Phase Separation in Biological Membranes: Integration of Theory and Experiment. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 207–226 (2010).
51. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. & Eggeling, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 361–374 (2017).
52. Levental, I., Levental, K. R. & Heberle, F. A. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends in Cell Biology* **30**, 341–353 (2020).
53. Bernard, C., Carotenuto, A. R., Pugno, N. M., Fraldi, M. & Deseri, L. Modelling lipid rafts formation through chemo-mechanical interplay triggered by receptor-ligand binding. *Biomech Model Mechanobiol* **23**, 485–505 (2024).
54. McMahon, H. T. & Boucrot, E. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* **128**, 1065–1070 (2015).
55. Bozelli, J. C., Aulakh, S. S. & Epand, R. M. Membrane shape as determinant of protein properties. *Biophysical Chemistry* **273**, 106587 (2021).
56. Johnson, D. H., Kou, O. H., Bouzos, N. & Zeno, W. F. Protein-membrane interactions: sensing and generating curvature. *Trends Biochem Sci* **49**, 401–416 (2024).

57. Bassereau, P. *et al.* Protein Spatial Distribution Depends on Membrane Curvature. *Biophysical Journal* **108**, 2a (2015).
58. Dharan, R. *et al.* Transmembrane proteins tetraspanin 4 and CD9 sense membrane curvature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2208993119 (2022).
59. Lata, K., Singh, M., Chatterjee, S. & Chattopadhyay, K. Membrane Dynamics and Remodelling in Response to the Action of the Membrane-Damaging Pore-Forming Toxins. *The Journal of Membrane Biology* **255**, 1–13 (2022).
60. Cooke, I. R. & Deserno, M. Coupling between Lipid Shape and Membrane Curvature. *Biophys J* **91**, 487–495 (2006).
61. Chiaruttini, N. *et al.* Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell* **163**, 866–879 (2015).
62. Peter, B. J. *et al.* BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* **303**, 495–499 (2004).
63. Fanani, M. L. & Ambroggio, E. E. Phospholipases and Membrane Curvature: What Is Happening at the Surface? *Membranes (Basel)* **13**, 190 (2023).
64. Benarroch, J. M. & Asally, M. The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics. *Trends in Microbiology* **28**, 304–314 (2020).
65. Castora, F. J. *et al.* Expression Changes in Mitochondrial Genes Affecting Mitochondrial Morphology, Transmembrane Potential, Fragmentation, Amyloidosis, and Neuronal Cell Death Found in Brains of Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* **90**, 119–137 (2022).
66. Local field potentials in Parkinson's disease: A frequency-based review - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33932557/.
67. Dilly, S., Poncin, S., Lamy, C., Liégeois, J.-F. & Seutin, V. Physiologie, pharmacologie et modélisation de canaux potassiques - Zoom sur les canaux SK. *Med Sci (Paris)* **28**, 395–402 (2012).
68. Yilmaz, N., Yamaji-Hasegawa, A., Hullin-Matsuda, F. & Kobayashi, T. Molecular mechanisms of action of sphingomyelin-specific pore-forming toxin, lysenin. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **73**, 188–198 (2018).
69. Lizarbe, M. A., Barrasa, J. I., Olmo, N., Gavilanes, F. & Turnay, J. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 2652–2683 (2013).
70. Jiang, Y. *et al.* HS-AFM single-molecule structural biology uncovers basis of transporter wanderlust kinetics. *Nat Struct Mol Biol* 1–10 (2024) doi:10.1038/s41594-024-01260-3.
71. Schmidt, V., Sidore, M., Bechara, C., Duneau, J.-P. & Sturgis, J. N. The lipid environment of *Escherichia coli* Aquaporin Z. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1861**, 431–440 (2019).
72. Schmidt, V. & Sturgis, J. N. Hydrophobic Interfaces, Key Regions for Assembly of Transmembrane Proteins : A Study of E. Coli Aquaporin Z. *Biophysical Journal* **112**, 469a (2017).
73. Duneau, J.-P., Khao, J. & Sturgis, J. N. Lipid Perturbation by Membrane Proteins and the Lipophobic Effect. *Biophysical Journal* **112**, 326a (2017).
