



HAL
open science

La RPE in cellula : étudier la dynamique des protéines dans leur habitat

Annalisa Pierro, Alessio Bonucci, Valérie Belle, Elisabetta Mileo

► **To cite this version:**

Annalisa Pierro, Alessio Bonucci, Valérie Belle, Elisabetta Mileo. La RPE in cellula : étudier la dynamique des protéines dans leur habitat. *L'Actualité Chimique*, 2021. hal-03855076

HAL Id: hal-03855076

<https://hal.science/hal-03855076>

Submitted on 16 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

La RPE *in cellula* : étudier la dynamique des protéines dans leur habitat

Annalisa Pierro,¹ Alessio Bonucci,¹ Valérie Belle,¹ Elisabetta Mileo^{1,*}

Aix-Marseille Univ, CNRS, BIP, Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, IMM, Marseille.

emileo@imm.cnrs.fr

1 - Introduction

La multitude de fonctions exercées par les protéines, molécules parmi les principaux acteurs du vivant, est intimement liée à la structure qu'elles adoptent dans leur habitat : la cellule. Il est important de souligner que cette structure n'est pas figée ni dans le temps, ni dans l'espace et qu'elle est potentiellement flexible et modulable selon son environnement cellulaire. Ainsi, la dynamique et la flexibilité structurale des protéines jouent un rôle central dans leurs fonctions biologiques. L'étude combinée de la structure et de la dynamique des protéines est donc cruciale pour comprendre leur fonctionnement et la Biologie Structurale est la branche de la biologie qui a cette mission.

La majorité de nos connaissances concernant la structure et la dynamique des protéines à l'échelle moléculaire provient d'études réalisées *in vitro*, c'est-à-dire sur des biomolécules purifiées, extraites de leur contexte biologique. Malgré l'importance de ces données, il apparaît clairement que ces études ne sont pas suffisantes pour décrypter finement leur mécanisme d'action car elles ne tiennent pas compte de la réalité de l'environnement cellulaire et peuvent conduire à des données biaisées. En effet, à l'inverse des conditions utilisées *in vitro*, le milieu cellulaire est incroyablement complexe. Par exemple, dans une cellule de la bactérie *Escherichia coli*, la concentration en protéines et en ARN est de l'ordre de 300 à 400 g/L, celle des ions inorganiques est de l'ordre de 300mM, et celle des métabolites de 1 à 100mM.¹ Cela implique un encombrement extrême dans le cytoplasme dû au grand nombre de macromolécules confinées, ainsi qu'une myriade d'interactions spécifiques et aspécifiques qui constituent des facteurs pouvant avoir un impact énorme sur la structure des protéines, leur dynamique et, par conséquence, sur leur fonction.

La volonté d'explorer la structure et la dynamique des biomolécules, ainsi que suivre leurs changements structuraux et leurs interactions dans l'environnement intracellulaire connaît depuis quelques années un intérêt très fort dans la communauté scientifique nationale et internationale ; les techniques de fluorescence et la spectroscopie RMN ont déjà permis des progrès importants dans ce domaine en expansion.²

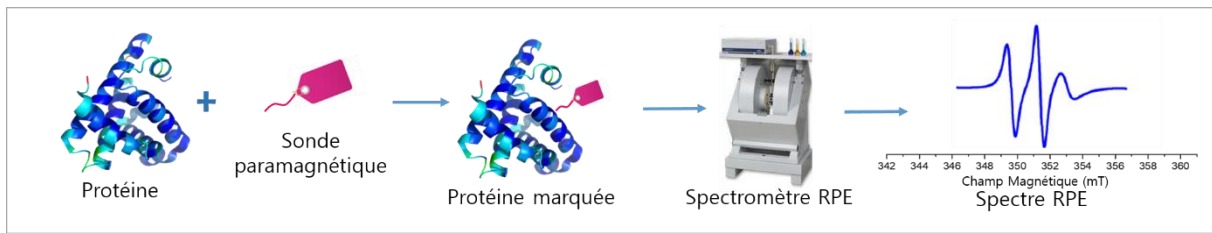


Figure 1 : Illustration d'une expérience type de mono-marquage pour évaluer la dynamique de la sonde paramagnétique.

