



Détermination de la structure tridimensionnelle du mutant S175R de la lécithine rétinol acyltransférase humaine tronquée par résonance magnétique nucléaire

Mémoire

Marie-Ève Gauthier

Maîtrise en biochimie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Marie-Ève Gauthier, 2019

Résumé

La lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) est une protéine importante dans le cycle visuel des rétinoïdes. On la retrouve dans l'épithélium pigmentaire rétinien et elle permet l'estérification du tout-*trans* rétinol en tout-*trans* rétinyl ester, une étape importante dans le processus de régénération du chromophore de la rhodopsine, le 11-*cis* rétinol. Le mécanisme d'activité enzymatique n'a pas encore été élucidé mais des résidus essentiels à la catalyse ont été identifiés (H60, H72, Y154 et C161). De plus, des mutations de substitution dans la séquence de la LRAT mènent à la dégénérescence des photorécepteurs et à des maladies de l'œil telles que l'amaurose congénitale de Leber et la rétinite pigmentaire. L'objectif de ce projet de maîtrise consistait à déterminer la structure tridimensionnelle d'une forme tronquée et non-acylée de la LRAT (C161S/C168S-tLRAT), en plus de la mutation S175R qui a été trouvée chez un patient atteint de dystrophie rétinienne (C161S/C168S/S175R-tLRAT). La structure tridimensionnelle (3D) obtenue par résonance magnétique nucléaire (RMN) dans le cadre de ces travaux est composée d'hélices- α et de pelote statistique. Contrairement aux modèles de prédiction, aucun feuillet- β n'est présent. De plus, cette structure 3D a permis d'observer la proximité entre la mutation S175R et certains résidus catalytiques (C161 et C168) dans le repliement de la protéine, ce qui a permis de soulever des hypothèses concernant l'effet de la mutation sur l'activité enzymatique de la LRAT. Par contre, la validité de la structure 3D obtenue doit être remise en question. En effet, en raison de la très grande concentration de détergent (SDS > 100mM), le RMSD (*root-mean-square deviation*) des 20 structures obtenues est très élevé en conséquence de la présence de micelles de SDS, ce qui résulte en une forme non-native et inactive de la protéine.

Table des matières

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	ix
Introduction	1
I.1 L'œil.....	1
I.2 La rétine	2
I.2.1 Les photorécepteurs	2
I.2.2 L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)	4
I.3 Les disques des bâtonnets et la rhodopsine.....	4
I.4 Le cycle visuel des rétinoïdes	5
I.5.1 Le mécanisme postulé d'activité enzymatique de la LRAT	10
I.5.2 État des connaissances sur l'activité de la LRAT	11
I.5.3 Les maladies reliées à la LRAT	12
Chapitre 1 : Problématique du projet de maîtrise	15
Chapitre 2 : Travaux antérieurs en appui au projet	18
2.1 Clonage, surexpression et purification de la tLRAT	18
2.2 Mesures RMN et attribution des pics	19
2.3 Hétérogénéité de l'échantillon de tLRAT	21
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	27
3.1 Clonage et surexpression de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 ¹⁵ N ¹³ C.....	27
3.2 Purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 ¹⁵ N ¹³ C.....	30
3.3 Préparation de l'échantillon pour la mesure des spectres RMN.....	32
3.4 Utilisation de la RMN pour la détermination de la structure des protéines	33
3.4.1 Théorie de la RMN.....	34
3.4.2 La RMN des protéines.....	41
3.4.3 Attribution des atomes	43
3.4.4 Calcul de la structure des protéines.....	43
Chapitre 4 : Résultats et discussion	46
4.1 Purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 ¹⁵ N ¹³ C.....	46

4.2 Stabilité dans le temps de la C161S/C168S/S175R-tLRAT pour l'enregistrement des spectres RMN.....	46
4.3 Attribution des pics des spectres RMN et conformations mineures.....	52
4.4 Prédiction de la structure secondaire de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 avec <i>TALOS-N</i>	54
4.5 Influence de la mutation S175R sur les déplacements chimiques des atomes de la C161S/C168S-tLRAT	55
4.6 Structure tridimensionnelle de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196.....	61
4.6.1 Influence de la mutation S175R sur la structure de la tLRAT	67
4.7 Comparaison entre la structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT et les modèles de prédiction ainsi que l'influence du SDS dans la structure.....	71
4.7.1 Effet de concentration du SDS par la tLRAT.....	72
4.7.2 Effet du SDS sur la stabilité des protéines	73
4.7.3 Formation de micelles de SDS	75
4.7.4 Effet du SDS sur l'activité enzymatique de la tLRAT	75
Conclusions et perspectives	78
Bibliographie	82
Annexes	90
Figure A1 : Alignement des séquences de la LRAT et de la HRASLS3	90
Figure A2: Corrélations des atomes observés dans les différents spectres	91
Figure A3 : Alignement des séquences de LRAT humaine (hLRAT) et murine (mLRAT)	93
Figure A4 : Scripte pour les calculs avec CYANA	94
Figure A5 : Statistiques structurales à la suite des calculs avec CYANA	95
Figure A6 : Superposition des 20 structures 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT calculées par CYANA	96
Figure A7 : Distances entre la S175R et les résidus T82, V92, G100 et V105	97
Figure A8 : Alignement des structures secondaires de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 (RMN), de la prédiction <i>I-TASSER</i> de la LRAT et de la structure de la HSRASL3/LRAT ..	101
Figure A9 : Courbe standard du SDS à 37 °C pour la détermination de la CMC et la concentration de SDS dans les échantillons RMN	102
Figure A10 : Effet de la concentration de SDS dans le tampon carbonate sur l'activité de la tLRAT 30-196	103

Liste des figures

Figure 1: Schéma de l'œil.....	1
Figure 2: Schéma de la rétine	3
Figure 3: Schéma des photorécepteurs	4
Figure 4: Structure de la rhodopsine et son organisation dans la membrane des disques des bâtonnets	5
Figure 5: Schéma du cycle visuel des rétinoïdes.....	6
Figure 6: Séquence de la LRAT.....	7
Figure 7: Activité enzymatique de la tLRAT et de divers mutants des C161 et C168	9
Figure 8: Schéma du mécanisme d'activité enzymatique de la LRAT	11
Figure 9: Activité enzymatique de la tLRAT et de ses mutants résultant en une dégénérescence des photorécepteurs.....	14
Figure 10: Prédiction de la structure tridimensionnelle de la LRAT par I-TASSER.....	15
Figure 11: Schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine chimère LRAT/HRASLS3 obtenue par cristallographie.....	16
Figure 12: Séquence de la tLRAT-His ₁₀ (30-196)	19
Figure 13: Spectres ¹⁵ N-HSQC de la tLRAT et des mutants naturels retrouvés chez des patients atteints de maladies de l'œil	20
Figure 14: Prédiction de la structure secondaire de la C161S/C168S-tLRAT 31-196 avec TALOS-N.....	21
Figure 15: Migration sur SDS-PAGE de la tLRAT et des mutants C161S, C168S, C161S/C168S et les mutants naturels de la LRAT	22
Figure 16: Attribution des pics de la C161S/C168S-tLRAT dans un spectre ¹⁵ N-HSQC ...	24
Figure 17: Plan du 3D-CCONH de la C161S/C168S/tLRAT pour la P173	25
Figure 18: Spectre ¹⁵ N-HSQC de la tLRAT	25
Figure 19: Spectrométrie de masse des constructions tLRAT 31-196 et 30-196	26
Figure 20: Représentation de la précession de Larmor d'un atome dans un champ magnétique (B ₀).	34
Figure 21: Représentation des niveaux possibles d'énergie pour un noyau où I = ½	35
Figure 22: Représentation de l'effet d'une impulsion sur le champ magnétique (B ₀)	38
Figure 23: Transformée de Fourier.....	38
Figure 24: Représentation du blindage diamagnétique d'un atome	39
Figure 25: Déplacements chimiques de différents groupements présents dans les acides aminés	40
Figure 26: Représentation de l'analyse des spectres 3D	42
Figure 27: Exemple de vue du programme RunAbout de NMRViewJ	44
Figure 28: Gel SDS-PAGE de la purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196	46
Figure 29: Patrons d'électrophorèse SDS-PAGE de la tLRAT au jour 0.....	48
Figure 30: Spectres de masse de la tLRAT au jour 0.....	48
Figure 31: Spectres CD de la tLRAT.....	49
Figure 32: Mesure de l'activité enzymatique de la tLRAT incubée à 25, 35 et 45 °C pendant une période de 4 semaines	50
Figure 33: Patrons d'électrophorèse SDS-PAGE de la tLRAT au jour 0	51
Figure 34: Mesures d'activité enzymatique de la tLRAT incubée à 35, 37 et 40 °C pendant une période de 4 semaines	52

Figure 35: Attribution des pics du spectre ^{15}N -HSQC de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196	53
Figure 36: Prédiction de la structure secondaire de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 avec TALOS-N.....	55
Figure 37: Différences entre les déplacements chimiques des atomes ^{15}N des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT	57
Figure 38: Différences entre les déplacements chimiques des atomes des carbonyles (^{13}CO) des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT	58
Figure 39: Différences entre les déplacements chimiques des atomes $\text{C}\alpha$ des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT	59
Figure 40: Différences entre les déplacements chimiques des atomes $\text{C}\beta$ des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT	60
Figure 41: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 déterminée par RMN	62
Figure 42: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196.....	63
Figure 43: Zoom sur les résidus catalytiques de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196.	64
Figure 44: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196.....	65
Figure 45: Zoom montrant les résidus catalytiques C161S et Y154, les cystéines C168S et C182 et des résidus affectés par des mutations naturelles (A106, R109, P173 et S175R)	66
Figure 46: Zoom de la région de la mutation S175R et distance avec les résidus C161S, C168S et C182	67
Figure 47: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196.....	68
Figure 48: Zoom de la région de la mutation S175R et des résidus affectés	69
Figure 49: Zoom de la région de la mutation S175R et distance entre cette mutation et l'atome d'azote du résidu T172	70
Figure 50: Zoom de la région de la mutation S175R et distance entre cette mutation et l'atome d'azote du résidu D177	70
Figure 51: Zoom de la région de la mutation S175R et distance entre cette mutation et l'atome $\text{C}\beta$ du résidu D179	71
Figure 52: Spectres CD de la tLRAT incubée 20 minutes à 20, 70, 90 et 99 °C.....	74

Liste des tableaux

Tableau 1: Séquence des amorces pour les mutagenèses dirigées	28
Tableau 2: Cycles PCR pour effectuer les mutagenèses dirigées.....	28
Tableau 3: Propriétés des noyaux étudiés.....	37

Liste des abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CD	Dichroïsme circulaire
CRBP-I	<i>Cellular Retinol Binding Protein-I</i>
D ₂ O	Oxyde de deutérium
DO	Densité optique
DSS	Acide 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	Acide aminopolycarboxylique
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
FID	<i>Free induction decay</i>
FT	Transformée de Fourier
HRASLS	<i>HRAS like suppressor</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRBP	<i>Interphotoreceptor Binding Protein</i>
LB	Lysogeny broth
LRAT	Lécithine Rétinol Acyltransférase
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PCR	Amplification en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RDH8	<i>Rétinol déshydrogenase 8</i>
RDH11	<i>Rétinol déshydrogénase 11</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	<i>Root-Mean Square Deviation</i>
RPE65	<i>Retinal Pigment Epithelium-Specific 65kDa protein</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
tLRAT	Lécithine rétinol acyltransférase tronquée
WT	Type sauvage (<i>wild type</i>)

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Christian Salesse. Sa confiance et sa patience étaient des éléments clés dans mon cheminement depuis mon stage à l'été 2015 (surtout avec tous les retournements avec le projet de la LRAT). Je ne peux pas être assez reconnaissante pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir soutenue durant toutes ces années.

Par la suite, je voudrais remercier mon co-directeur, Stéphane Gagné, qui a aussi fait preuve de patience afin de montrer à une biochimiste (pas trop penchée sur la bio-informatique) la RMN et à travailler avec des scripts qui à première vue n'étaient que du charabia pour moi.

Mes prochains remerciements sont pour Line Cantin, notre professionnelle de recherche. Le laboratoire ne serait pas le même sans sa motivation inconditionnée et sa passion qui était une grande source d'inspiration.

Merci à l'équipe Salesse : Sarah Bernier, Sarah Roy, Charlotte et Marc-Antoine. Ces années n'auraient pas été les mêmes sans votre soutien, votre bonne humeur et amitié (les dîners, les 5 à 7 ou les soirées jeux avec Marie-Christine ont fait de beaux souvenirs).

Finalement, je voudrais remercier ma famille et mes amies pour leur soutien. Même si je sais qu'ils ne comprenaient pas vraiment ce que je faisais, leurs encouragements étaient toujours présents.

Introduction

I.1 L'œil

La vision est un sens qui est possible grâce à l'œil. Près de 70% des récepteurs sensoriels chez l'être humain y sont situés, ce qui démontre la complexité de cet organe (Tortora 2000). La lumière traverse les différentes structures de l'œil afin de permettre aux photorécepteurs de capter et encoder les images sous forme d'un influx nerveux qui sera traduit par le cerveau (Campbell 2007). L'être humain est capable de voir la lumière émise entre 400 et 700 nm (Marieb 2005).