74. Hianik, T. Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. *Acta Physica Slovaca* **56**, 687–805 (2006).

75. Brown, M. F. Soft Matter in Lipid–Protein Interactions. *Annual Review of Biophysics* **46**, 379–410 (2017).
76. Smith, A. W. Lipid–protein interactions in biological membranes: A dynamic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1818**, 172–177 (2012).
77. Céspedes, P. F., Beckers, D., Dustin, M. L. & Sezgin, E. Model membrane systems to reconstitute immune cell signaling. *FEBS J* **288**, 1070–1090 (2021).
78. van Zanten, T. S., Lopez-Bosque, M. J. & Garcia-Parajo, M. F. Imaging individual proteins and nanodomains on intact cell membranes with a probe-based optical antenna. *Small* **6**, 270–275 (2010).
79. van Zanten, T. S. & Mayor, S. Current approaches to studying membrane organization. *F1000Res* **4**, F1000 Faculty Rev-1380 (2015).
80. Shen, H.-H., Lithgow, T. & Martin, L. Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities. *International journal of molecular sciences* **14**, 1589–607 (2013).
81. Sarkis, J. & Vié, V. Biomimetic Models to Investigate Membrane Biophysics Affecting Lipid–Protein Interaction. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, (2020).
82. Zhang, G. & Sun, J. Lipid in Chips: A Brief Review of Liposomes Formation by Microfluidics. *International Journal of Nanomedicine* **Volume 16**, 7391–7416 (2021).
83. Richter, R. P., Bérat, R. & Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* **22**, 3497–3505 (2006).
84. Castellana, E. T. & Cremer, P. S. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* **61**, 429–444 (2006).
85. Jørgensen, I. L., Kemmer, G. C. & Pomorski, T. G. Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques. *Eur Biophys J* **46**, 103–119 (2017).
86. Rigaud, J. L., Pitard, B. & Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1231**, 223–246 (1995).
87. Rigaud, J.-L. & Lévy, D. Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes. in *Methods in Enzymology* vol. 372 65–86 (Academic Press, 2003).
88. Richards, M. J. *et al.* Membrane Protein Mobility and Orientation Preserved in Supported Bilayers Created Directly from Cell Plasma Membrane Blebs. *Langmuir* **32**, 2963–2974 (2016).
89. Haruyama, T. *et al.* Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Structure* **27**, 152-160.e3 (2019).
90. Woubshete, M., Cioccolo, S. & Byrne, B. Advances in Membrane Mimetic Systems for Manipulation and Analysis of Membrane Proteins: Detergents, Polymers, Lipids and Scaffolds. *ChemPlusChem* **89**, e202300678 (2024).
91. Lee, T.-H., Hirst, D. J. & Aguilar, M.-I. New insights into the molecular mechanisms of biomembrane structural changes and interactions by optical biosensor technology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 1868–1885 (2015).
92. Martens, C. *et al.* Direct protein-lipid interactions shape the conformational landscape of secondary transporters. *Nat Commun* **9**, 4151 (2018).

93. Boulos, I. *et al*. Exploring the World of Membrane Proteins: Techniques and Methods for Understanding Structure, Function, and Dynamics. *Molecules* **28**, 7176 (2023).
94. Bagheri, Y., Ali, A. A. & You, M. Current Methods for Detecting Cell Membrane Transient Interactions. *Front. Chem.* **8**, (2020).
95. Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I. & Bootman, M. D. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* **2014**, pdb.top071795 (2014).
96. Renz, M. Fluorescence microscopy-a historical and technical perspective. *Cytometry A* **83**, 767–779 (2013).
97. Llères, D., Swift, S. & Lamond, A. Detecting Protein-Protein Interactions In Vivo with FRET using Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]* **Chapter 12**, Unit12.10 (2007).
98. Introduction to Fluorescence. in *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (ed. Lakowicz, J. R.) 1–26 (Springer US, Boston, MA, 2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4_1.
99. Fish, K. N. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr Protoc* **2**, e517 (2022).
100. Schermelleh, L. *et al*. Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol* **21**, 72–84 (2019).
101. Hong, M., Zhang, Y. & Hu, F. Membrane protein structure and dynamics from NMR spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem* **63**, 1–24 (2012).