Parmi les différentes méthodes biophysiques disponibles pour l'étude de la dynamique structurale des protéines, le marquage de spin couplé à la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) (acronyme anglais : **SDSL-EPR** pour Site-Directed Spin Labeling- Electron Paramagnetic Resonance) connaît ces dernières années un très fort développement et s'avère très puissant. Cette approche repose sur l'introduction spécifique en un site choisi de la protéine d'une *sonde paramagnétique* (ciblant le plus souvent la fonction sulfhydrile (-SH) des Cystéines) et sur l'analyse du spectre RPE résultant (Figure 1).³ De loin, la plus grande famille de sondes paramagnétiques (ou *marqueurs de spin*) pour le SDSL-EPR est représentée par les radicaux nitroxyde qui sont remarquablement stables (Figure 2), même si les complexes de gadolinium (III) et les radicaux trityl offrent

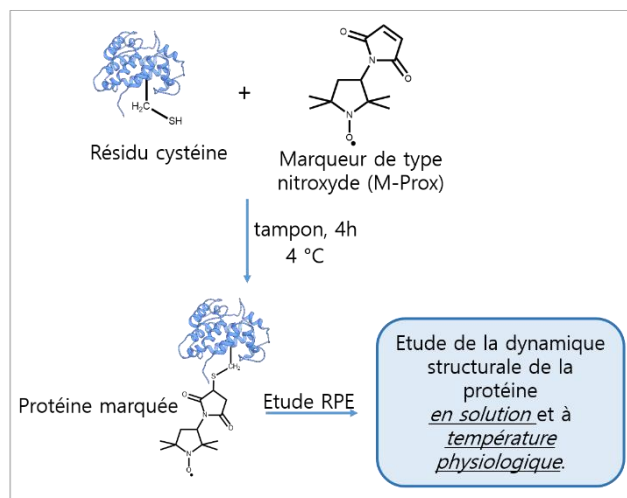


Figure 2 : Schéma représentant une réaction de marquage entre un résidu Cystéine d'une protéine et un radical nitroxyde (M-Prox).

actuellement des alternatives intéressantes.⁴

Un des principaux avantages des marqueurs de type nitroxyde est leur grande sensibilité à l'environnement local qui, dans l'approche SDSL-EPR, est exploitée pour obtenir des informations structurales concernant la biomolécule sur laquelle le nitroxyde est attaché. Doté d'un spin électronique $S=1/2$ en interaction hyperfine avec le spin nucléaire du noyau ^{14}N , les radicaux nitroxydes présentent des spectres RPE caractéristiques à 3 raies dont la forme est

très sensible à la mobilité de la sonde. C'est au travers de cette mobilité que l'on peut extraire par la simulation des spectres que l'on peut obtenir des informations structurales et dynamiques. Ces radicaux représentent ainsi de véritables spin-espion de leur environnement local.⁵ Avec les développements plus récents de la spectroscopie RPE impulsionnelle, et notamment de la technique de 'Double Electron – Electron Resonance'

(DEER),⁶ le SDSL-EPR permet de mesurer des distances inter-sonde, dans la gamme de 1,5 à 8,0 nm (Figure 3). Ainsi, cette approche est capable de fournir des distributions de distances inter-sondes dans le cas de protéines doublement marquées ou de deux protéines mono-marquées en interaction et constitue une source d'information précieuse

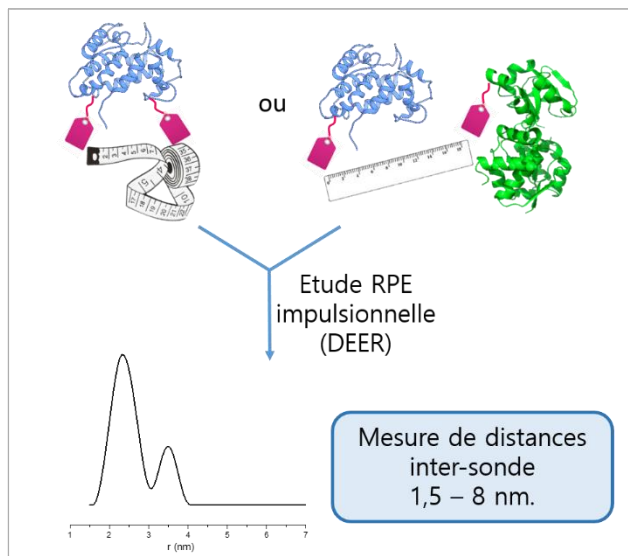


Figure 3 : Illustration d'une expérience type de bi-marquage pour mesurer la distance entre deux sondes paramagnétiques.

sur l'organisation et les transformations structurales à longue portée des systèmes protéiques complexes.⁷