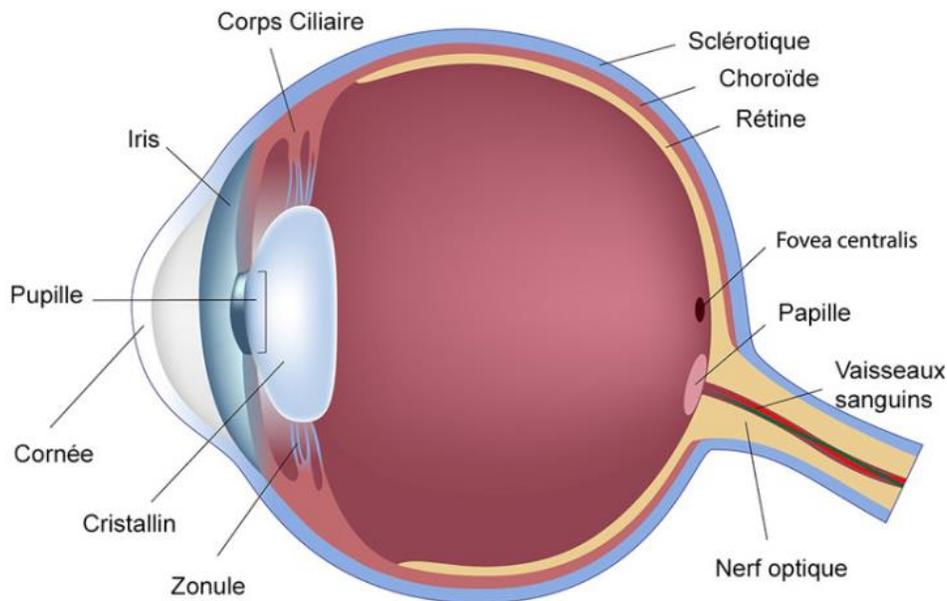


Figure 1: Schéma de l'œil. Image tirée du site internet <http://www.haute-vision.fr/glossaire/>

Chacune des structures de l'œil joue des rôles importants dans la vision (Figure 1). La lumière traverse d'abord la cornée, la composante la plus antérieure de l'œil. Celle-ci est transparente et permet la réfraction et la transmission de la lumière en plus de protéger l'œil (Campbell 2007). Derrière la cornée, se trouve l'humeur aqueuse qui contient tous les nutriments nécessaires au métabolisme de la cornée, puisque cette dernière est non vascularisée (Uematsu, Mohamed et al. 2015). La lumière atteint par la suite l'iris, la partie de l'œil contenant de la mélanine, ce qui lui donne sa couleur. L'iris permet aussi de réguler la quantité de lumière pénétrant l'œil grâce à sa capacité de se contracter et de se dilater, ce qui crée une région de diamètre variable en son centre appelée pupille (Campbell 2007). La

lumière atteint par la suite le cristallin. Cette structure joue le rôle de lentille et permet de faire converger les rayons lumineux sur la rétine. Par la suite, la lumière parvient jusqu'au corps vitré qui forme 80% du volume de l'œil et contient 95% d'eau. Son rôle est de maintenir la rigidité du globe oculaire et la pression intra-oculaire (Angi, Kalirai et al. 2012). La lumière atteint finalement la rétine qui tapisse le fond de l'œil. Celle-ci permet la transformation de la lumière en un signal nerveux qui est ensuite transmis au cerveau par le biais du nerf optique. La conversion du signal lumineux en un signal nerveux est rendue possible grâce à la phototransduction visuelle qui se déroule exclusivement au niveau de la rétine (Rodieck 2003, Levin 2011).

I.2 La rétine

La rétine fait partie du système nerveux central et est connectée au cerveau via le nerf optique (Luo, Xue et al. 2008). Celle-ci est composée de plusieurs types de cellules et est divisée en deux portions: la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La lumière traverse d'abord la partie neurale, qui est composée de cellules nerveuses, dont les cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales, bipolaires, de Müller et photoréceptrices (Figure 2).

Les cellules photoréceptrices permettent la phototransduction, soit la transformation de la lumière en un signal électrique. Elles sont divisées en deux catégories en fonction de leur morphologie et leur rôle: les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets permettent la vision nocturne et périphérique et les cônes sont responsables de la vision centrale et diurne (Campbell 2007). Dans la rétine, il y a plus de 120 millions de bâtonnets et 6 à 7 millions de cônes (Jeon, Strettoi et al. 1998, Rodieck 2003). La rétine est vascularisée à l'exception de la région de la fovéa, où on peut observer un amincissement de ce tissu. Cette partie de la rétine comprend très peu de bâtonnets et la grande majorité des cônes, ce qui permet la vision des détails et des couleurs (Carter-Dawson and LaVail 1979, Salesse 2017). La lumière atteint finalement l'EPR, la partie la plus postérieure de la rétine.

I.2.1 Les photorécepteurs

Tel que mentionné précédemment, deux types de photorécepteurs sont présents dans l'œil: les cônes et les bâtonnets. Les cônes ont besoin de plus de lumière que les bâtonnets pour

être activés. Trois types de cônes sont retrouvés chez l'être humain: vert, bleu et rouge dont le nom correspond à la région du spectre visible à laquelle leur pigment visuel est sensible. Les bâtonnets, présents en plus grand nombre, sont plus sensibles que les cônes et permettent la vision nocturne, mais donnent une image floue et incolore (Campbell 2007).

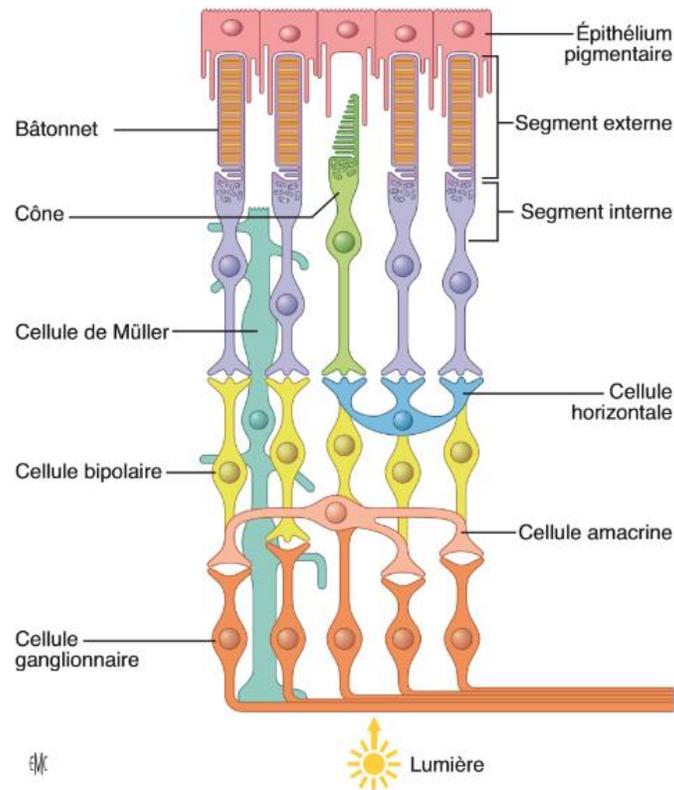


Figure 2: Schéma de la rétine. Ce schéma montre les différentes couches de cellules nerveuses et gliales de la rétine ainsi que l'EPR (Salesse 2017).

Les photorécepteurs possèdent une terminaison synaptique, qui permet leur interaction avec certaines autres cellules nerveuses, un segment interne, qui comprend les organelles impliquées dans le métabolisme, le noyau et un segment externe, où a lieu la phototransduction visuelle (Figure 3). Le cycle visuel des rétinoïdes se déroule à la fois au niveau des bâtonnets ainsi que dans l'EPR (Parker and Crouch 2010, Kiser, Golczak et al. 2012, Saari 2012). Par contre, le cycle visuel des cônes a vraisemblablement deux composantes, une plus lente qui transite par l'EPR et une autre plus rapide, mais moins bien comprise qui implique les cellules de Müller (Schnapf, Nunn et al. 1990, Das, Bhardwaj et al. 1992, Kefalov 2012, Kaylor, Yuan et al. 2013).

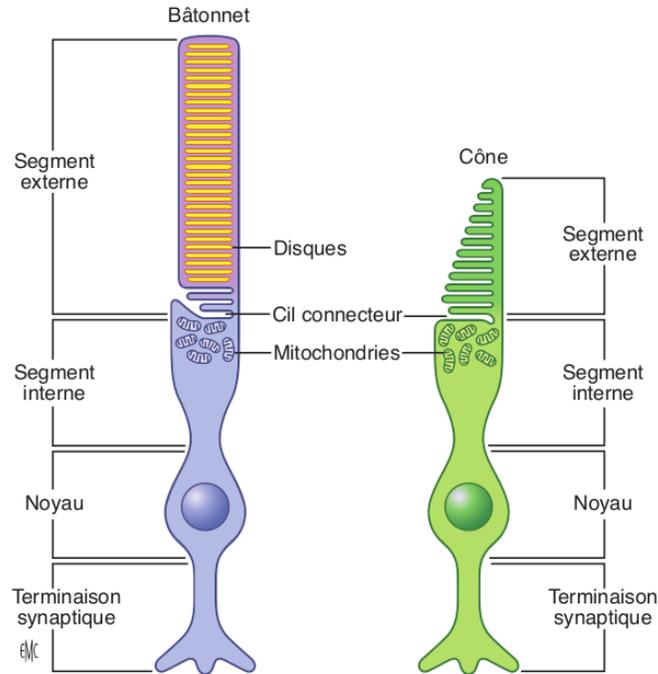


Figure 3: Schéma des photorécepteurs. Les bâtonnets et les cônes sont similaires à l'exception de la morphologie de leur segment externe. Le segment externe des bâtonnets est constitué d'un empilement de disques alors que celui des cônes résulte du repliement de sa membrane plasmique (Salesse 2017).

I.2.2 L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

L'EPR est la partie la plus postérieure de la rétine. Presque toutes les enzymes impliquées dans le cycle visuel des rétinoïdes sont localisées dans les microsomes de l'EPR (Saari and Bredberg 1989, Simon, Hellman et al. 1995, Jin, Li et al. 2005, Parker and Crouch 2010). C'est aussi dans les rétinosomes de l'EPR des mammifères que sont entreposées des molécules de rétinyl ester, une forme stable de la vitamine A (Mata, Tsin et al. 1992). Dans le cycle visuel des rétinoïdes, le rétinyl ester sert de source primaire de vitamine A (rétinol). La vitamine A est aussi emmagasinée sous cette forme dans les cellules stellaires du foie. De plus, l'EPR empêche la réflexion multiple de la lumière dans l'œil grâce à son contenu en mélanine (Ruiz and Bok 2000, Levin 2011).

I.3 Les disques des bâtonnets et la rhodopsine

Le segment externe des bâtonnets est composé d'un empilement de disques (Figure 4). Chaque bâtonnet contient ~2 000 disques et chacun de ces disques contient ~52 000 molécules de rhodopsine (Buzhynskyy, Salesse et al. 2011). La rhodopsine compte pour 95%

des protéines membranaires des disques (Kuhn 1980). Elle est composée d'une protéine transmembranaire contenant sept hélices- α , l'opsine, et d'un chromophore au centre de ces hélices, le 11-*cis* rétinol, qui est lié de façon covalente à la lysine 296 par le biais d'une base de Schiff protonée (Figure 4).

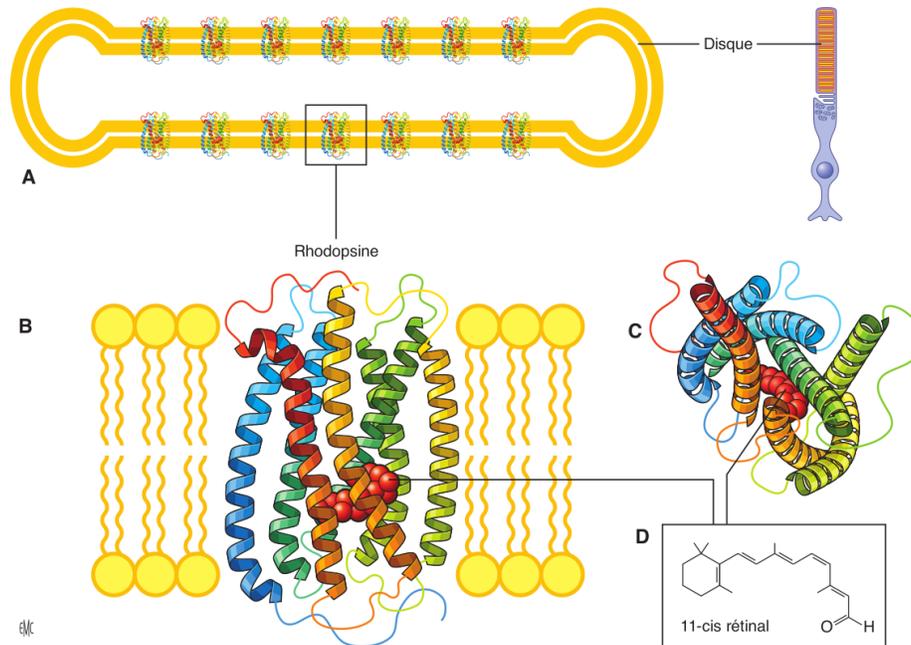


Figure 4: Structure de la rhodopsine et son organisation dans la membrane des disques des bâtonnets. A) Schéma d'un disque de bâtonnet comprenant des molécules de rhodopsine. B) Schéma d'une molécule de rhodopsine dans une membrane de phospholipides d'un disque. C) Structure de la rhodopsine vue du dessus. D) Structure du 11-*cis* rétinol (les tirets montrent sa position dans la structure de la rhodopsine) (Salesse 2017).