102. Baker, L. A. & Baldus, M. Characterization of membrane protein function by solid-state NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* **27**, 48–55 (2014).
103. Scott, J. L., Musselman, C. A., Adu-Gyamfi, E., Kutateladze, T. G. & Stahelin, R. V. Emerging methodologies to investigate lipid–protein interactions. *Integr Biol (Camb)* **4**, 247–258 (2012).
104. Nadezhdin, K. D. *et al*. Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 564–572 (2021).
105. Muller, M. P. *et al*. Characterization of Lipid–Protein Interactions and Lipid-Mediated Modulation of Membrane Protein Function through Molecular Simulation. *Chem. Rev.* **119**, 6086–6161 (2019).
106. Duncan, A. L., Song, W. & Sansom, M. S. P. Lipid-Dependent Regulation of Ion Channels and G Protein-Coupled Receptors: Insights from Structures and Simulations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **60**, 31–50 (2020).
107. Dufrêne, Y. F., Viljoen, A., Mignolet, J. & Mathelié-Guinlet, M. AFM in cellular and molecular microbiology. *Cellular Microbiology* **23**, e13324 (2021).
108. Ando, T. Overview of Bioimaging with HS-AFM. in *High-Speed Atomic Force Microscopy in Biology: Directly Watching Dynamics of Biomolecules in Action* (ed. Ando, T.) 123–142 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2022). doi:10.1007/978-3-662-64785-1_9.
109. Zuttion, F., Redondo-Morata, L., Marchesi, A. & Casuso, I. High resolution and High-Speed Atomic Force Microscope imaging. in *Nanoscale Imaging. Methods and protocols* (ed. Lyubchenko, Y. L.) vol. 1814 181–200 (Springer, 2018).
110. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930–933 (1986).

111. Dufrêne, Y. *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology* **12**, 295–307 (2017).
112. Buzón, P. *et al.* Virus self-assembly proceeds through contact-rich energy minima. *Science Advances* **7**, eabg0811 (2021).
113. Pyne, A. L. B. *et al.* Base-pair resolution analysis of the effect of supercoiling on DNA flexibility and major groove recognition by triplex-forming oligonucleotides. *Nat Commun* **12**, 1053 (2021).
114. Jukic, N., Perrino, A. P., Humbert, F., Roux, A. & Scheuring, S. Snf7 spirals sense and alter membrane curvature. *Nat Commun* **13**, 2174 (2022).
115. Saha, P. *et al.* Modulation of SARS-CoV-2 spike binding to ACE2 through conformational selection. 2024.03.15.585207 Preprint at https://doi.org/10.1101/2024.03.15.585207 (2024).
116. Muscovite - an overview | ScienceDirect Topics. https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/muscovite.
117. Bussiek, M., Mücke, N. & Langowski, J. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution. *Nucleic Acids Res* **31**, e137 (2003).
118. Shlyakhtenko, L. S., Gall, A. A. & Lyubchenko, Y. L. Mica Functionalization for Imaging of DNA and Protein-DNA Complexes with Atomic Force Microscopy. in *Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols* (eds. Taatjes, D. J. & Roth, J.) 295–312 (Humana Press, Totowa, NJ, 2013). doi:10.1007/978-1-62703-056-4_14.
119. Karner, A. *et al.* Tuning membrane protein mobility by confinement into nanodomains. *Nat Nanotechnol* **12**, 260–266 (2017).
120. Hennesthal, C., Drexler, J. & Steinem, C. Membrane-Suspended Nanocompartments Based on Ordered Pores in Alumina. *ChemPhysChem* **3**, 885–889 (2002).
121. Heinemann, F. & Schwille, P. Preparation of Micrometer-Sized Free-Standing Membranes. *ChemPhysChem* **12**, 2568–2571 (2011).
122. Gonçalves, R. P. *et al.* Two-chamber AFM: probing membrane proteins separating two aqueous compartments. *Nat Methods* **3**, 1007–1012 (2006).