Le marquage de spin *in vitro* a en particulier permis des progrès remarquables dans le suivi des changements conformationnels induits par les interactions protéine-protéine, des repliements induits par la liaison avec un partenaire ou encore la localisation de site d'interaction protéine-protéine ou protéine-ligand.⁸

Pour plus de détails sur les potentialités de cette approche vous pouvez lire l'article « Marqueurs de spin : des

espions au cœur des protéines » paru dans L'Actualité Chimique n°443 en Septembre 2019.^{6a}

La méthode de SDSL-EPR bénéficie de nombreux avantages : une grande sensibilité (quelques μL à une concentration de 20-30 μM suffisent à l'acquisition d'un spectre en quelques minutes), la possibilité de travailler à température physiologique, l'absence de limitation de taille du système d'étude et également l'absence de bruit de fond associé à l'ensemble des molécules diamagnétiques, puisque la RPE ne détecte que les espèces paramagnétiques. Ce dernier point revêt une importance particulière dans l'application à des études cellulaires puisqu'elles ne sont pas gênées par le signal de fond élevé provenant des très nombreux composants cellulaires comme on le rencontre dans d'autres techniques. Depuis 2010, avec la volonté d'aborder la complexité du milieu cellulaire et d'accéder à des informations sur la dynamique des protéines à l'échelle moléculaire directement *dans leur habitat*, la communauté RPE a multiplié ses efforts pour le développement d'une approche de marquage de spin adaptée et optimisée à des études directement dans les cellules : la **RPE in cellula**.⁹

2 - La RPE *in cellula* : limitations et solutions

Malgré des succès indéniables, le développement de la « RPE *in cellula* » est encore exploratoire. Les travaux publiés démontrent actuellement la faisabilité de l'approche et soulignent en même temps les verrous à lever.

2.1 - Bioréduction des sondes

Une limitation majeure est liée au fait que le milieu réducteur du cytoplasme conduit à une perte rapide du caractère paramagnétique des sondes commerciales de type nitroxyde et donc à la disparition du signal RPE. En effet, dans le cytoplasme, la présence d'antioxydants et d'espèces réductrices (ascorbate, glutathion et radicaux semi-quinones notamment) et d'enzymes (thiorédoxine et d'autres enzymes contenant des groupements sulfhydryl) induit une réduction rapide du nitroxyde en hydroxylamine, espèce diamagnétique et donc silencieuse en RPE (Figure 2A).

Jusqu'à il y a peu, il n'existait aucun nitroxyde pour le marquage de spin résistant à la réduction cytoplasmique, ce qui excluait des études cinétiques à température ambiante par exemple. Récemment, grâce à une collaboration entre notre laboratoire (BIP, Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR7281, CNRS et Aix-Marseille Université à Marseille) et l'équipe du Pr. O. Ouari (ICR, Institut de Chimie Radicalaire, UMR7273, CNRS et Aix-Marseille Université à Marseille), nous avons synthétisé une nouvelle sonde nitroxyde protégée de la bioréduction par des groupements éthyle sur le carbone α de la fonction aminoxyde (nitroxyde **1**, M-TETPO, Figure 4).