I.4 Le cycle visuel des rétinoïdes

Le cycle visuel des rétinoïdes est important dans la vision puisqu'il permet la régénération du chromophore de la rhodopsine suite à l'absorption d'un photon (Figure 5). En effet, l'absorption de la lumière par la rhodopsine résulte en l'isomérisation du 11-*cis* rétinol en tout-*trans* rétinol et un changement conformationnel important de la rhodopsine qui se retrouve dans un état « activé », ce qui met en branle la phototransduction visuelle. Le cycle visuel sert alors à régénérer l'isomère 11-*cis* rétinol afin de permettre à la rhodopsine de retrouver son état initial et d'absorber de nouveau la lumière. Comme mentionné ci-dessus, le cycle visuel se déroule au niveau du segment externe des bâtonnets et des microsomes de

l'EPR et fait intervenir plusieurs enzymes (Parker and Crouch 2010, Kiser, Golczak et al. 2012, Saari 2012, Lhor and Salesse 2014).

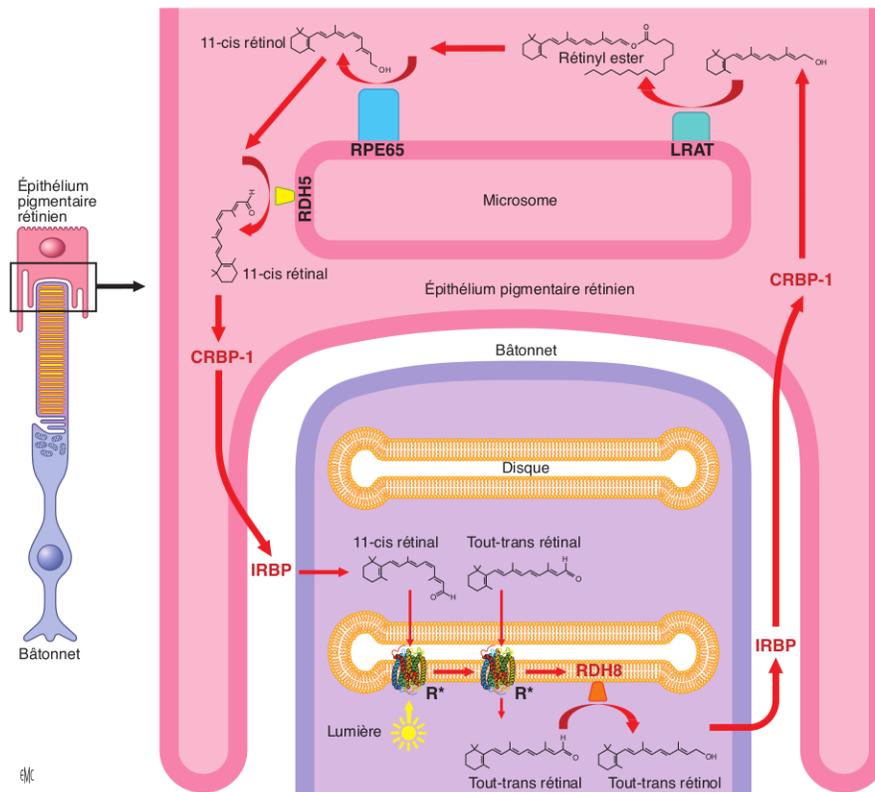


Figure 5: Schéma du cycle visuel des rétinoïdes. Le cycle visuel se déroule à la fois dans les photorécepteurs et dans l'EPR (R, rhodopsine; R*, rhodopsine activée; voir le texte pour la définition de la RDH8, l'IRBP, la CRBP-1, la LRAT, la RPE65 et la RDH11) (Salesse 2017).

La première enzyme intervenant dans le cycle visuel est localisée dans le segment externe des bâtonnets. Il s'agit de la *Rétinol déshydrogénase 8* (RDH8) (Lamb and Pugh 2004, Parker and Crouch 2010, Kiser, Golczak et al. 2012, Saari 2012). La RDH8 permet la réduction du tout-trans rétinol en tout-trans rétinol (Rattner, Smallwood et al. 2000). Par la suite, le tout-trans rétinol est acheminé du segment externe des bâtonnets vers l'EPR via la *Interphotoreceptor Retinol Binding Protein* (IRBP) (Gonzalez-Fernandez, Kurz et al. 1999). Puis, la *Cellular Retinol Binding Protein-1* (CRBP-1) acheminera le tout-trans rétinol dans l'EPR vers la prochaine enzyme du cycle visuel, la *Lécithine Rétinol Acyltransférase* (LRAT) (MacDonald and Ong 1988). La LRAT va transférer une chaîne acyle sur le tout-trans rétinol afin de former le tout-trans rétinyl ester qui sera par la suite transformé en 11-cis rétinol par

la LRAT produit des dérivés rétinoliques au niveau des microsomes, à la suite de son activité acyltransférase, qui peuvent être entreposés dans les rétinosomes de l'EPR (Ross 2003). De plus, il a été observé que l'estérification du rétinol au niveau de l'EPR n'est pas dépendante du co-enzyme A (CoA-indépendante) (Saari and Bredberg 1989). La LRAT est une protéine transmembranaire (Barry, Canada et al. 1989). Son segment N-terminal, qui comprend les acides aminés 5 à 25, et le segment C-terminal, qui inclut les acides aminés 195 à 215, sont hautement hydrophobes, ce qui rend la protéine complète peu soluble (Ruiz, Winston et al. 1999, Moise, Golczak et al. 2007). Il a été postulé que ces segments permettraient l'ancrage de la protéine à la membrane grâce à leur structure en hélice- α qui ont des propriétés similaires de liaison membranaire (Bussieres, Cantin et al. 2012). Cependant, il a été démontré que seulement le segment C-terminal est essentiel pour le ciblage membranaire de la LRAT au réticulum endoplasmique, ce qui soulevait des questions à propos de l'implication du segment N-terminal dans ce processus (Moise, Golczak et al. 2007). Il a aussi été suggéré que la portion centrale de la LRAT formerait une boucle cytoplasmique (Ruiz, Kuehn et al. 2001). De plus, il a été démontré que la LRAT ainsi que la forme tronquée de la LRAT (tLRAT), qui ne comprend pas les segments hydrophobes en C- et N-terminal, peut former des homodimères actifs. Il a été postulé que ces homodimères seraient liés grâce à des interactions hydrophobes (Jahng, Cheung et al. 2002, Bok, Ruiz et al. 2003). Diverses études ont démontré l'implication essentielle de quatre acides aminés dans l'activité enzymatique de la LRAT. Ces acides aminés incluent les histidines en position 60 et 72 (H60 et H72), la tyrosine en position 154 (Y154) ainsi que la cystéine en position 161 (C161) (Ruiz, Winston et al. 1999, Bok, Ruiz et al. 2003, Jahng, Xue et al. 2003, Xue and Rando 2004, Kiser, Golczak et al. 2012). La cystéine en position 168 (C168) aurait quant à elle un rôle secondaire. En effet, en procédant à des tests enzymatiques afin de clarifier l'importance des cystéines de la LRAT, Mondal et *al.* ont démontré, en modifiant les cystéines par des alanines (C161A, C168A, C182A et C208A), que la C161 était le nucléophile essentiel mais que la C168 jouait aussi un rôle en raison d'une perte d'activité de ce mutant. Les autres mutations n'ont eu aucun effet sur l'activité de la LRAT en comparaison avec le type sauvage (WT) (Mondal, Ruiz et al. 2000). Dans notre laboratoire, des mesures d'activité enzymatique faites avec les mutants C161S, C168S, C161S/C168S et C161A/C168A (Figure 7) concordaient avec les conclusions de Mondal et *al.*, où la C161 joue un rôle important dans

la catalyse en raison de la baisse très importante de l'activité du mutant C161S (0,54 % d'activité résiduelle comparativement à la protéine non mutée). De plus, la mutation C168S confirme que la C168 joue un rôle secondaire dans l'activité enzymatique de la LRAT.

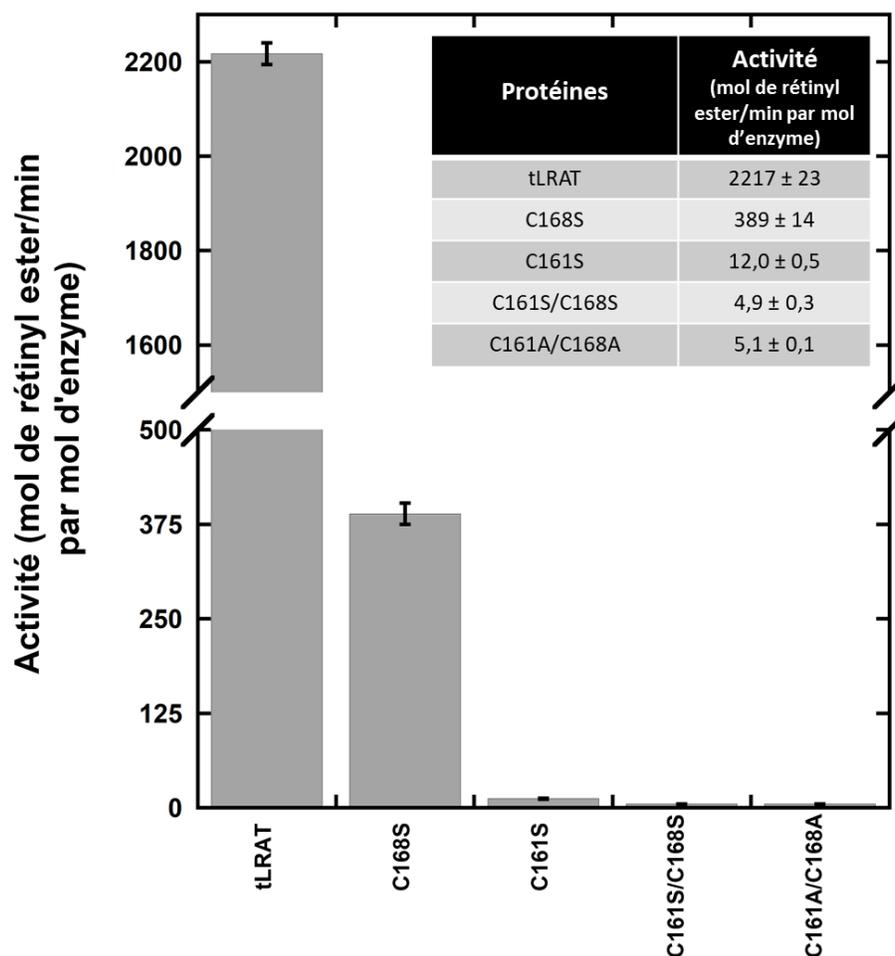


Figure 7: Activité enzymatique de la tLRAT et de divers mutants des C161 et C168. La mutation C168S mène à une perte importante de l'activité mais il reste toutefois une importante activité résiduelle, indiquant qu'elle joue un rôle secondaire dans l'activité de la LRAT. La mutation C161S mène à une perte très importante de l'activité, indiquant le rôle majeur de cette cystéine dans la catalyse. Les doubles mutants C161S/C168S et C161A/C168A démontrent une baisse très importante de l'activité enzymatique comparativement à la tLRAT non mutée, indiquant l'importance de ces cystéines dans l'activité enzymatique de la LRAT.

En effet, son activité chute de 82% (18% d'activité résiduelle comparativement à la protéine non mutée). Finalement, les doubles mutants C161S/C168S et C161A/C168A démontrent une perte d'activité enzymatique un peu plus importante que la mutation C161S seule,

indiquant qu'il pourrait y avoir un processus de coopérativité entre ces deux cystéines (0,22 et 0,23% d'activité résiduelle, respectivement). L'observation d'une activité résiduelle des doubles mutants suggère qu'une autre cystéine pourrait aussi contribuer de façon secondaire au mécanisme d'activité enzymatique.

Comme montré par Bok *et al.* (2003), il a été impossible jusqu'à maintenant de surexprimer la LRAT complète chez les procaryotes (voir section 2.1 pour plus de détails). Ainsi, la première méthode fiable et simple de mesure de l'activité enzymatique de la LRAT a été mise au point par notre équipe de recherche avec une forme tronquée de la LRAT (tLRAT) qui comprend les acides aminés 31-196 (Horchani, Bussieres et al. 2014). Cette méthode est basée sur la mesure de la production du tout-*trans* rétinyl ester (voir section I.5.1) par chromatographie HPLC.

