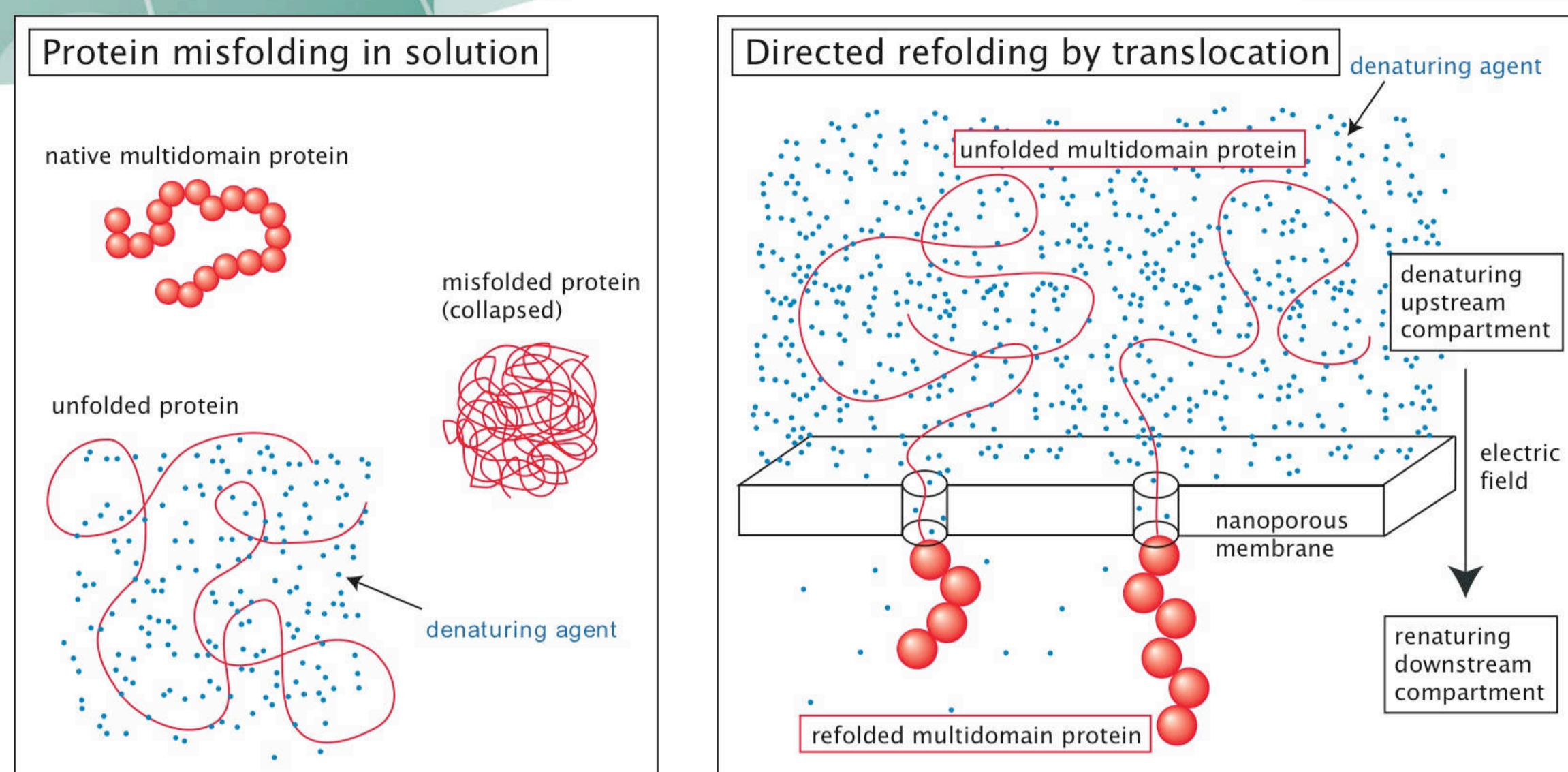


Repliement de protéines et translocation



La compréhension du repliement des protéines est un problème central de la biologie actuelle post-génomique. Le mauvais repliement de certaines protéines est impliqué dans de nombreuses maladies: maladie d'Alzheimer, de Parkinson, encéphalopathie spongiforme bovine, cancer... Par ailleurs, la production de protéines recombinantes s'accompagne souvent de la formation de corps d'inclusion qui sont solubilisés au moyen d'agent dénaturant comme l'urée ou le chlorure de guanidinium. Le repliement *in vitro* de ces protéines se heurtent à de nombreux problèmes en particulier pour les protéines de haute masse moléculaire ou ayant plusieurs domaines structuraux.