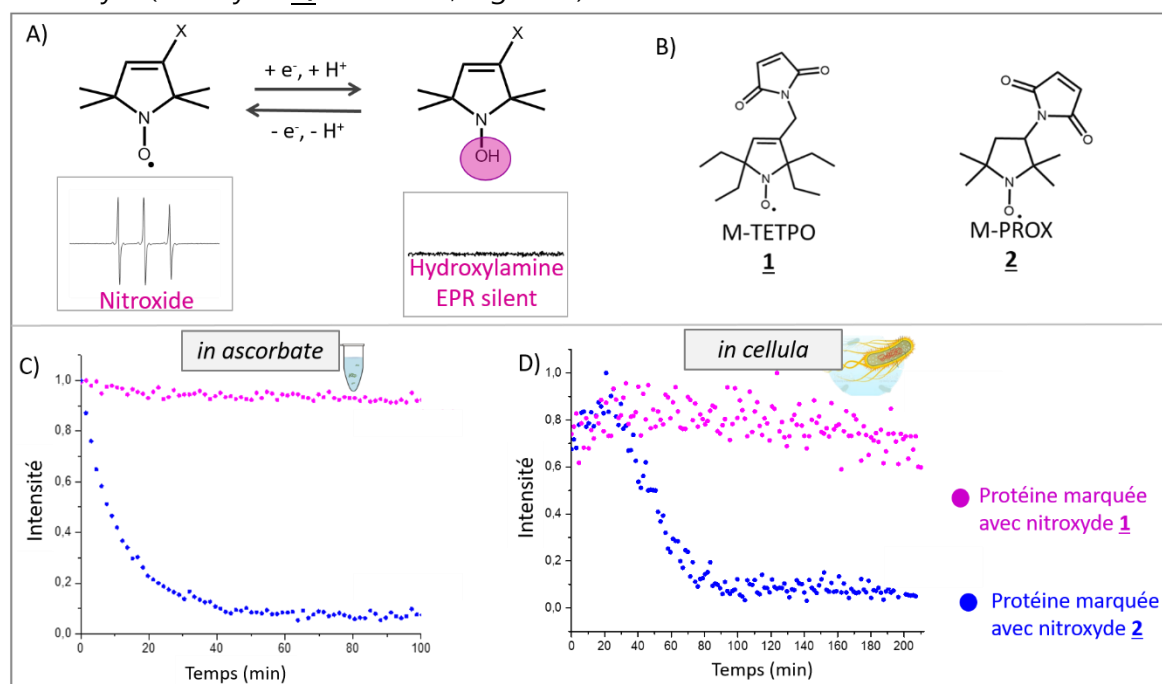


Figure 4 : A) Réaction de réduction d'un nitroxyde en son dérivé diamagnétique, une hydroxylamine. B) Structure d'une sonde paramagnétique de type nitroxyde résistante à la bio-réduction « M-TETPO » **1** et d'une

sonde commerciale sensible à la réduction Maleimido-Proxyl « M-PROX », 2, (sonde commerciale). Profils de réduction obtenus en mesurant l'amplitude du signal RPE au cours du temps pour une même protéine marquée soit avec le marqueur « M-TETPO » (1, magenta) soit avec « M-PROX » (2, bleu) C) dans une solution d'ascorbate et D) dans des cellules d' *E. coli*.

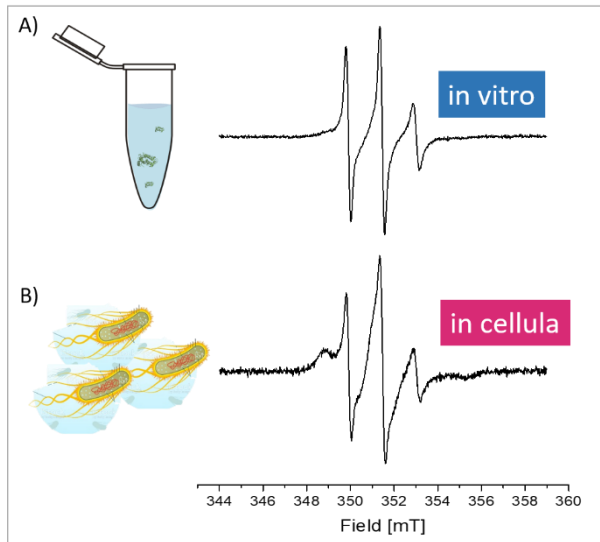


Figure 5 : Illustration d'un changement spectral d'une protéine marquée en une situation *in vitro* et *in cellula*. Spectres RPE à température ambiante obtenus pour la protéine NarJ marquée avec M-TETPO (1) (A) Tris 50mM et (B) électroporée dans des cellules de *E. coli*. L'élargissement du spectre témoigne d'un environnement plus contraint de la sonde en milieu cellulaire.

Les performances de résistance vis-à-vis de la bio-réduction de la nouvelle sonde (1) ont été testées *in vitro* et *in cellula*. La figure 4C montre le profil de réduction du nitroxyde 1 (« M-TETPO », Figure 4B), et de son analogue commercial (« M-Prox », 2, Figure 4B) greffés sur une protéine modèle (NarJ)¹⁰ en présence d'ascorbate, utilisé comme agent réducteur. Les profils de réductions ont été obtenus à température ambiante en suivant l'intensité de la raie centrale du signal RPE du nitroxyde en fonction du temps (Figure 4C-D). Après 18 minutes, la moitié du signal du nitroxyde 2 a disparu, alors que la nouvelle sonde 1 enregistre une très faible perte de signal (4%). Après 50 minutes, le résultat est encore plus

spectaculaire avec la disparition complète du signal de la sonde commerciale alors que 90% du signal du nouveau marqueur est toujours observable. Nous avons ensuite étudié le profil de réduction des nitroxydes 1 et 2 directement dans des cellules bactériennes intactes (*E. coli*, Figure 4C). A nouveau, les résultats obtenus démontrent que ce nouveau marqueur 1 présente des performances de résistance améliorées par rapport aux nitroxydes classiques.