I.5.1 Le mécanisme postulé d'activité enzymatique de la LRAT

À ce jour, le mécanisme d'activité enzymatique de la LRAT n'a pas encore été élucidé en détail. Cependant, le processus postulé a été divisé en trois étapes selon un mécanisme ping-pong bi-bi (Figure 8) (MacDonald and Ong 1988, Shi, Furuyoshi et al. 1993, Xue and Rando 2004, Golczak and Palczewski 2010, Bussieres, Cantin et al. 2012). La LRAT non-acylée va d'abord hydrolyser la chaîne acyle en position sn-1 d'un phospholipide. La LRAT utilise cette chaîne acyle afin de former un lien thioester avec sa C161. La LRAT est alors sous la forme acylée (Golczak and Palczewski 2010). Cette première étape correspond à l'activité phospholipase A1 (voir étape 1, Figure 8). La LRAT montre une préférence pour les chaînes acyles suivantes : le palmitate (57%), le stéarate (25%) et l'oléate (10%) (Futterman and Andrews 1964). Puis, la LRAT va transférer cette chaîne acyle au tout-*trans* rétinol afin de former le tout-*trans* rétinyl ester. Il s'agit de l'activité acyltransférase (voir étape 2, Figure 8). Dépendamment des besoins, le tout-*trans* rétinyl ester sera soit entreposé dans les rétinosomes de l'EPR ou acheminé à la prochaine enzyme du cycle visuel des rétinoïdes, la RPE65 (Saari 2000). La LRAT se retrouve alors de nouveau sous la forme non-acylée (voir étape 3, Figure 8) et peut recommencer un nouveau cycle.

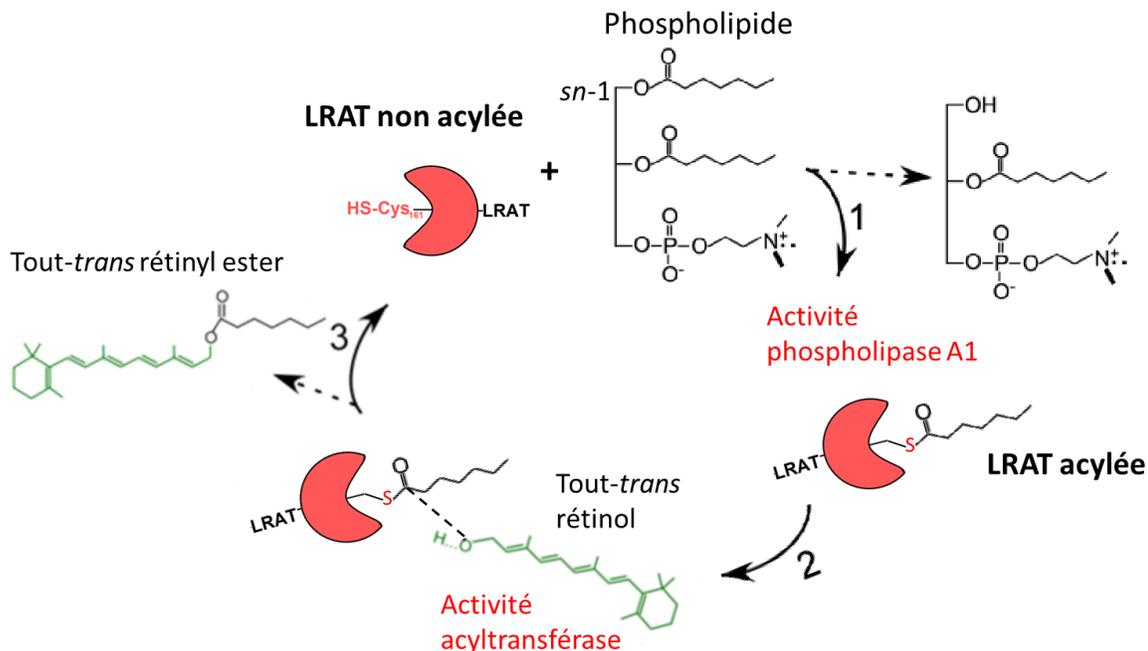


Figure 8: Schéma du mécanisme d'activité enzymatique de la LRAT. Schéma préparé par S. Gagné, H. Horchani et C. Salesse. Les étapes 1 et 2 sont décrites dans le texte.

I.5.2 État des connaissances sur l'activité de la LRAT

Il a été originalement observé que l'activité d'estérification de la vitamine A dans l'EPR avait lieu à un pH alcalin (Berman, Horowitz et al. 1980). Des mesures avec une enzyme partiellement purifiée suggèrent que la LRAT montre une affinité plus importante pour la phosphatidylcholine (Canada, Law et al. 1990). Il a par la suite été montré que la tLRAT a un maximum d'activité à pH 9,2 (Horchani, Bussières et al. 2014). De plus, son activité diminue énormément avec la longueur de la chaîne acyle des phospholipides (Golczak and Palczewski 2010, Horchani, Bussières et al. 2014). En effet, l'activité la plus élevée de la tLRAT a été observée avec un phospholipide contenant des chaînes acyles de 7 carbones, le diheptanoyl phosphocholine ($2\,426 \pm 216$ mol de rétinyle ester/min par mol de tLRAT), ce qui correspond à une activité 57 000 fois plus élevée que la haute valeur rapportée dans la littérature (Horchani, Bussières et al. 2014). Cette valeur est presque 57 fois plus élevée que l'activité mesurée en présence de dipalmitoyl phosphocholine (C16:0) ou de dioleoyl phosphocholine (C18:1) ($46 \pm 0,5$ mol de rétinyle ester/min par mol de tLRAT) qui sont les phospholipides retrouvés en plus grande quantité dans les membranes de l'EPR (Gulcan,

Alvarez et al. 1993). L'efficacité catalytique de la tLRAT est tellement élevée ($k_{cat}/K_m \sim 7,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que la LRAT pourrait potentiellement hydrolyser rapidement et ainsi endommager les membranes des microsomes de l'EPR. Cependant, étant donné la biodisponibilité limitée du tout-*trans* rétinol, il est probable que la formation de la tLRAT acylée met fin à l'activité catalytique jusqu'à ce que le tout-*trans* rétinol devienne disponible. Il est intéressant de comparer les valeurs d'activité de la tLRAT avec celles obtenues avec la LRAT complète partiellement purifiée qui a été produite chez les eucaryotes. En effet, l'activité est de 0,00017 μmol de rétinyl ester / min par μg de protéine à pH 9,0 en utilisant le dipalmitoyl phosphocholine comme substrat (Shi, Furuyoshi et al. 1993) est beaucoup plus faible que l'activité de 2 200 μmol de rétinyl palmitate/min par μg de la tLRAT mesurée avec le même phospholipide et au même pH. Même si la LRAT complète était seulement partiellement purifiée, son activité est plus de $1,3 \times 10^6$ fois plus faible que celle de la tLRAT. Ces données permettent donc de postuler que les segments en N- et C-terminal de la LRAT contribuent peu à son activité enzymatique et que la tLRAT représente un bon modèle pour caractériser ses propriétés structurales.

I.5.3 Les maladies reliées à la LRAT

Grâce à des études avec des souris knockout, il a été démontré que l'absorption des rétinoïdes était grandement affectée en absence de LRAT, menant à une déficience en vitamine A comparativement aux souris de type sauvage (WT) (Liu and Gudas 2005, O'Byrne, Wongsiriroj et al. 2005). L'activité de la LRAT est aussi modifiée dans certaines maladies dont le cancer (Andreola, Giandomenico et al. 2000). En effet, il a été démontré que le niveau de formation de rétinyl ester diffère dans différents types de cancer et une baisse significative de l'expression de la LRAT a été observée au niveau du cancer de la vessie (Simmons, Andreola et al. 2002, Boorjian, Tickoo et al. 2004), du sein (Sheren-Manoff, Shin et al. 2006) et de la prostate (Guo, Knudsen et al. 2002).

Des mutations dans la séquence protéique de la LRAT ont été recensées chez des patients atteints de maladies de l'œil liées à la dégénérescence des photorécepteurs (Figure 6). Ces maladies incluent la rétinite pigmentaire et l'amaurose congénitale de Leber. La rétinite pig-

mentaire est un ensemble de maladies caractérisées par la perte de la vision nocturne et périphérique et ensuite de la vision centrale (Koenekoop, Loyer et al. 2003, Stone 2007). Dans les pays développés, la prévalence varie entre 1 / 3 500 et 1 / 4 000 et peut être héréditaire. La rétinite pigmentaire peut être héréditaire de façon autosomale dominante (30 à 40% des cas), autosomale récessive (50 à 60% des cas) et liée au chromosome X (5 à 15% des cas) (Chassine, Bocquet et al. 2015). L'amaurose congénitale de Leber est caractérisée par la dégénérescence ou la dysplasie de la rétine (Porto, Jones et al. 2017). Il s'agit de la cause majeure de cécité chez les jeunes enfants. Des délétions de paires de bases ainsi que des mutations au niveau du gène de la LRAT ont été recensées. Les délétions de paires de bases ont été recensées par plusieurs équipes de recherche chez des patients atteints de rétinite pigmentaire et d'amaurose congénitale de Leber (Thompson, Li et al. 2001, Senechal, Humbert et al. 2006, Collin, van den Born et al. 2011, Littink, van Genderen et al. 2012, Wang, Wang et al. 2013, Scholl, Moore et al. 2015). Ces délétions mènent à des protéines incomplètes en raison de changements du cadre de lecture, ce qui mène à des codons stop prématurés. La majorité des protéines ainsi produites sont totalement inactives, principalement en raison de l'absence des acides aminés essentiels à la catalyse. Récemment, une mutation au niveau d'un intron, menant à des modifications dans l'épissage, a été dépistée (Chen, Huang et al. 2018). Les mutations faux sens de la LRAT retrouvées chez des patients souffrant de dégénérescence des photorécepteurs sont les suivantes : E14L, Y61D, A106T (Dev Borman, Ocaka et al. 2012), R109L (Coppieters, Van Schil et al. 2014), R109C (Preising, Paunescu et al. 2007), P173L (Senechal, Humbert et al. 2006) et S175R (Thompson, Li et al. 2001) (Figure 7). L'activité enzymatique de ces mutants faux sens (Y61D-, A106T-, R109L-, R109C-, P173L-, S175R-tLRAT), à l'exception de la mutation E14L car ce résidu est localisé dans le segment N-terminal hydrophobe, a été comparée en Figure 9 à celle de la tLRAT. À l'exception de la mutation P173L, une perte d'activité de plus de 99% a été observée pour toutes les mutations (Figure 9). Dans le cas de la P173L, ~12% de l'activité enzymatique de la tLRAT est conservée, ce qui est cohérent avec le fait que le patient atteint de cette mutation n'a pas démontré de symptôme de la rétinite pigmentaire avant un âge avancé, soit la soixantaine (Senechal, Humbert et al. 2006). Cela suggère que cette activité modérée a permis de régénérer le 11-*cis* rétinol à un rythme assez élevé pour éviter une dégénérescence importante des photorécepteurs tôt dans la vie du patient (Senechal, Humbert et al. 2006). D'un autre côté,

le patient atteint de la mutation S175R a développé une rétinite pigmentaire à un jeune âge (Thompson, Li et al. 2001). Ceci pourrait être expliqué par la perte totale de l'activité enzymatique de la LRAT pour ce mutant.

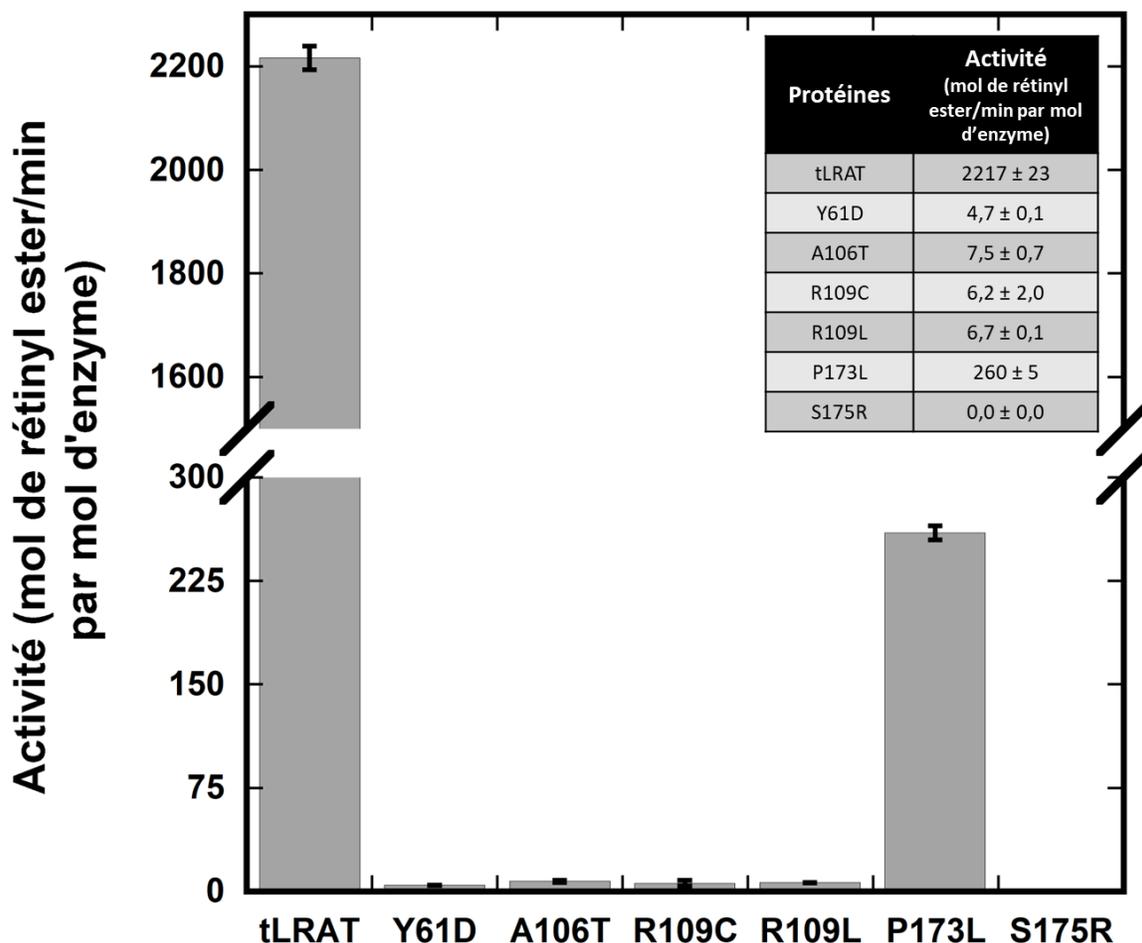


Figure 9: Activité enzymatique de la tLRAT et de ses mutants résultant en une dégénérescence des photorécepteurs. Les mutations Y61D, A106T, R109C et R109L mènent à une diminution de plus de 99% de l'activité enzymatique de la tLRAT comparativement à la tLRAT non mutée. Le mutant P173L-tLRAT a une activité plus élevée que les autres mutants. Le mutant S175R-tLRAT n'a aucune activité.