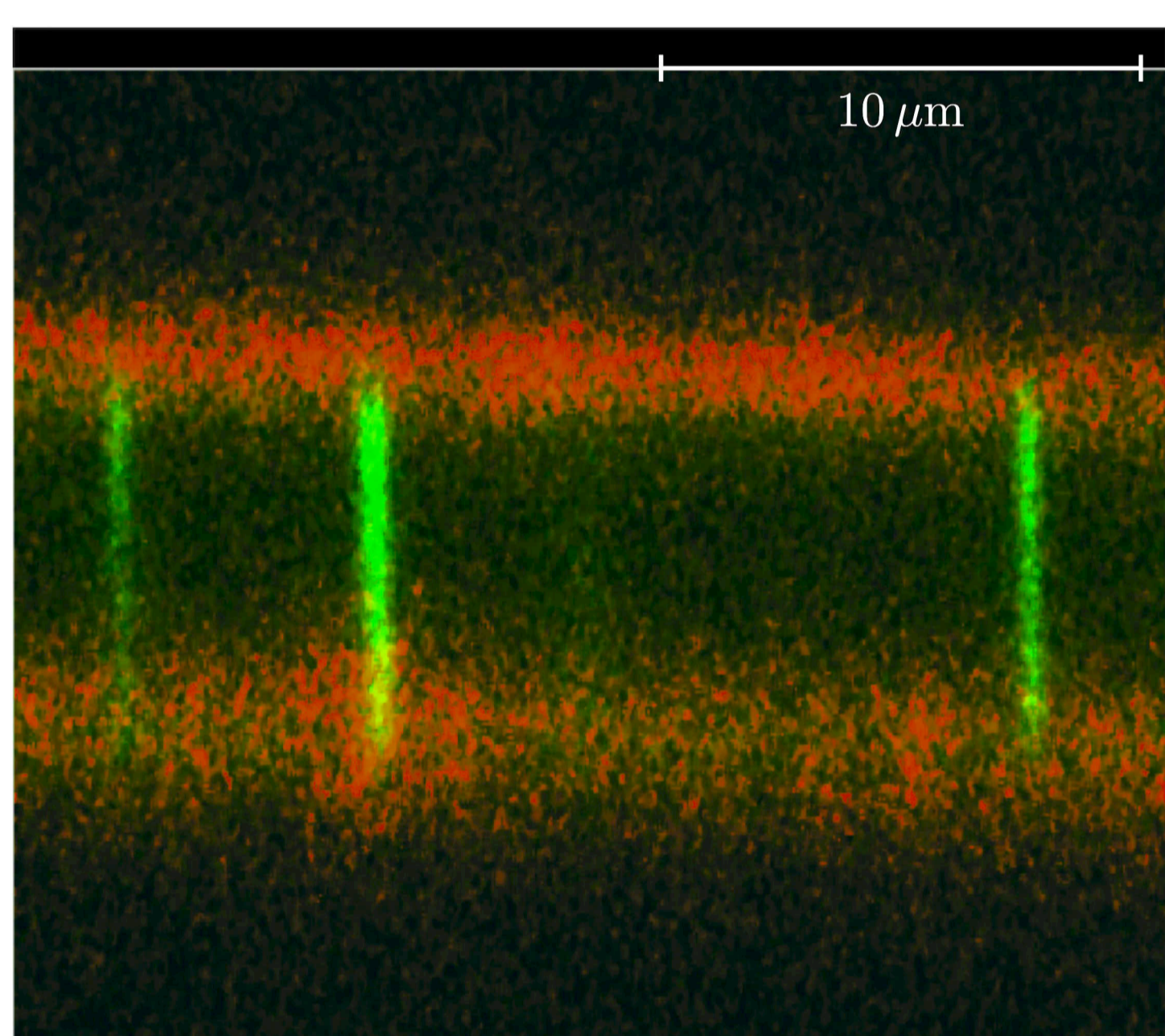
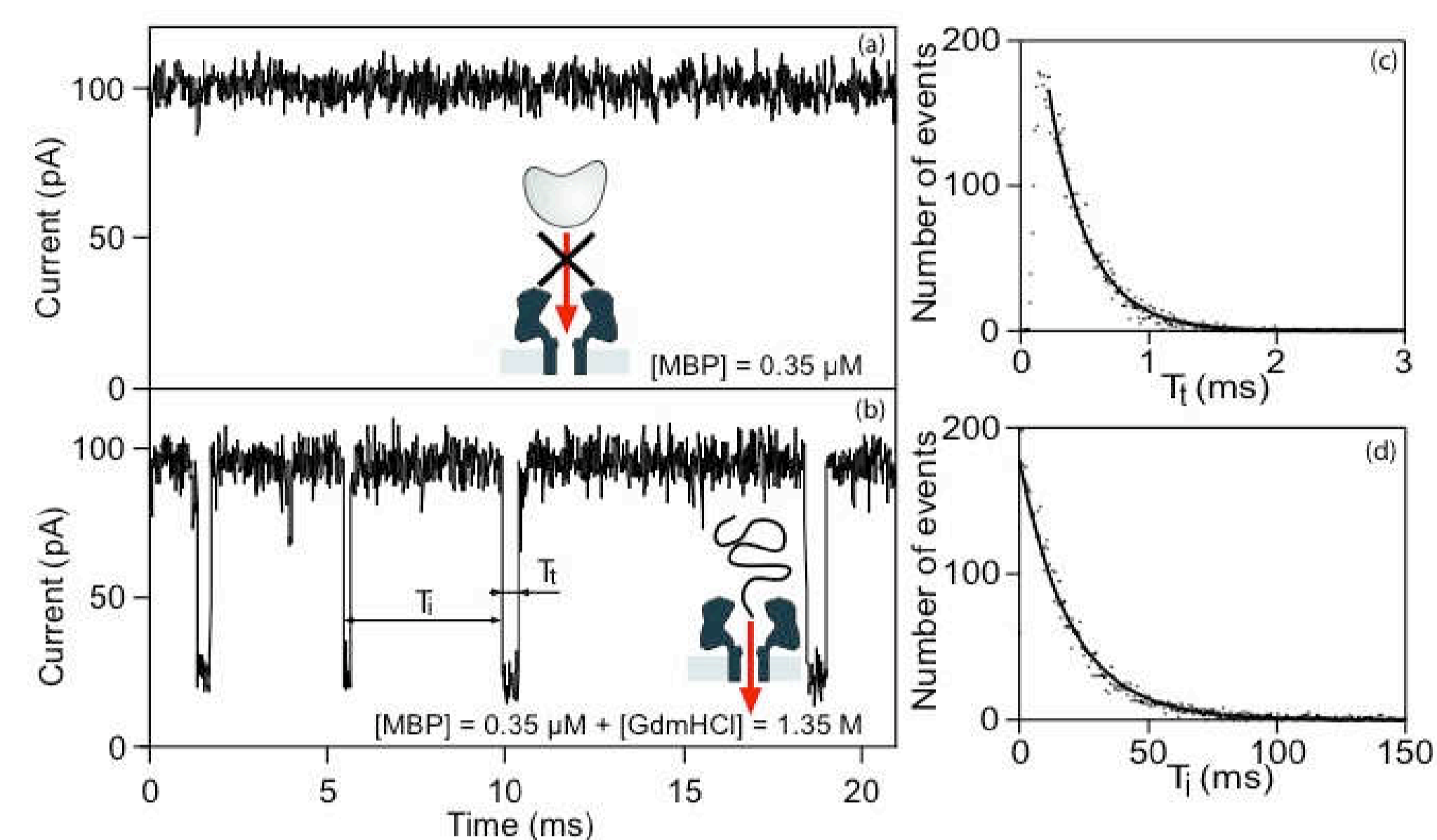
La vision classique du repliement des protéines, représente la molécule évoluant dans un paysage d'énergie conformationnelle qui la guide vers un état de minimum d'énergie. Pour progresser dans la compréhension du repliement, ce paradigme doit être dépassé. En effet, *in vivo*, le repliement des protéines naissantes, ou certains cycles dépliement-translocation-repliement qui sont observés dans la cellule, suggèrent que la notion de repliement séquentiel est fondamentale. Cette notion signifie qu'une extrémité de la chaîne protéique se replie sans avoir "connaissance" du reste de la molécule. **C'est ce point clé que nous tentons de mimer *in vitro*.**