Le développement de la sonde « bio-résistante » 1 a ouvert la possibilité d'observer la dynamique structurale de plusieurs protéines directement dans leur habitat, la cellule. En particulier, la figure 5 présente les spectres RPE d'une protéine bactérienne (NarJ)¹⁰ chez *E. coli* marquée avec M-TETPO (1) obtenus *in vitro* (Tris 50mM) et dans les cellules bactériennes.

Les formes spectrales obtenues apparaissent très différentes : le spectre *in vitro* est caractéristique d'un nitroxyde ayant un régime de mobilité très rapide, similaire à celui observé pour des protéines ou des régions désordonnées. Dans les cellules, la forme du

spectre indique un changement d'environnement du nitroxyde. En effet, le spectre RPE est plus « large » que le spectre RPE *in vitro* indiquant une réduction de la mobilité de la sonde M-TETPO. Nous démontrons ainsi que le milieu intracellulaire contraint davantage la sonde, ce qui semble indiquer une structuration locale de la région d'étude induite par l'environnement intracellulaire.

2.2 - Incorporation des protéines marquées dans les cellules

Une autre limitation actuelle de la RPE *in cellula* concerne l'efficacité de la méthode d'incorporation de la protéine marquée dans les cellules d'intérêt. En effet, après le marquage, la protéine doit être introduite dans les cellules d'intérêt. Plusieurs méthodes ont été proposées et sont en cours d'expérimentation et d'optimisation sur différents types cellulaires : la micro-injection qui est bien adaptée à des cellules de grande taille (~1 mm) comme les ovocytes de *X. laevis* ou, pour des cellules plus petites (~50 µm pour des cellules humaines, ~2 µm pour des cellules de bactéries) l'incorporation par déstabilisation réversible de la membrane cellulaire via un choc osmotique ou un choc électrique (électroporation). Une approche alternative, récemment proposée par le groupe de S. Un et L. Tabares (I2BC, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, UMR 9198 à Saclay), est basée sur la biosynthèse de la protéine marquée directement dans les cellules. Celle-ci consiste à insérer, par manipulation génétique, dans la séquence de la protéine d'intérêt un ou plusieurs groupes d'acides aminés capables de coordonner spécifiquement un ion métallique paramagnétique pouvant alors servir de sonde. Dans cette étude,¹¹ le groupe d'acides aminés (YIDTNNDGWIEGDEL) a été inséré aux deux extrémités d'une protéine modèle. En particulier, il permet de lier spécifiquement des ions lanthanides trivalents via les résidus suivants : aspartate (D), glutamate (E), asparagine (N) et tryptophane (W). La protéine modifiée a été produite directement dans des cellules bactériennes (*E. coli*) et, en modulant les conditions de culture avec l'ajout du sel GdCl₃, des ions Gd(III) (spin électronique S= 7/2) ont ainsi été incorporés aux deux extrémités de la protéine modèle. Des mesures de distance entre Gd³⁺-Gd³⁺ ont pu être réalisées via RPE impulsionnelle (DEER) à haute fréquence (bande W, 94 GHz). Malgré la faible intensité des signaux, les auteurs ont pu mesurer la distribution de distance entre les deux ions Gd(III) directement *in cellula* et comparer ces résultats aux données *in vitro*.¹¹

3 - Conclusion

Les exemples présentés dans cet article montrent que la RPE *in cellula* est une approche en plein essor et dont la faisabilité pour des études structurales dans l'environnement cellulaire a été démontrée. Bien entendu, il reste encore du chemin à faire et des

développements méthodologiques et techniques sont encore nécessaires. En particulier, dans un futur proche, nous pensons qu'il est nécessaire d'orienter une partie des efforts vers la conception de sondes paramagnétiques et d'acides aminés non naturels paramagnétiques caractérisés par des propriétés chimiques améliorées (par exemple, concernant leur stabilité dans l'environnement cellulaire) et par des signatures spectroscopiques différentes. Egalement, des efforts doivent être déployés afin de rendre possible l'étude *in cellula* des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand. Évidemment, les questions concernant la viabilité cellulaire et la localisation précise des protéines d'intérêt doivent également faire l'objet d'études expérimentales.