123. Nussio, M. R. *et al.* Nanomechanical characterization of phospholipid bilayer islands on flat and porous substrates: a force spectroscopy study. *J Phys Chem B* **113**, 10339–10347 (2009).
124. Steltenkamp, S. *et al.* Mechanical Properties of Pore-Spanning Lipid Bilayers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **91**, 217–226 (2006).
125. Mey, I. *et al.* Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers. *J Am Chem Soc* **131**, 7031–7039 (2009).
126. Heyderman, L. J. *et al.* High volume fabrication of customised nanopore membrane chips. *Microelectronic Engineering* **67–68**, 208–213 (2003).
127. Kendall, E. L., Ngassam, V. N., Gilmore, S. F., Brinker, C. J. & Parikh, A. N. Lithographically defined macroscale modulation of lateral fluidity and phase separation realized via patterned nanoporous silica-supported phospholipid bilayers. *J Am Chem Soc* **135**, 15718–15721 (2013).

128. Kocun, M., Lazzara, T. D., Steinem, C. & Janshoff, A. Preparation of solvent-free, pore-spanning lipid bilayers: modeling the low tension of plasma membranes. *Langmuir* **27**, 7672–7680 (2011).
129. Viljoen, A. *et al*. Force spectroscopy of single cells using atomic force microscopy. *Nature Reviews Methods Primers* **1**, 63 (2021).
130. Lacaria, L., Podestà, A., Radmacher, M. & Rico, F. 2.2 Contact Mechanics. in *2.2 Contact Mechanics* 21–64 (De Gruyter, 2023). doi:10.1515/9783110640632-003.
131. Lostao, A., Lim, K., Pallarés, M. C., Ptak, A. & Marcuello, C. Recent advances in sensing the inter-biomolecular interactions at the nanoscale - A comprehensive review of AFM-based force spectroscopy. *Int J Biol Macromol* **238**, 124089 (2023).
132. Cheirdaris, D. G. Force Spectroscopy in Mechanical Protein Domains Unfolding. *Adv Exp Med Biol* **1339**, 187–193 (2021).
133. User, S. Measuring and Analyzing Force-Distance Curves with AFM. https://www.afmworkshop.com/newsletter/measuring-and-analyzing-force-distance-curves-with-atomic-force-microscopy.
134. Doak, S. H. *et al*. High-resolution imaging using a novel atomic force microscope and confocal laser scanning microscope hybrid instrument: essential sample preparation aspects. *Histochem Cell Biol* **130**, 909–916 (2008).
135. Janel, S., Werkmeister, E., Bongiovanni, A., Lafont, F. & Barois, N. CLAFEM: Correlative light atomic force electron microscopy. *Methods Cell Biol* **140**, 165–185 (2017).
136. Ramachandran, S. *et al*. Structure and Permeability of Ion-channels by Integrated AFM and Waveguide TIRF Microscopy. *Sci Rep* **4**, 4424 (2014).
137. Mathur, A. B., Truskey, G. A. & Reichert, W. M. Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. *Biophys J* **78**, 1725–1735 (2000).
138. Bondia, P., Casado, S. & Flors, C. Correlative Super-Resolution Fluorescence Imaging and Atomic Force Microscopy for the Characterization of Biological Samples. in *Super-Resolution Microscopy: Methods and Protocols* (ed. Erfle, H.) 105–113 (Springer, New York, NY, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-7265-4_9.
139. Miranda, A. *et al*. How did correlative atomic force microscopy and super-resolution microscopy evolve in the quest for unravelling enigmas in biology? *Nanoscale* **13**, 2082–2099 (2021).
140. Ando, T. *et al*. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12468–12472 (2001).
141. Ando, T. *High-Speed Atomic Force Microscopy in Biology: Directly Watching Dynamics of Biomolecules in Action*. (Springer, Berlin, Heidelberg, 2022). doi:10.1007/978-3-662-64785-1.
142. Rico, F., Gonzalez, L., Casuso, I., Puig-Vidal, M. & Scheuring, S. High-speed force spectroscopy unfolds titin at the velocity of molecular dynamics simulations. *Science* **342**, 741–743 (2013).
143. Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R. & Ando, T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* **468**, 72–76 (2010).