Chapitre 1 : Problématique du projet de maîtrise

La fonction d'une protéine dépend de sa structure tridimensionnelle et, à ce jour, aucune structure tridimensionnelle de la LRAT n'a été obtenue expérimentalement. Par contre, des modèles de prédiction sont disponibles. Un premier modèle a été obtenu par *I-TASSER* (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*), une méthode bio-informatique (Figure 10) (Bussières, Cantin et al. 2012). Plus précisément, *I-TASSER* se base sur la séquence de la protéine et la similarité avec des structures connues afin de prédire une structure grâce à des algorithmes (Zhang 2007, Zhang, Thiele et al. 2009).

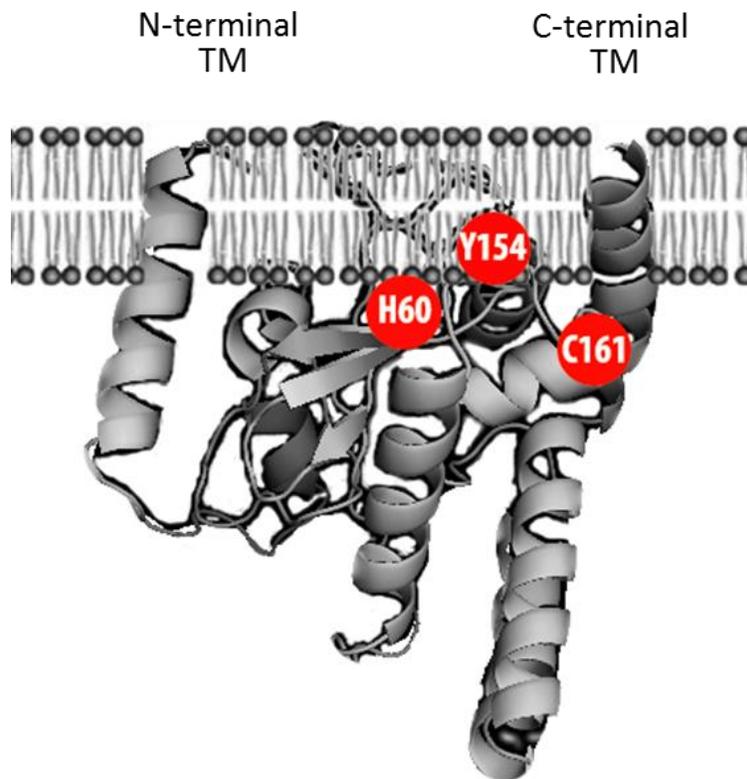


Figure 10: Prédiction de la structure tridimensionnelle de la LRAT par I-TASSER. La structure est composée de segments transmembranaires en C- et N-terminal en plus d'hélices- α et de feuillets- β (Bussières et al. 2012).

Par contre, il a été proposé que la LRAT ferait partie d'une classe de protéines suppresseurs de tumeur de classe II (Hajnal, Klemenž et al. 1994, Sers, Emmenegger et al. 1997). La LRAT pourrait donc avoir des homologues connus. Cette classe de protéines partage des résidus histidines et cystéines homologues à la H60 et la C161. Par la suite, un second modèle de

prédiction a été obtenu par cristallographie avec une protéine chimère qui comprenait une courte section de la LRAT (Figure 11) (Golczak, Sears et al. 2015). Plus précisément, ces auteurs ont remplacé le segment 39-57 d'une protéine homologue à la LRAT, la HRASLS3, par le segment 76-105 de la LRAT. En fait, le génome humain inclut 6 protéines qui font partie de cette classe d'enzymes qui inclut à la fois la LRAT et des enzymes étroitement apparentées, appelées *HRAS-like tumor suppressors* (HRAS1-5) ou les *LRAT-like proteins* (Anantharaman and Aravind 2003, Albalat 2012). Golczak et al. (2015) ont donc déterminé la structure de cette chimère LRAT/HRASLS3 par cristallographie, ce qui leur a permis de proposer un modèle pour la structure de la LRAT (Figure 11). Les HRAS ont une activité phospholipase A1/2 (Jin, Okamoto et al. 2007, Uyama, Jin et al. 2009) comparativement à phospholipase A1 pour la LRAT; de plus, les HRAS catalysent l'acylation des phospholipides (Jin, Okamoto et al. 2007, Uyama, Jin et al. 2009). La HRASLS3 possède 19% d'identité et 31% de similarité de séquence avec celle de la LRAT (Annexe 1).

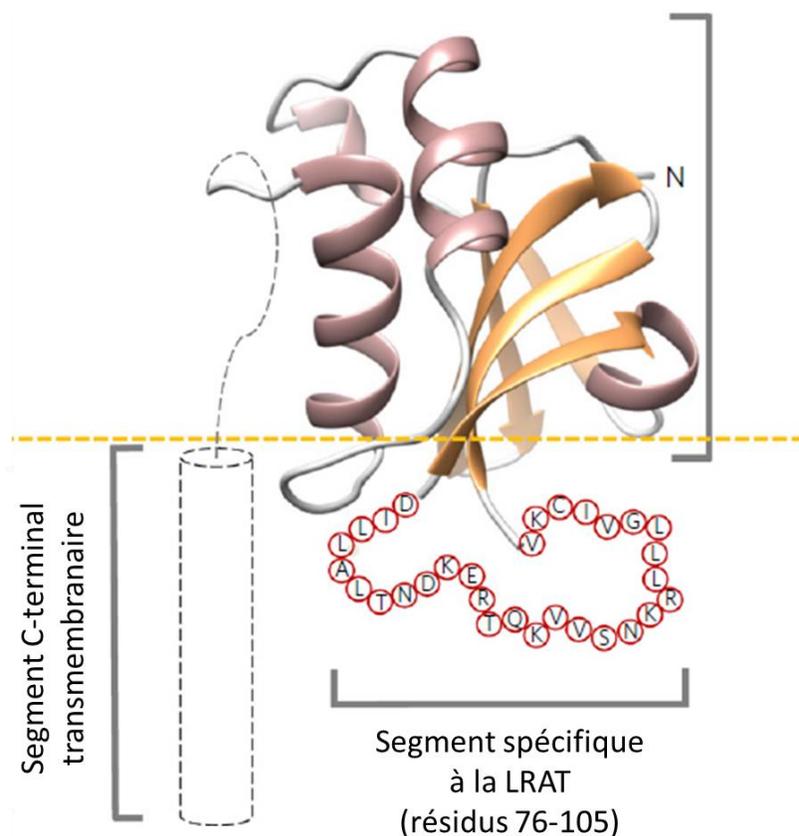


Figure 11: Schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine chimère LRAT/HRASLS3 obtenue par cristallographie. La structure est composée d'un segment transmembranaire en C-terminal en plus d'hélices- α et de feuillets- β . Le segment 39-57 de la HRASLS3 est remplacé par le segment 76-105 de la LRAT (Golczak et al. 2015)(PDB : 4Q95).

En comparant les modèles de prédiction en Figures 10 et 11, il est possible de noter la présence d'hélices- α et de feuillets- β . Par contre, nos données en résonance magnétique nucléaire (RMN) obtenues avec le double mutant C161S/C168S-tLRAT (Figure 14, voir section 2.2) ont permis de proposer, avec une probabilité très élevée, une structure composée en majorité d'hélices- α et de pelote statistique et une absence de feuillet- β , ce qui permettait de conclure que la structure de la LRAT pourrait correspondre à un nouveau repliement et ainsi faire partie d'une nouvelle famille d'enzymes. Ce double mutant avait été utilisé pour éliminer la présence de tLRAT acylée dans les échantillons (voir section 2.3). Il est donc primordial de déterminer la structure tridimensionnelle de la tLRAT afin de confirmer qu'il s'agit d'un nouveau repliement. L'objectif de ce projet de maîtrise consistait à déterminer la structure tridimensionnelle du seul mutant naturel de la LRAT menant à une perte totale de son activité enzymatique (S175R, Figure 9). De plus, des études de dichroïsme circulaire (CD) ont permis de déterminer que la tLRAT et le mutant S175R-tLRAT avaient globalement la même structure secondaire, ce qui indiquait que la mutation n'engendrait que des changements structuraux au niveau local (Bussieres, Cantin et al. 2011). Donc, en obtenant la structure tridimensionnelle de la S175R-tLRAT comportant une mutation qui a été identifiée chez un patient atteint d'une maladie de l'œil, il devrait être possible de comprendre l'influence des mutations de la LRAT sur la structure et son activité enzymatique en comparant cette structure avec celle de la protéine non mutée. En effet, la structure tridimensionnelle de la tLRAT non mutée sera déterminée par une autre étudiante du laboratoire. Ainsi, en obtenant une structure tridimensionnelle du mutant S175R-tLRAT, il sera possible de mieux comprendre le mécanisme d'activité enzymatique de la LRAT ainsi que les acides aminés impliqués dans la catalyse dans le but éventuel de développer des traitements pour les personnes atteintes des maladies liées aux mutations de la LRAT.

Chapitre 2 : Travaux antérieurs en appui au projet

2.1 Clonage, surexpression et purification de la tLRAT

Plusieurs tentatives afin de surexprimer la forme complète de la LRAT ont été faites au cours des années. Par contre, il n'a pas été possible de la surexprimer dans des cellules procaryotes et seulement une surexpression et une purification partielle dans des cellules eucaryotes a été possible (Rando 2002, Bok, Ruiz et al. 2003, Koenekoop, Loyer et al. 2003). La difficulté de surexprimer la LRAT complète est causée par la présence des segments en N- et C-terminal qui sont hautement hydrophobes (Ruiz, Winston et al. 1999, Moise, Golczak et al. 2007). Afin d'y remédier, une forme tronquée de la LRAT humaine (tLRAT) comprenant les acides aminés 30 à 196 a été produite (la forme 31-196 mentionnée dans la section I.5 a été produite avant que nous nous rendions compte qu'un échantillon hétérogène était produit avec cette séquence où une portion importante de la protéine contenait la méthionine initiale, ce qui a été résolu en utilisant la séquence 30-196). Il est important de noter que les résidus identifiés comme étant essentiels à la catalyse (H60, H72, Y154 et C161) sont conservés dans cette forme tronquée de la tLRAT. De plus, comme mentionné dans la section I.5.2, l'activité enzymatique de cette forme tronquée est beaucoup plus élevée que les données publiées précédemment avec les formes tronquée et complète de la LRAT (Horchani, Bussieres et al. 2014). Par conséquent, l'obtention d'une structure tridimensionnelle de la forme tronquée de la LRAT devrait apporter des informations valables et importantes sur son mécanisme d'activité. De plus, l'utilisation de la forme tronquée permet d'étudier la grande majorité des mutations naturelles retrouvées chez des patients atteints de maladies de l'œil, sauf pour la mutation E14L. La tLRAT possède une étiquette de purification de 10 histidines en C-terminal (tLRAT-His₁₀), ainsi qu'un site de reconnaissance de la thrombine afin de cliver cette étiquette de purification (Figure 12). Par contre, dans notre laboratoire, plusieurs tentatives de clivage ont été faites afin d'enlever cette étiquette de purification mais sans succès jusqu'à maintenant. La détermination de la structure tridimensionnelle du mutant S175R-tLRAT a donc été faite en présence de l'étiquette His₁₀ de purification en C-terminal. Au final, la tLRAT est composé de 182 acides aminés et a une masse moléculaire de 20,9 kDa. Toutefois, même en absence de ses segments hydrophobes, il est nécessaire d'utiliser un détergent, le dodecylsulfate de sodium (SDS) pour solubiliser la tLRAT après sa surexpression ainsi qu'au cours de la purification. Les protocoles de clonage, surexpression

et purification ont été optimisés par Sylvain Bussières et seront d etaill es dans les sections 3.1 et 3.2.