Notre approche consiste à étudier *in vitro* le repliement de protéines en le dirigeant par translocation, à développer les techniques de mesure et de contrôle de la vitesse de translocation et à développer et réaliser les matériaux nanoporeux adaptés à cette application. Pour cela différentes voies sont explorées.

Translocation de protéines dépliées à travers un pore protéique

La translocation des protéines à travers un nanopore unique protéique de 2 nm de diamètre inséré dans une bicouche lipidique est étudiée. Ici le nanopore est l' α -Hemolysin du Staphylocoque doré qui est déjà utilisé pour la translocation de l'AND simple brin. Ce pore unique permet d'utiliser la technique de patch-clamp pour mesurer la fréquence des événements de translocation et leur durée individuelle. La référence 1 décrit la première expérience de ce type réalisée sur une protéine dépliée, la MBP (Maltose Binding Protein), qui présente l'avantage de se déplier à des concentrations faibles en agent dénaturant laissant intact le nanopore protéique. Ce résultat démontre la faisabilité d'une translocation *in vitro* d'une protéine dépliée et ouvre la voie à de nouveaux moyens d'investigation du processus de dépliement-repliement des protéines.

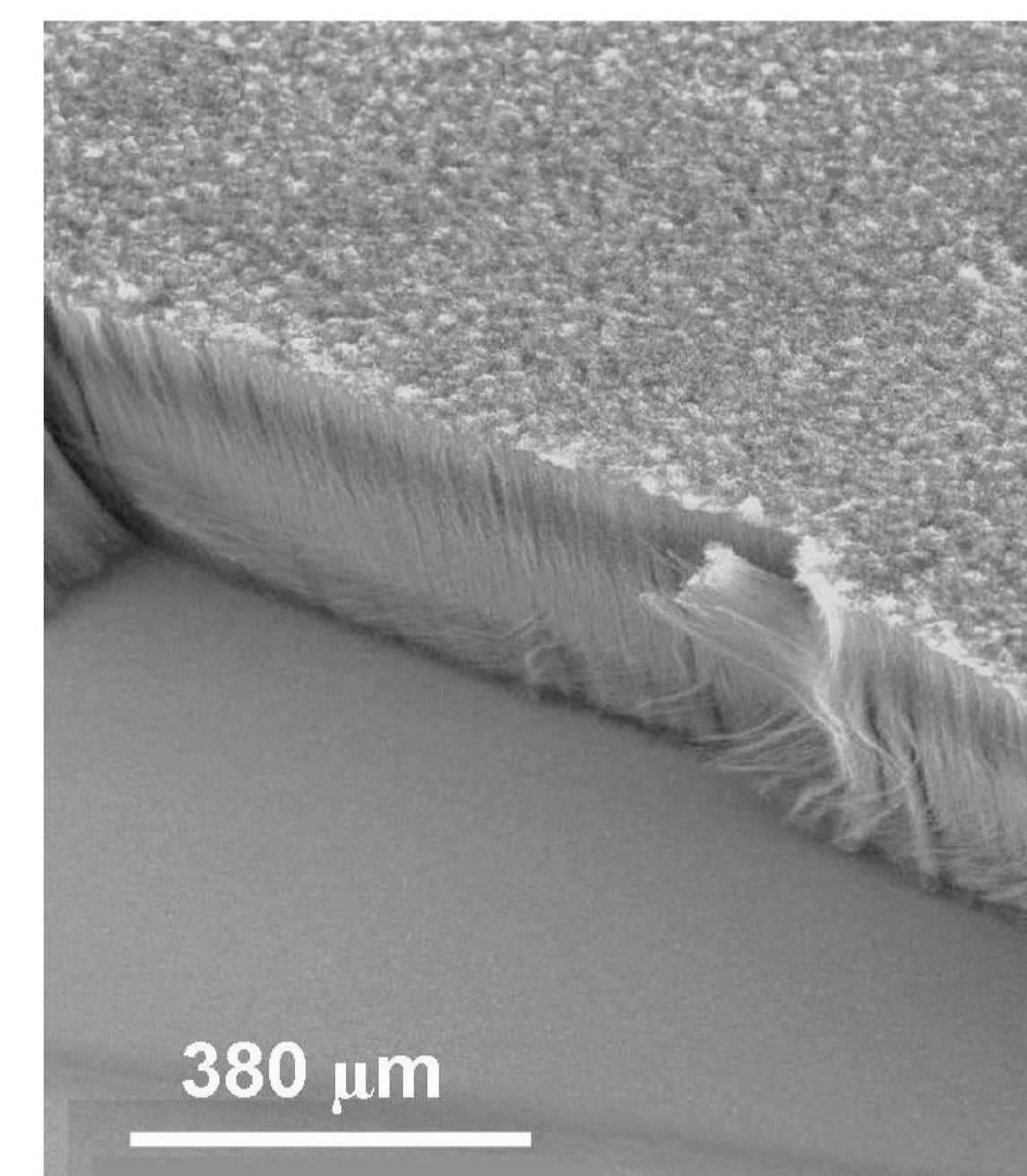
Les courbes représentent le courant ionique à travers l' α -Hemolysin (à 100mV) en présence de 0.35 μ M de MBP native (haut-gauche) ou dépliée par 1.35M de Gdm-HCl (bas-gauche). Lorsque la translocation de la protéine dépliée se produit, le courant chute.