144. Jukic, N., Perrino, A. P., Redondo-Morata, L. & Scheuring, S. Structure and dynamics of ESCRT-III membrane remodeling proteins by high-speed atomic force microscopy. *Journal of Biological Chemistry* **299**, (2023).

145. Tagiltsev, G., Haselwandter, C. A. & Scheuring, S. Nanodissected elastically loaded clathrin lattices relax to increased curvature. *Science Advances* **7**, eabg9934 (2021).
146. Sakiyama, Y., Mazur, A., Kapinos, L. E. & Lim, R. Y. H. Spatiotemporal dynamics of the nuclear pore complex transport barrier resolved by high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol* **11**, 719–723 (2016).
147. Sun, Z., Hashemi, M., Warren, G., Bianco, P. R. & Lyubchenko, Y. L. Dynamics of the Interaction of RecG Protein with Stalled Replication Forks. *Biochemistry* **57**, 1967–1976 (2018).
148. Puppulin, L. *et al*. Dynamics of Target DNA Binding and Cleavage by Staphylococcus aureus Cas9 as Revealed by High-Speed Atomic Force Microscopy. *ACS Nano* **17**, 4629–4641 (2023).
149. Marchesi, A. *et al*. An iris diaphragm mechanism to gate a cyclic nucleotide-gated ion channel. *Nat Commun* **9**, 3978 (2018).
150. Ruan, Y. *et al*. Structural titration of receptor ion channel GLIC gating by HS-AFM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 10333–10338 (2018).
151. Lansky, S. *et al*. A pentameric TRPV3 channel with a dilated pore. *Nature* **621**, 206–214 (2023).
152. Maity, S. *et al*. High-speed atomic force microscopy reveals a three-state elevator mechanism in the citrate transporter CitS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2113927119 (2022).
153. Maiti, S., Singh, A., Maji, T., Saibo, N. V. & De, S. Experimental methods to study the structure and dynamics of intrinsically disordered regions in proteins. *Curr Res Struct Biol* **7**, 100138 (2024).
154. Casuso, I., Sens, P., Rico, F. & Scheuring, S. Experimental Evidence for Membrane-Mediated Protein-Protein Interaction. *Biophys J* **99**, L47–L49 (2010).
155. Eghiaian, F., Rico, F., Colom, A., Casuso, I. & Scheuring, S. High-speed atomic force microscopy: Imaging and force spectroscopy. *FEBS Letters* **588**, 3631–3638 (2014).
156. Mangenot, S., Buzhynskyy, N., Girmens, J.-F. & Scheuring, S. Malformation of junctional microdomains in cataract lens membranes from a type II diabetes patient. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **457**, 1265–74 (2008).
157. Casuso, I. *et al*. Characterization of the motion of membrane proteins using high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol* **7**, 525–529 (2012).
158. Munguira, I. L. B., Takahashi, H., Casuso, I. & Scheuring, S. Lysenin Toxin Membrane Insertion Is pH-Dependent but Independent of Neighboring Lysenins. *Biophys J* **113**, 2029–2036 (2017).
159. Zuttion, F. *et al*. High-speed atomic force microscopy highlights new molecular mechanism of daptomycin action. *Nat Commun* **11**, 6312 (2020).
160. Hammond, K., Ryadnov, M. G. & Hoogenboom, B. W. Atomic force microscopy to elucidate how peptides disrupt membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1863**, 183447 (2021).
161. Casuso, I. I. Direct molecular level visualization of the structure-activity-relationship of drugs on biological membrane mimics. *Biophysical Journal* **121**, 319a (2022).
162. Heath, G. R., Lin, Y.-C., Matin, T. R. & Scheuring, S. Chapter Six - Structural dynamics of channels and transporters by high-speed atomic force microscopy. in *Methods in*

Enzymology (eds. Minor, D. L. & Colecraft, H. M.) vol. 652 127–159 (Academic Press, 2021).
163. Gari, R. *et al.* Correlation of Membrane Protein Conformational and Functional Dynamics. *Nature Communications* **12**, 4363 (2021).