			30	40	50	60
			A	GEDKGRNSFY	ETSSFHRGDV	LEVPRTHLTH
70	80	90		100	110	120
YGIYLGDNRV	AHMMPDILLA	LTDDMGRTQK		VVSNKRLILG	VIVKVASIRV	DTVEDFAYGA
130	140	150		160	170	180
NILVNHLDDES	LQKKALLNEE	VARRAEKLLG		FTPYSLLWNN	CEHFVTYCRY	GTPISPQSDK
190	200	210				
FCETVKIIIR	DQRSV	LVPRG	SHHHHHHHHH	H		

Figure 12: S equen e de la tLRAT-His₁₀ (30-196). Le site de reconnaissance de la thrombine est repr esent e par les acides aminés en vert et l'étiquette de purification de 10 histidines est en orange.

2.2 Mesures RMN et attribution des pics

Plusieurs données RMN ont déjà été obtenues avec la tLRAT et ses mutants. Tout d'abord, les spectres ¹⁵N-HSQC de la tLRAT et des mutants Y61D, A106T, P173L, S175R et C161S/C168S ont été mesur es (Figure 13). Ainsi, la comparaison des spectres de ces mutants avec celui de la tLRAT a permis d'observer des différences mineures dans les déplacements chimiques des pics des mutants par rapport à ceux de tLRAT. Il est probable que ces changements induits par la mutation soient à proximité de résidus catalytiques sans toutefois modifier la structure globale de la tLRAT. La diminution de l'activité enzymatique des mutants de la tLRAT ne serait donc pas due à des changements importants de la structure tridimensionnelle de la protéine. Cela permet de supposer que ces changements seraient localis es à proximité des mutations. De plus, des spectres RMN ¹⁵N-HSQC, HNCOC, HNCACO, HNCOCA, HNCA, HNCACB et CBCA(CO)NH ont été enregistrés pour la C161S/C168S-tLRAT. Ce double mutant avait été utilis e afin d'obtenir une protéine uniquement sous une forme non-acylée (voir section 2.3).

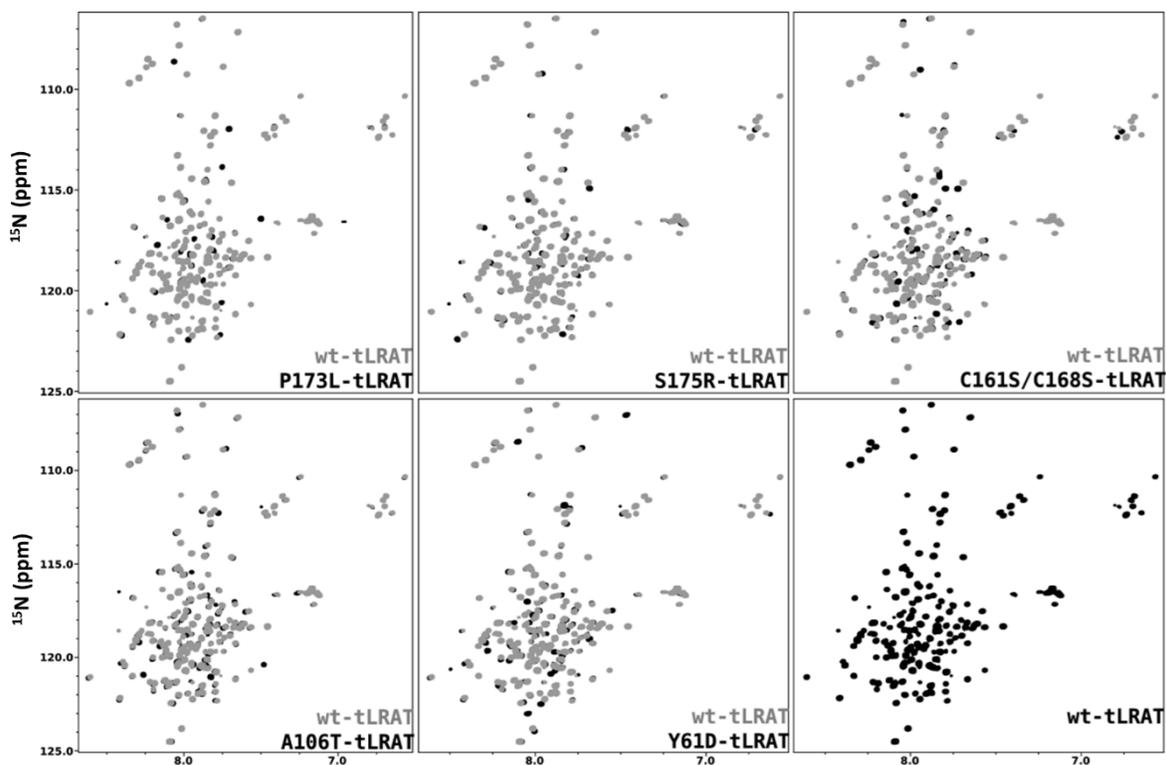


Figure 13: Spectres ^{15}N -HSQC de la tLRAT et des mutants naturels retrouvés chez des patients atteints de maladies de l'œil. Le spectre de chaque mutant (noir) est superposé à celui de la tLRAT (gris) et les pics noirs indiquent des changements dans les déplacements chimiques en référence aux pics de la tLRAT.

De plus, il a été possible de prédire la structure secondaire de la C161S/C168S-tLRAT (Figure 14) à partir des données RMN. Cela a permis d'observer une forte présence d'hélices- α (59%) et de pelote statistique (41%), mais toutefois une absence de feuillets- β , contrairement aux modèles de prédiction présentés dans les Figures 10 et 11.

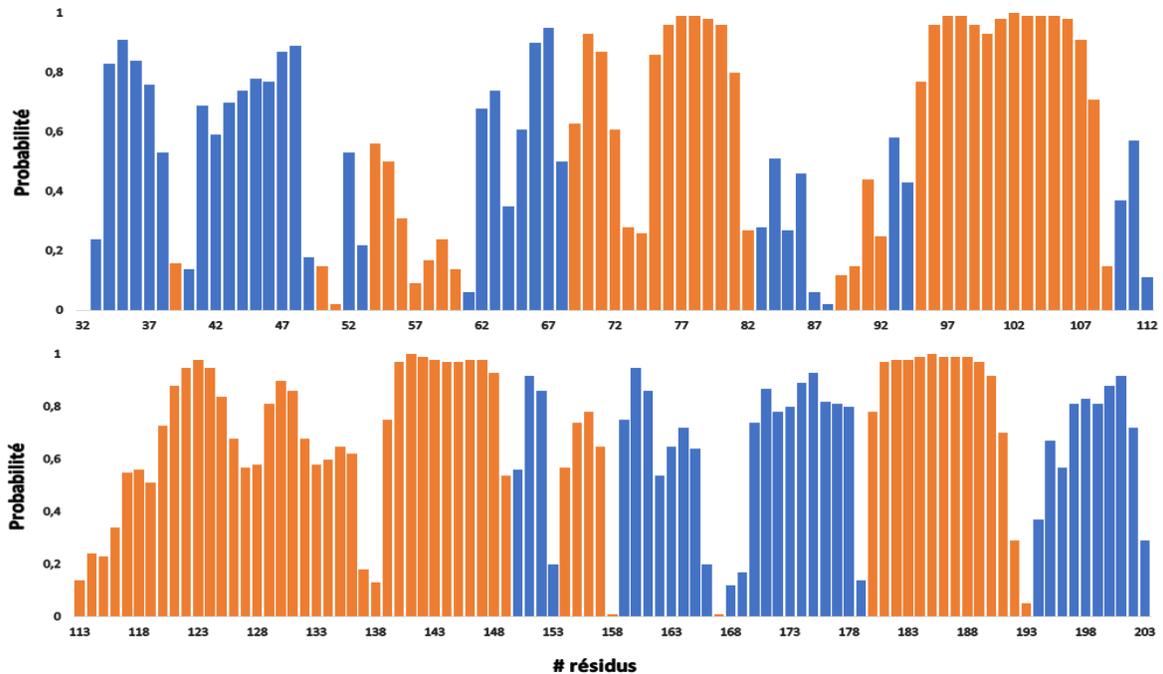


Figure 14: Prédiction de la structure secondaire de la C161S/C168S-tLRAT 31-196 avec TALOS-N. Les bandes indiquent sur une échelle de 0 à 1 la probabilité d'obtenir des hélices- α (bande orange), des feuillettes- β (bande grise) et de la pelote statistique (bande bleue) pour les résidus E32 à H203. TALOS-N prédit une forte probabilité d'avoir uniquement des hélices- α et de la pelote statistique.

2.3 Hétérogénéité de l'échantillon de tLRAT

L'échantillon de protéine préparé pour la RMN doit être le plus homogène possible. Par contre, l'analyse des spectres RMN a permis de démontrer que la tLRAT possède plusieurs sources d'hétérogénéité (voir ci-dessous). La première évidence d'hétérogénéité est la présence à la fois des formes acylée et non-acylée de la tLRAT. Ceci a été observé par la migration des échantillons de tLRAT sur des gels SDS-PAGE. En effet, deux bandes peuvent être observées pour la tLRAT (Figure 15A). L'attribution de ces 2 bandes à la tLRAT a été confirmée par immunobuvardage de type Western. La présence de ces deux bandes est aussi observée chez les mutants naturels de la LRAT (Figure 15B). Ces deux bandes sont aussi observées après avoir modifié la C161 ou C168 pour une sérine (C161S-tLRAT ou C168S-tLRAT) afin d'empêcher l'acylation de ces acides aminés. Toutefois, en mutant à la fois les cystéines 161 et 168 pour une sérine, une seule bande est observée (C161S/C168S-tLRAT, Figure 15A), ce qui suggère que la bande inférieure correspond à la forme acylée de la tLRAT. Il a donc été postulé que, lors de la surexpression de la tLRAT dans les cellules *E. coli*, la tLRAT hydrolyse des phospholipides de ces cellules et s'auto-acyle, comme décrit

dans la Figure 8. Ces données suggèrent aussi que les mutants naturels de la LRAT possèdent une activité phospholipase A1 (Figure 15B) et que c'est vraisemblablement leur activité acyltransférase qui fait défaut. Par conséquent, afin d'éviter cette source d'hétérogénéité pour la mesure des spectres RMN et avoir une forme entièrement non-acylée, le mutant S175R-tLRAT inclut aussi les mutations C161S et C168S (C161S/C168S/S175R-tLRAT).

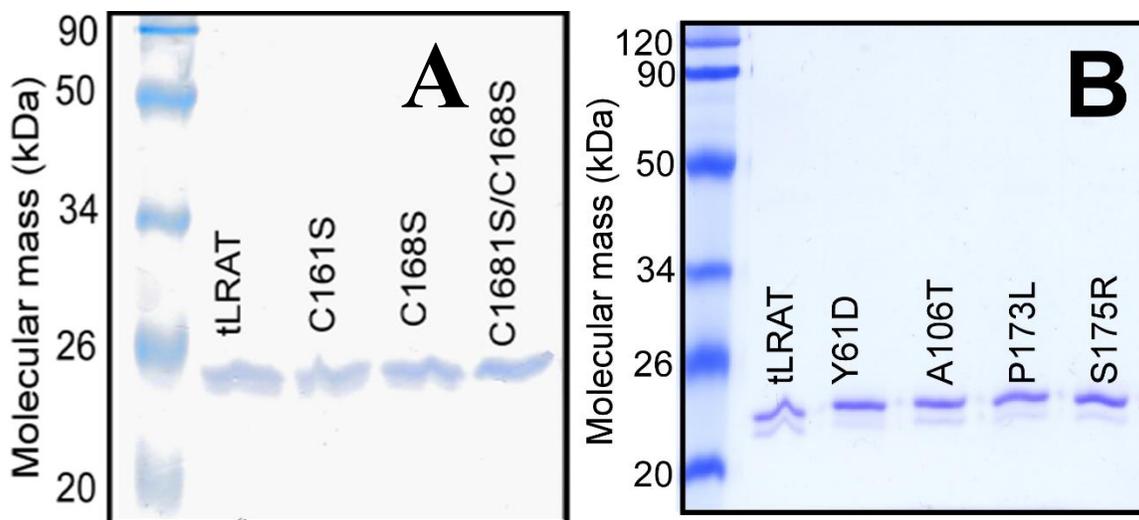


Figure 15: Migration sur SDS-PAGE de la tLRAT et des mutants C161S, C168S, C161S/C168S et les mutants naturels de la LRAT. A) Deux bandes sont présentes pour la tLRAT et les mutants C161S et C168S. Une seule bande est présente lorsque les deux mutations sont introduites. B) Deux bandes sont observées pour les mutants naturels.