En élargissant le regard sur d'autres techniques permettant également ce type d'études structurales au niveau cellulaire, notamment la RMN et la Fluorescence, on comprend rapidement que toutes ces approches ont le potentiel de renouveler profondément l'étude des transitions structurales des biomolécules. En effet, ce type d'approches se situe dans un domaine actuellement très actif de la Biologie Structurales qui pourrait ainsi fournir des éléments fondamentaux pour comprendre le fonctionnement de la cellule et avoir un impact dans les développements biomédicaux actuels. Combiner ces techniques complémentaires est très certainement une voie à explorer dans le futur.

-
- ¹ B. D. Bennet, E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J Van Dien, J. D. Rabinowitz *Nat. Chem. Biol.* **2009** *5*, 593.
- ² a) F.-X. Theillet, A. Binolfi, T. Frembgen-Kesner, K. Hingorani, M. Sarkar, C. Kyne, C. Li, P. B. Crowley, L. Gierasch, G. J. Pielak, A. H. Elcock, A. Gershenson, P. Selenko *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6661. b) *Mol Cell Endocrinol* **2019**, *1*, 493, 110469. c) M. Kaplan, A. Cukkemane, G. C. P. van Zundert, S. Narasimhan, M. Daniels, D. Mance, G. Waksman, A. M. J. J. Bonvin, R. Fronzes, G. E. Folkers, M. Baldus, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 649; d) E. Luchinat, L. Banci, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1550.
- ³ a) N. Le Breton, M. Martinho, E. Mileo, E. Etienne, G. Gerbaud, B. Guigliarelli, V. Belle, *Front. Mol. Biosci.* **2015**, *2*, 21. b) W. L. Hubbell, H. S. McHaourab, C. Altenbach, M. A. Lietzow, *Structure* **1996**, *4*, 779–783.
- ⁴ a) B. Joseph, V. M. Tormyshev, O. Y. Rogozhnikova, D. Akhmetzyanov, E. G. Bagryanskaya, T. F. Prisner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11538. b) a) E. H. Abdelkader, M. D. Lee, A. Feintuch, M. R. Cohen, J. D. Swarbrick, G. Otting, B. Graham, D. Goldfarb *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 5016.
- ⁵ a) E. Fournier, E. Mileo, V. Belle, G. Gerbaud, E. Etienne, M. Martinho *L'Actualité Chimique* **2019**, *443*, 13. b) Martinho, M.; Fournier, E.; Le Breton, N.; Mileo, E.; Belle, V. The Royal Society of Chemistry: London, UK, **2019**, *26*, 66.
- ⁶ M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H.W. Spiess *J. Magn. Res.* **2000**, *142*(2), 331.
- ⁷ G. Jeschke, *Emerging Top. Life Sci.* **2018**, <https://dx.doi.org/10.1042/ETLS20170143>.
- ⁸ a) B. Verhalen, R. Dastvan, S. Thangapandian, Y. Peskova, H. A. Koteiche, R. K. Nakamoto, E. Tajkhorshid, H. S. McHaourab, *Nature* **2017**, *543*, 738. b) Giannoulis A., Feintuch A., Barak Y., Mazal H., Albeck S., Unger T., Yang F., Su X. & Goldfarb D. *PNAS* **2020**, *117*, *1*, 395. c) M. Palombo, A. Bonucci, E. Etienne, S. Ciurli, V. N. Uversky, B. Guigliarelli, V. Belle, E. Mileo, B. Zambelli, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5977.
- ⁹ a) A. Bonucci, O. Ouari, B. Guigliarelli, V. Belle, E. Mileo *ChemBioChem* **2020**, *21*, 451. b) A. Nyenhuis, T. D. Nilaweera, J. K. Niblo, N. Q. Nguyen, K. H. DuBay, and D. S. Cafiso *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, *24*, 10715. c) M. Qi, A. Gross, G. Jeschke, A. Godt, M. Drescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15366. d) A. Martorana, G. Bellapadrona, A. Feintuch, E. Di Gregorio, S. Aime, D. Goldfarb, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13458.
- ¹⁰ M. Lorenzi, L. Sylvi, G. Gerbaud, E. Mileo, F. Halgand, A. Walburger, H. Vezin, V. Belle, B. Guigliarelli and A. Magalon, *PLoS One* **2012**, *7*, e49523.
- ¹¹ F. C. Mascali, H. Y. Ching, R. M. Rasia, S. Un, L. C. Tabares, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11041.