164. Colom, A., Casuso, I., Rico, F. & Scheuring, S. A hybrid high-speed atomic force–optical microscope for visualizing single membrane proteins on eukaryotic cells. *Nat Commun* **4**, 2155 (2013).
165. Fukuda, S. *et al.* High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope. *Rev Sci Instrum* **84**, 073706 (2013).
166. Amyot, R. & Flechsig, H. BioAFMviewer: An interactive interface for simulated AFM scanning of biomolecular structures and dynamics. *PLOS Computational Biology* **16**, e1008444 (2020).
167. Heath, G. R., Micklethwaite, E. & Storer, T. M. NanoLocz: Image Analysis Platform for AFM, High-Speed AFM, and Localization AFM. *Small Methods* **n/a**, 2301766.
168. Ortega-Esteban, A. *et al.* Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid. *Ultramicroscopy* **114**, 56–61 (2012).
169. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671–675 (2012).
170. Horcas, I. *et al.* WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* **78**, 013705 (2007).
171. Amyot, R., Kodera, N. & Flechsig, H. BioAFMviewer software for simulation atomic force microscopy of molecular structures and conformational dynamics. *J Struct Biol X* **7**, 100086 (2023).
172. Janshoff, A. & Steinem, C. Mechanics of lipid bilayers: What do we learn from pore-spanning membranes? *Biochim Biophys Acta* **1853**, 2977–2983 (2015).
173. Sun, L., Chien, C. L. & Searson, P. C. Fabrication of nanoporous single crystal mica templates for electrochemical deposition of nanowire arrays. *Journal of Materials Science* **35**, 1097–1103 (2000).
174. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000414 (2010).
175. Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O. & Bach, H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology* **15**, 65 (2017).
176. Hervin, V., Roy, V. & Agrofoglio, L. A. Antibiotics and Antibiotic Resistance—Mur Ligases as an Antibacterial Target. *Molecules* **28**, 8076 (2023).
177. van Heijenoort, J. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* **18**, 503–519 (2001).
178. Mohammadi, T. *et al.* The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **65**, 1106–1121 (2007).
179. D, A.-J., D, G., M, J., Pm, A. & Me, G. Structure-function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. *Glycobiology* **24**, (2014).
180. Brown, K. *et al.* Crystal structure of the Pseudomonas aeruginosa MurG: UDP-GlcNAc substrate complex. *Protein Pept Lett* **20**, 1002–1008 (2013).
181. Ha, S., Gross, B. & Walker, S. E. Coli MurG: a paradigm for a superfamily of glycosyltransferases. *Curr Drug Targets Infect Disord* **1**, 201–213 (2001).

182. Ha, S., Walker, D., Shi, Y. & Walker, S. The 1.9 A crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci* **9**, 1045–1052 (2000).
183. Hu, Y. *et al.* Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 845–849 (2003).
184. Brown, K. *et al.* Crystal Structure of the Pseudomonas aeruginosa MurG: UDP-GlcNAc Substrate Complex. *PPL* **20**, 1002–1008 (2013).
185. Favini, S., Contreras-Martel, C., Thielens, N. & Dessen, A. MreB and MurG as scaffolds for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *Environmental microbiology* **15**, (2013).
186. Laddomada, F. *et al.* The MurG glycosyltransferase provides an oligomeric scaffold for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis in the human pathogen Bordetella pertussis. *Sci Rep* **9**, 4656 (2019).
187. Müller, A. *et al.* Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E7077–E7086 (2016).
188. *Biochimie et biophysique des membranes : aspects structuraux et fonctionnels (2e édition) - Emanuel Shechter, Bernard Rossignol - Dunod - Grand format - Dalloz Librairie PARIS*.
189. Lybarger, S. R. & Maddock, J. R. Polarity in Action: Asymmetric Protein Localization in Bacteria. *Journal of Bacteriology* **183**, 3261 (2001).
190. Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A. & Hara, H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol* **61**, 1110–1117 (2006).
191. Lai, E.-M., Nair, U., Phadke, N. D. & Maddock, J. R. Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **52**, 1029–1044 (2004).