Elaboration de membranes artificielles en PVDF

Une irradiation aux ions lourds de films en PVDF de 9 μ m d'épaisseur puis attaque chimique des traces latentes, permet d'obtenir des membranes nanoporeuses dont les pores parfaitement cylindriques, d'un rayon compris entre 20 et 50 nm, sont caractérisés par DNPA. Récemment, les radicaux encore présents dans la paroi des pores après l'attaque chimique, ont permis un radiogreffage sélectif d'acide polyacrylique sur cette paroi. Cette modification chimique permet ainsi un marquage sélectif et différent des pores et de la surface de la membrane par des molécules fluorescentes. Ces membranes peuvent être imagées par microscopie confocale à balayage laser et permettent d'envisager l'emploi des techniques de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ou FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) pour l'étude de la translocation des protéines.

L'image représente une coupe selon le plan xz d'une telle membrane.



Elaboration de membranes utilisant un tapis de nanotubes de carbone

Les tapis de nanotubes de carbone alignés permettent d'élaborer des composites nanotubes-polymère par imprégnation d'une résine époxyde ou de polystyrène. Un amincissement par polissage du matériau dans la direction perpendiculaire aux nanotubes permet de les ouvrir et d'obtenir des membranes d'une épaisseur de 100 à 200 μ m dans lesquelles les trous centraux des nanotubes forment des pores monodispersés d'un diamètre de l'ordre de 7 nm (éventuellement ajustable). La perméation de ces membranes est optimale (de l'ordre de 10^{10} tubes/cm²) pour la translocation de grande quantité de protéines.

L'image est obtenue par microscopie électronique à balayage d'un tapis de nanotubes de carbones alignés obtenu par dépôt chimique en phase vapeur assisté par un catalyseur (Catalytic Chemical Vapor Deposition) d'un aérosol toluène/ferrocène (d'après M. Pinault *et al.*, Nano Lett., 5, 12, 2394-2398 (2005)).

Références

- 1) G. Oukhaled, J. Mathé, A.-L. Bianco, L. Bacri, J.-M. Betton, D. Lairez, J. Pelta, L. Auvray. "Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording". Submitted for publication in Phys. Rev. Lett.
- 2) O. Cuscito, M.-C. Clochard, S. Esnouf, N. Betz, D. Lairez. "Nanoporous PVDF membranes with selectively functionalized pores". Submitted for publication in Nuclear Instr. Meth. Phys. Res. B
- 3) S. Barrau, M. Mayne-L'Hermite, D. Lairez, C. Reynaud. "Control of aligned carbon nanotubes synthesis parameters for elaboration of nanoporous membranes". Submitted for publication in Chem. Phys. Lett.

¹ Laboratoire Léon Brillouin, CEA-CNRS UMR-12, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

² Groupe microenvironnements et comportements cellulaires, Université de Cergy-Pontoise, 95302 Cergy-Pontoise, France.

³ Laboratoire Matériaux Polymères aux Interfaces, CNRS-UMR 7581, Université d'Evry, 91025 Evry, France

⁴ LSI, Ecole Polytechnique, CEA-DSM, CNRS, 91128 Palaiseau cedex, France

⁵ Laboratoire Francis Perrin, URA-2453, DSM/DRECAM/SPAM, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

⁶ Service de Physique de l'Etat Condensé, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

⁷ Unité de repliement de protéines, Biochimie Structurale, CNRS-URA 2185, Institut Pasteur 75724