Une seconde source d'hétérogénéité concerne l'observation de pics démontrant l'existence de conformations mineures dans le spectre ^{15}N -HSQC de la C161S/C168S-tLRAT (Figure 16). L'attribution des pics aux acides aminés de ce double mutant a été complétée précédemment par Stéphane Gagné. Ainsi, l'attribution des pics des spectres a permis de noter l'existence de conformations alternatives. Ces conformations sont notamment présentes pour les premiers résidus (31-35) ainsi que le segment 151-172. De plus, en analysant l'intensité des pics du spectre HNCO, il a été observé une plus basse intensité des pics pour le segment 97-115. Cette plus faible intensité suggère qu'il pourrait s'agir d'un segment où il y aurait potentiellement des échanges conformationnels en raison de l'élargissement des pics dans le spectre. Des pics additionnels sont aussi retrouvés pour différents acides aminés de divers segments de la tLRAT (>1000, Figure 16). La conformation mineure des résidus

31-35 pourrait provenir d'un clivage incomplet de la méthionine en position 30 qui est l'acide aminé initiateur de la traduction (voir le texte ci-dessous à la fin de cette section). Par la suite, le segment 151-172 présente aussi une conformation mineure impliquant l'isomérisation *cis-trans* de la liaison peptidique 172-173, tel que déterminé lors de l'analyse des déplacements chimiques des C β et C γ de la P173 où une portion majeure (88%) se retrouve en conformation *trans* et mineure (12%) en conformation *cis* (Figure 17). Encore une fois, la présence de cette hétérogénéité pourrait être importante pour l'activité de la tLRAT. De plus, la mutation P173L recensée chez un patient atteint de rétinite pigmentaire résulte en activité enzymatique beaucoup plus importante que celle de tous les autres mutants (12% d'activité résiduelle comparativement au WT, Figure 9). Le changement de la proline pour une leucine pourrait résulter en la perte de la conformation *cis*, ce qui pourrait ainsi diminuer la capacité de la LRAT à produire du rétinyl ester. Il est aussi à noter que deux résidus catalytiques sont présents dans ce segment 151-172, soit Y154 et C161. Une troisième source d'hétérogénéité a été observée sur le spectre ¹⁵N-HSQC de la C161S/C168S-tLRAT 31-196. En effet, deux pics d'intensité différente (87 et 13%) sont présents pour le NH de la chaîne latérale du tryptophane en position 158 (W158, Figure 18). Ces pics sont présents autant pour la tLRAT que la C161S/C168S-tLRAT, ce qui indique une source d'hétérogénéité additionnelle en plus de la présence d'une forme acylée et non-acylée.

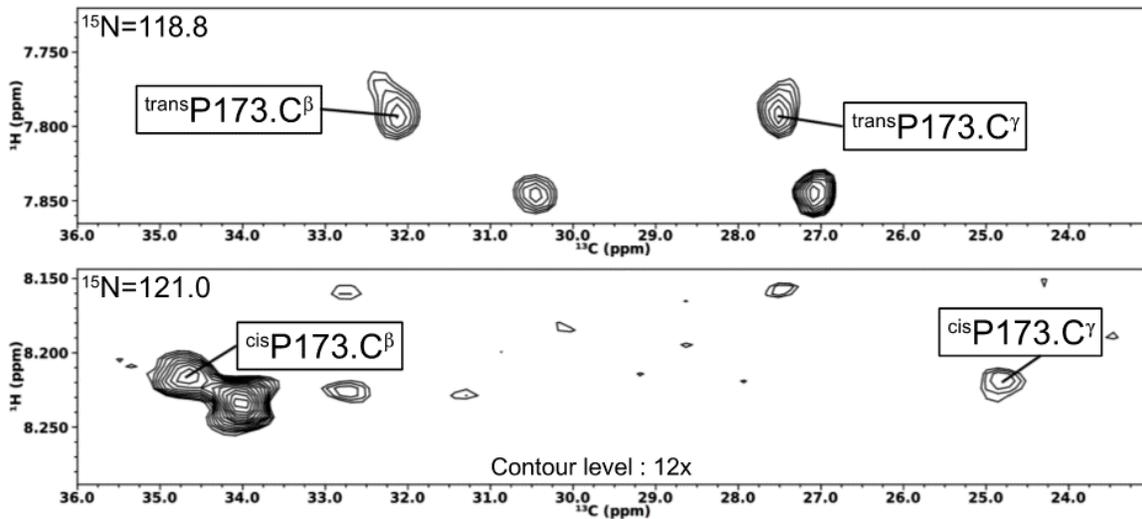


Figure 17: Plan du 3D-CCONH de la C161S/C168S/tLRAT pour la P173. La figure du dessus correspond à un déplacement chimique de 118.8 ppm sur l'axe du ^{15}N . Les $\Delta\delta$ des $\text{C}\beta$ et $\text{C}\gamma$ indiquent une conformation trans pour la liaison peptidique 172-173. La figure du dessous correspond à un déplacement chimique de 121.0 ppm sur l'axe du ^{15}N . Les $\Delta\delta$ des $\text{C}\beta$ et $\text{C}\gamma$ indiquent une conformation cis pour la liaison peptidique 172-173; l'intensité des pics a été augmentée de 12x.

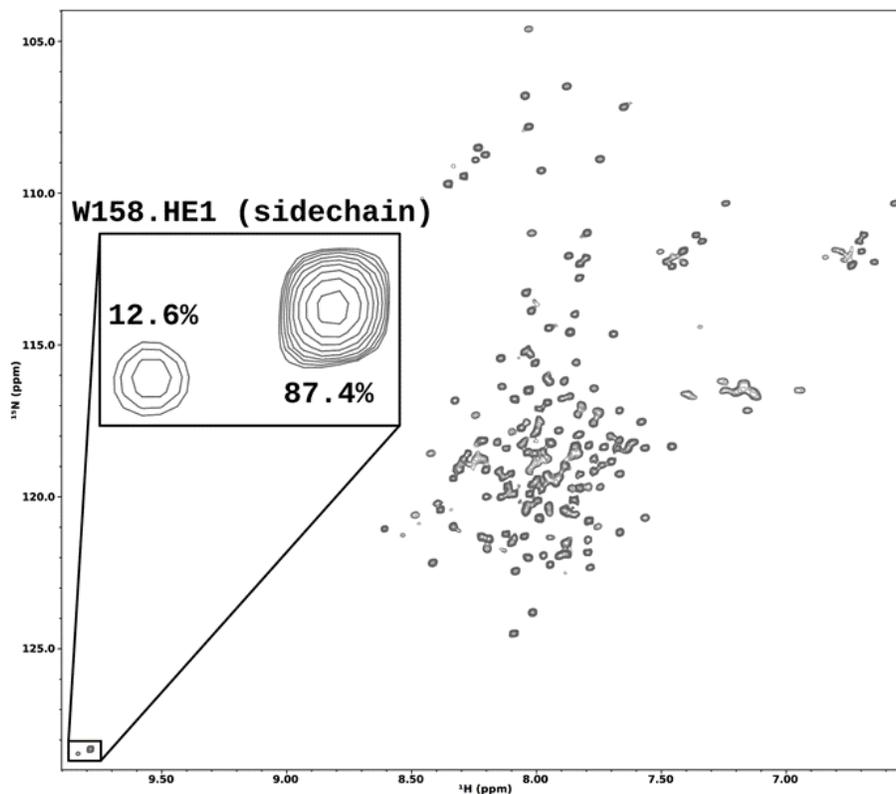


Figure 18: Spectre ^{15}N -HSQC de la tLRAT. Les deux pics de la chaîne latérale du tryptophane 158 et leur contribution respective sont mis en évidence.

La dernière source d'hétérogénéité est reliée au premier acide aminé de la séquence de la tLRAT. En théorie, la méthionine initiatrice de la traduction en position 30 devrait être clivée par la méthionine aminopeptidase des bactéries. Son clivage partiel pourrait résulter de la présence d'un acide glutamique en position 32 (E32). En effet, l'identité de l'acide aminé suivant le premier résidu de la séquence joue un rôle majeur dans ce processus (Varland, Osberg et al. 2015). Il a ainsi été démontré que la présence d'un petit résidu non chargé favorise ce clivage par la méthionine aminopeptidase alors que, dans la construction tLRAT 31-196, l'acide aminé suivant la glycine 31 (G31) est un acide glutamique (E32), un gros résidu chargé négativement. Afin d'éliminer cette source d'hétérogénéité, la construction 30-196 a été préparée où le premier résidu est une alanine (A30), ce qui a permis d'avoir deux petits résidus non chargés au début de la séquence (AG). La Figure 19A montre la présence de tLRAT avec et sans méthionine pour la construction 31-196 alors que la Figure 19B met en évidence un clivage complet où seulement la présence de la forme sans la méthionine initiatrice est observée pour la construction 30-196.

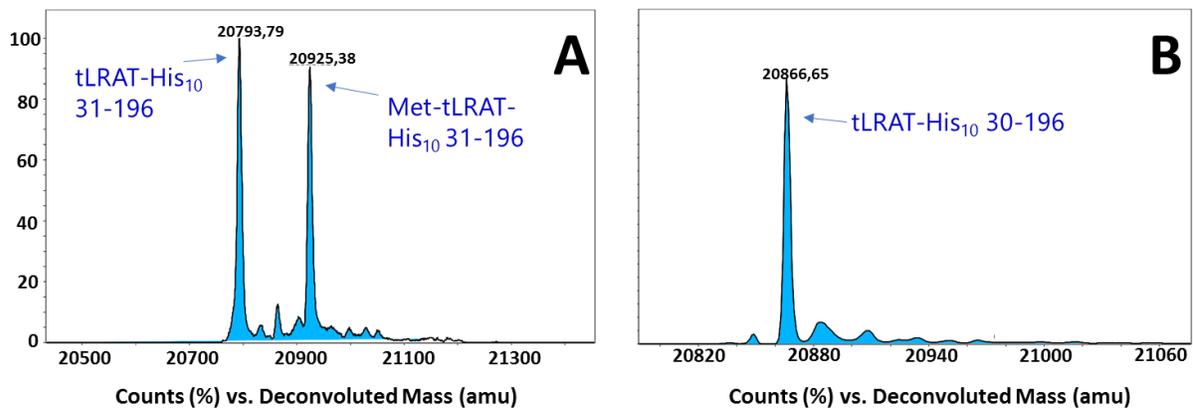


Figure 19: Spectrométrie de masse des constructions tLRAT 31-196 et 30-196. A) Le clivage de la méthionine est incomplet lorsque la séquence de la tLRAT commence par les résidus G-E-D, menant à la présence de deux formes de la tLRAT (avec et sans méthionine en positions 30). B) Le clivage de la méthionine est complet avec la séquence de la tLRAT commençant par A-G-E-D, menant à une seule forme de la tLRAT 30-196.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Clonage et surexpression de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 ¹⁵N ¹³C

Les protocoles de clonage, de surexpression et de purification de la tLRAT ont été optimisés au cours des années dans notre laboratoire. Dans le cadre de ces travaux, la forme tronquée (acides aminés 31 à 196) de la LRAT, ayant une étiquette de purification de 10 histidines en C-terminal ainsi que les mutations C161S et C168S (C161S/C168S-tLRAT-His₁₀ 31-196), a été utilisée pour la préparation du mutant S175R. Étant donné que des formes acylée et non-acylée ont été observées pour le mutant S175R-tLRAT (Figure 15B), il était possible de postuler que l'utilisation du double mutant C161S/C168S-tLRAT (Figure 15A) permettait d'obtenir seulement la forme non-acylée de ce mutant (C161S/C168S/S175R-tLRAT). Cela a permis d'observer moins d'hétérogénéité dans les spectres RMN de l'échantillon (voir section 2.3). L'ADNc de la C161S/C168S-tLRAT a été clonée dans le vecteur recombinant pET-11a. Ce vecteur contient un promoteur T7 et un gène lacI. Le promoteur T7 rend possible l'expression d'une grande quantité de protéines alors que le gène lacI permet le contrôle de la transcription dans *E. coli*. Plus précisément, le répresseur lac se lie à l'opéron lac, inhibant ainsi la transcription. L'inhibition est levée par l'ajout d'un inducteur, le lactose, ou un dérivé du lactose, soit l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Watson 2009, Brown 2011). Afin d'obtenir une protéine comprenant la mutation d'intérêt, soit la S175R, une mutagenèse dirigée a été faite à partir de l'ADNc de la C161S/C168S-tLRAT 31-196 avec la trousse commerciale *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). Les amorces dessinées afin d'introduire cette mutation sont montrées dans le Tableau 1. Par la suite, une seconde mutagenèse dirigée a été effectuée afin d'introduire une alanine en position 30 afin d'obtenir la construction comprenant les acides aminés 30 à 196. Tel que mentionné dans la section 2.3, la présence de l'alanine en position 30 a permis d'éliminer une source d'hétérogénéité dans l'échantillon en facilitant le clivage de la méthionine par les bactéries. Les amorces et les programmes PCR utilisés pour effectuer ces mutagenèses sont montrés dans les Tableaux 1 et 2.

Par la suite, une transformation a été faite avec 50 μ L de cellules compétentes XL 10 Gold (Stratagene) et 1 μ L de la solution contenant la construction dans pET-11a résultant des mutagenèses décrites ci-dessus. Le mélange est incubé sur la glace durant 10 minutes puis à

42 °C pendant 90 secondes afin de produire un choc thermique qui permet l'insertion du vecteur dans les cellules bactériennes. Par la suite, 100 µL de milieu LB (*Lysogeny Broth*) sont ajoutés et le mélange est incubé durant une heure à 37 °C avec agitation. La culture est ensuite étalée sur un pétri de LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline, puis incubée pendant 16 heures à 37 °C. Un séquençage nucléotidique est ensuite effectué par la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du CHUL afin de s'assurer que les mutations ont été introduites dans la séquence.