192. Vanounou, S., Pines, D., Pines, E., Parola, A. H. & Fishov, I. Coexistence of domains with distinct order and polarity in fluid bacterial membranes. *Photochem Photobiol* **76**, 1–11 (2002).
193. Strahl, H., Bürmann, F. & Hamoen, L. W. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nat Commun* **5**, 3442 (2014).
194. Oswald, F., Varadarajan, A., Lill, H., Peterman, E. J. G. & Bollen, Y. J. M. MreB-Dependent Organization of the E. coli Cytoplasmic Membrane Controls Membrane Protein Diffusion. *Biophysical Journal* **110**, 1139–1149 (2016).
195. Vats, K., Knutson, K., Hinderliter, A. & Sheets, E. D. Peripheral protein organization and its influence on lipid diffusion in biomimetic membranes. *ACS Chem Biol* **5**, 393–403 (2010).
196. Johnson, S. A. *et al.* Temperature-dependent phase behavior and protein partitioning in giant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1427–1435 (2010).
197. Schlebach, J. P. *et al.* Topologically Diverse Human Membrane Proteins Partition to Liquid-Disordered Domains in Phase-Separated Lipid Vesicles. *Biochemistry* **55**, 985–988 (2016).
198. Müller, A. *et al.* Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E7077–E7086 (2016).

199. Hu, Y., Helm, J. S., Chen, L., Ye, X.-Y. & Walker, S. Ramoplanin inhibits bacterial transglycosylases by binding as a dimer to lipid II. *J Am Chem Soc* **125**, 8736–8737 (2003).
200. Helm, J. S., Hu, Y., Chen, L., Gross, B. & Walker, S. Identification of Active-Site Inhibitors of MurG Using a Generalizable, High-Throughput Glycosyltransferase Screen. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11168–11169 (2003).
201. Mravljak, J. *et al.* Synthesis and biological evaluation of a diazepanone-based library of liposidomycins analogs as MraY inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 1582–1592 (2011).
202. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**, 42–51 (2015).
203. World Health Organisation: Critically important antimicro... - Google Scholar. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Critically+Important+Antimicrobials+for+Human+Medicine+5th+Revision&publication_year=2016&.
204. World Health Organization: Global action plan on... - Google Scholar. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The+FAO+Action+Plan+on+Antimicrobial+Resistance+2021%E2%80%932025&publication_year=2021&.
205. Maggio, B., Rosetti, C. M., Borioli, G., Fanani, M. & Boca, M. Protein-mediated surface structuring in biomembranes. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* **38**, 1735–48 (2006).
206. Guigas, G. & Weiss, M. Effects of protein crowding on membrane systems. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 2441–2450 (2016).
207. R, M., Jh, J. & Ag, C. Non-Brownian diffusion in lipid membranes: Experiments and simulations. *Biochimica et biophysica acta* **1858**, (2016).
208. Saeloh, D. *et al.* The novel antibiotic rhodomyrtone traps membrane proteins in vesicles with increased fluidity. *PLoS Pathog* **14**, e1006876 (2018).
209. Jiang, Y., Dai, X., Qin, M. & Guo, Z. Identification of an amphipathic peptide sensor of the Bacillus subtilis fluid membrane microdomains. *Commun Biol* **2**, 316 (2019).
210. Mitchison-Field, L. M. & Belin, B. J. Bacterial lipid biophysics and membrane organization. *Curr Opin Microbiol* **74**, 102315 (2023).
211. Hu, P. *et al.* Global functional atlas of Escherichia coli encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol* **7**, e96 (2009).
212. Wood, T. M. *et al.* Mechanistic insights into the C55-P targeting lipopeptide antibiotics revealed by structure–activity studies and high-resolution crystal structures. *Chemical Science* **13**, 2985 (2022).
213. Monzel, A. S., Enríquez, J. A. & Picard, M. Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nat Metab* **5**, 546–562 (2023).
214. Schiaffarino, O. *et al.* Mitochondrial membrane models built from native lipid extracts: Interfacial and transport properties. *Front Mol Biosci* **9**, 910936 (2022).
215. Horvath, S. E. & Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* **52**, 590–614 (2013).
216. Kurokin, I. *et al.* Targeted Lipidomics of Mitochondria in a Cellular Alzheimer's Disease Model. *Biomedicines* **9**, 1062 (2021).

217. Colell, A., Fernández, A. & Fernández-Checa, J. C. Mitochondria, cholesterol and amyloid beta peptide: a dangerous trio in Alzheimer disease. *J Bioenerg Biomembr* **41**, 417–423 (2009).
218. Barbero-Camps, E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid β neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *Am J Pathol* **184**, 2066–2081 (2014).
219. Rostovtseva, T., Queralt-Martín, M., Rosencrans, W. & Bezrukov, S. Targeting the Multiple Physiologic Roles of VDAC With Steroids and Hydrophobic Drugs. *Frontiers in Physiology* **11**, (2020).
220. Ben-Hail, D. *et al.* Novel Compounds Targeting the Mitochondrial Protein VDAC1 Inhibit Apoptosis and Protect against Mitochondrial Dysfunction. *J Biol Chem* **291**, 24986–25003 (2016).
221. Gonçalves, R. P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J. N. & Scheuring, S. Supramolecular Assembly of VDAC in Native Mitochondrial Outer Membranes. *Journal of Molecular Biology* **369**, 413–418 (2007).
222. Sander, P., Gudermann, T. & Schredelseker, J. A Calcium Guard in the Outer Membrane: Is VDAC a Regulated Gatekeeper of Mitochondrial Calcium Uptake? *Int J Mol Sci* **22**, 946 (2021).
223. van Delft, M. *et al.* A small molecule interacts with VDAC2 to block mouse BAK-driven apoptosis. *Nature Chemical Biology* **15**, (2019).
224. Shoshan-Barmatz, V., Shteinfer-Kuzmine, A. & Verma, A. VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules* **10**, 1485 (2020).
225. Yuan, Z. *et al.* Key residues in the VDAC2-BAK complex can be targeted to modulate apoptosis. *PLOS Biology* **22**, e3002617 (2024).
226. Rovini, A. Tubulin-VDAC Interaction: Molecular Basis for Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front. Physiol.* **10**, (2019).
227. Jacobs, D. *et al.* Probing Membrane Association of α-Synuclein Domains with VDAC Nanopore Reveals Unexpected Binding Pattern. *Sci Rep* **9**, 4580 (2019).
228. Queralt-Martín, M. *et al.* A lower affinity to cytosolic proteins reveals VDAC3 isoform-specific role in mitochondrial biology. *J Gen Physiol* **152**, e201912501 (2020).
229. Bayrhuber, M. *et al.* Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15370–15375 (2008).
230. Ujwal, R., Cascio, D., Chaptal, V., Ping, P. & Abramson, J. Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation. *Channels (Austin)* **3**, 167–170 (2009).
231. Dolder, M. *et al.* Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J Struct Biol* **127**, 64–71 (1999).
232. Bergdoll, L. A. *et al.* Protonation state of glutamate 73 regulates the formation of a specific dimeric association of mVDAC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E172–E179 (2018).
233. Schredelseker, J. *et al.* High Resolution Structure and Double Electron-Electron Resonance of the Zebrafish Voltage-dependent Anion Channel 2 Reveal an Oligomeric Population*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 12566–12577 (2014).

234. Hosaka, T. *et al.* Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1. *Protein Sci* **26**, 1749–1758 (2017).
235. Betaneli, V., Petrov, E. P. & Schwille, P. The Role of Lipids in VDAC Oligomerization. *Biophys J* **102**, 523–531 (2012).
236. Boulbrima, A., Temple, D. & Psakis, G. The multiple assemblies of VDAC: from conformational heterogeneity to β-aggregation and amyloid formation. *Biochem Soc Trans* **44**, 1531–1540 (2016).
237. Shoshan-Barmatz, V. *et al.* VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* **31**, 227–285 (2010).
238. Belosludtsev, K. N. *et al.* Effect of VBIT-4 on the functional activity of isolated mitochondria and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1866**, 184329 (2024).
239. Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A. & Fotiadis, D. The Supramolecular Assemblies of Voltage-dependent Anion Channels in the Native Membrane. *Journal of Molecular Biology* **370**, 246–255 (2007).