Tableau 1: Séquence des amorces pour les mutagenèses dirigées

Direction de l'amorce	Mutation	Séquence de l'amorce
Sens	S175R	5' -CACCCCGATCAGGCCCCAGTCCGAC-3'
Anti-Sens	S175R	5' -GTCGGACTGGGGCCTGATCGGGGTG-3'
Sens	Ajout de A30	5' -AAGAAGGAGATATACATATGGCGGGCGAAGACAAAGGGAGGAAC-3'
Anti-Sens	Ajout de A30	5' -GTTCCCTCCCTTTGTCTTCGCCCGCCATATGTATATCTCCTTCTT-3'

Tableau 2: Cycles PCR pour effectuer les mutagenèses dirigées

Mutation	Nombre de cycle	Température (°C)	Temps
S175R	1	95	2 minutes
	18	95	20 secondes
		60	10 secondes
	68	3,5 minutes	
	1	68	5 minutes
1	4	∞	
Ajout de A30	1	95	2 minutes
	18	95	20 secondes
		60	10 secondes
	68	3,25 minutes	
	1	68	5 minutes
1	4	∞	

La surexpression de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 est faite dans un système procaryote, soit *E. coli*. La souche utilisée est BL21 (DE3) RiPL (Stratagene). Il s'agit d'une souche « codon plus » riche en codons rares chez *E. coli*, soit l'arginine (R), l'isoleucine (I), la proline (P) et la leucine (L). Cette souche est donc très utile dans le cas de la surexpression de protéines eucaryotes. Une transformation, tel que décrit ci-dessus, a donc été effectuée avec 0,5 µL de la culture incluant le vecteur d'intérêt ainsi que 20 µL de cellules *E. coli* BL21 (DE3) RiPL, 50 µg/mL d'ampicilline et 50 µg/mL de chloramphénicol.

La surexpression des protéines pour les mesures en RMN doit être faite dans un milieu minimal afin de fournir aux bactéries uniquement les sources nutritionnelles strictement nécessaires pour la croissance bactérienne. De plus, le milieu minimal doit contenir une source de carbone marqué (^{13}C) et d'azote marqué (^{15}N) pour les analyses RMN (voir section 3.4.1). Un litre de milieu minimal contient 15,7 mM de NaH_2PO_4 (Sigma), 59,4 mM de Na_2HPO_4 (Fisher Chemical), 5 mM de KH_2PO_4 (Sigma), 22,5 mM de K_2HPO_4 (ICN Biochemicals), 3,3 mM de bétaine (Sigma), 55 mM de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope Laboratories), 5,5 mM de Na_2SO_4 (Anachemia) et 21,5 mM de glucose marqué au ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories). Le milieu minimal est autoclavé puis du MgSO_4 , de la thiamine, de l'ampicilline et du chloramphénicol sont ajoutés (concentrations finales de 2 mM, 3,8 mM, 50 µg/mL et 50 µg/mL respectivement). Afin de favoriser la croissance bactérienne, les sels suivants sont ajoutés (concentrations finales): 10 µM de FeCl_2 , 4 µM de CaCl_2 , 2 µM de MnCl_2 et ZnSO_4 ainsi que 0,4 µM de CoCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 , Na_2MoO_4 , Na_2SeO_3 et H_3BO_3 (Studier 2005).

La première étape de la surexpression consiste à l'ajout au milieu minimal de 10 ml d'une préculture contenant le plasmide C161S/C168S/S175R-tLRAT qui a été incubée durant 16 heures à 37 °C à 250 rpm dans 12 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline et de chloramphénicol. Le milieu minimal est incubé à 37 °C avec une agitation à 250 rpm. Lorsqu'une densité optique (DO_{600}) de 0,6 est atteinte, la transcription est initiée par l'ajout d'IPTG (concentration finale de 0,5 mM). Le milieu est alors incubé à 30 °C pendant 5 heures à 250 rpm. Le milieu de culture est ensuite divisé dans plusieurs tubes Falcon de 50 mL et les bactéries se retrouvent dans le culot à la suite d'une centrifugation à 3 750 rpm à 4 °C

pendant 25 minutes avec la centrifugeuse Beckman Coulter Allegra™ X-12R (rotor SX4750). Les culots sont conservés à -80 °C jusqu'à l'étape de la purification.

3.2 Purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 ¹⁵N ¹³C

Le protocole de purification de la tLRAT-His₁₀ a précédemment été optimisé (Bussieres, Buffeteau et al. 2008). La purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT est faite par chromatographie d'affinité. Cela est possible grâce à la présence de l'étiquette de purification His₁₀ en C-terminal. Les histidines permettent des interactions, plus précisément des liens de coordination, avec le nickel des billes d'agarose (colonne de 5 mL, GE Healthcare).

La purification commence par l'extraction de la protéine des culots bactériens qui sont remis en suspension avec 10 ml un tampon contenant 100 mM de Tris et 100 mM de NaCl à pH 7,8. Puis, de l'EDTA et de l'EGTA sont ajoutés (concentration finale de 1 mM) pour inhiber l'action des métalloprotéases (Dominguez and Ward 2009). Par la suite, les culots sont soumis à trois cycles de gel (azote liquide)-dégel (bain à 37 °C). L'aprotinine (concentration finale de 1,4 µg/mL), un inhibiteur de type sérine protéase, est ensuite ajoutée. Une sonication de trois minutes (intervalles de 10 secondes de sonication et 10 secondes de repos) est subéquemment faite afin de briser les parois cellulaires et permettre l'extraction des protéines. Par la suite, une centrifugation de 13 000 xg de 20 minutes à 4 °C permet la sédimentation des membranes et des protéines non solubles dans le culot où se retrouve aussi la tLRAT. Le culot est premièrement lavé avec 5 mL de Tris 500 mM à pH 7,8, puis remis en suspension dans un tampon de chargement (500 mM Tris, 5 mM imidazole, 10 mM DTT et 3,4 mM SDS à pH 7,8). La suspension est agitée pendant une heure avec un agitateur Mistral Multi-Mixer (Lab-line instruments) pour ensuite être centrifugée à 100 000 xg pendant 30 minutes à 21 °C avec une ultracentrifugeuse (rotor 70-Ti, Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge). La C161S/C168S/S175R-tLRAT se retrouve alors dans le surnageant et prête à être chargée sur la colonne de nickel.

La colonne de nickel est préalablement conditionnée avec le tampon de chargement (cinq fois le volume de la colonne, 25 mL au total). La tLRAT est par la suite chargée sur la co-

lonne. L'étiquette de purification His₁₀ permet à la tLRAT de lier le nickel. Les autres protéines n'ayant pas d'affinité avec le nickel sont éluées. Un tampon de lavage contenant 500 mM de Tris, 40 mM d'imidazole, 10 mM de DTT et 3,4 mM de SDS à pH 7,8 est ajouté à la colonne. Les protéines qui n'ont pas d'affinité avec le nickel sont éluées. Le lavage est fait jusqu'à ce qu'une densité optique (DO A₂₈₀) d'environ zéro est atteinte, ce qui indique qu'il n'y a plus d'impureté dans l'éluat. La tLRAT est ensuite éluée avec le tampon d'éluion (500 mM de Tris, 150 mM imidazole, 10 mM DTT et 3,4 mM SDS à pH 7,8). L'éluion est faite grâce à la concentration élevée d'imidazole contenue dans ce tampon. En effet, l'imidazole entre en compétition avec les histidines pour interagir avec le nickel. Les protéines éluées sont récoltées dans 20 fractions de 1 mL. La quantité de protéine contenue dans chaque fraction est calculée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 280 (A₂₈₀) et 260 nm (A₂₆₀) et en utilisant l'équation 1 :

$$[Protéines] = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260}) \quad (1)$$

Les fractions contenant de la protéine sont mises ensemble et ensuite concentrées avec un filtre à centrifuger (Amicon ultra-4, Merck Millipore) en utilisant une centrifugeuse (Sorvall Heraeus Centrifuge, 4 000 rpm). La protéine est concentrée jusqu'à un volume d'environ 1 mL.

Afin d'enregistrer les spectres RMN, il faut une protéine qui soit stable à long terme. Des études ont démontré que la tLRAT est très stable pendant une longue période de temps dans le tampon citrate à pH 6,0, soit pendant plus de deux semaines (Horchani, Bussieres et al. 2014). Il faut donc procéder à une étape de dessalage afin de changer le tampon d'éluion pour un tampon citrate à pH 6,0 (10 mM citrate, 10 mM DTT et 1,7 mM SDS). Cette étape est faite avec une colonne de dessalage (Biorad) précédemment conditionnée avec un volume d'eau puis un volume de tampon citrate. La protéine dans le tampon d'éluion est par la suite ajoutée à la colonne. L'éluat contient alors la protéine dans le tampon citrate. On récolte 10 fractions de 1 mL. La quantité de protéine dans chaque fraction est calculée avec l'équation 1. Les fractions contenant la protéine sont par la suite concentrées comme décrit ci-dessus

pour atteindre une concentration de ~ 1 mM et un volume de ~ 500 μ L. On obtient généralement une concentration de 1 mM en protéine purifiée pour 1 L de culture.

3.3 Préparation de l'échantillon pour la mesure des spectres RMN

Afin d'avoir un échantillon qui permet d'enregistrer des spectres RMN de bonne qualité, certaines contraintes doivent être respectées. En effet, les spectres RMN sont sensibles à la concentration protéique, aux concentrations en sels, à la température ainsi qu'au pH de l'échantillon (Fan and Lane 2016).

D'abord, l'échantillon doit contenir une concentration élevée en protéine. Plus un échantillon est concentré, plus le signal sur bruit est meilleur, ce qui facilite l'analyse des spectres RMN. Il est recommandé d'avoir entre 0,5 et 2,5 mM de protéine (Reid 1997, Lian 2011). La C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 a été préparée à une concentration de ~ 1 mM, ce qui correspond à environ 21 mg/mL. À cette concentration, la protéine est soluble et on n'observe pas d'agrégation. L'échantillon doit aussi contenir une protéine pure à plus de 95%. Il est préférable que l'échantillon contienne une faible concentration de sels, afin de minimiser l'influence de la force ionique sur le déplacement chimique des pics et éviter d'engendrer une perte du rapport signal sur bruit (Lian 2011). L'échantillon doit aussi être stable dans le temps (entre 4 et 6 semaines) et à la température à laquelle les spectres sont enregistrés. La température est importante car plus elle est élevée, plus la protéine est mobile, ce qui résulte en une augmentation de la résolution des pics dans les spectres. Des études de stabilité dans le temps (mesures d'électrophorèse, d'activité et de spectrométrie de masse à 25, 35, 37, 40 et 45 °C à chaque semaine pendant une période de 4 semaines) ont été faites avec la tLRAT afin de déterminer la température idéale pour enregistrer les spectres RMN tout en gardant l'intégrité de la protéine (voir section 4.2). Finalement, le pH a une grande influence sur le déplacement chimique des pics. Les expériences RMN sont très souvent faites dans des solvants à bas pH, entre 3,0 et 5,0, afin de minimiser l'échange des protons des amides avec le solvant. Par contre, dans le cas de l'étude des protéines, un solvant à pH plus neutre entre 5,0 et 7,0 est utilisé. Afin de minimiser l'échange de protons, il est aussi recommandé d'employer des tampons citrate ou phosphate (Reid 1997). Le tampon citrate à pH 6,0 répond donc très bien à ces critères.

L'échantillon doit aussi contenir entre 5 et 10% d'oxyde de deutérium (D₂O), qui servira pour le « field-frequency lock », ainsi que 1 mM d'acide 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique (DSS). Ce dernier sert de référence à 0 ppm. En effet, ses trois groupements méthyles ont une fréquence de 0 ppm. Toutes les autres fréquences des déplacements chimiques sont calculées en fonction de cette fréquence (Weljie, Newton et al. 2006). Le dithiothréitol (DTT) est aussi particulièrement important dans notre échantillon de protéine. Le DTT est un agent réducteur qui empêche l'oxydation des cystéines et maintient l'intégrité de la tLRAT (Seo, Jackson et al. 2013). Lors des différentes étapes de purification, les solutions utilisées contiennent toujours 10 mM DTT. Toutefois, le DTT est facilement oxydé en solution aqueuse. Afin de s'assurer d'avoir une concentration de DTT non oxydée pendant une période de quatre semaines, un volume suffisant de DTT (concentration de 1M) est ajouté à l'échantillon pour atteindre une concentration finale dans l'échantillon RMN de 50 mM. Dans le cadre de ce projet, trois échantillons protéiques ont été préparés. Un premier afin d'enregistrer les spectres pour obtenir de l'information sur les atomes du squelette de la protéine (¹⁵N-HSQC, HNCOC, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH et HNCACB), un second pour les atomes des chaînes latérales (CCONH et HCONH) et un troisième pour enregistrer un spectre 3D NOESY, afin d'acquérir de l'information sur la proximité des atomes dans l'espace. Les spectres avec les deux premiers échantillons ont été mesurés avec un spectromètre de 600 MHz (pavillon Marchand, Université Laval) et le troisième avec un spectromètre de 800 MHz (Université McGill).

3.4 Utilisation de la RMN pour la détermination de la structure des protéines

Les méthodes expérimentales les plus utilisées afin d'obtenir la structure tridimensionnelle d'une protéine à une résolution atomique incluent la diffraction par rayons-X (cristallographie) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Dans la *Protein data bank* (PDB), 90% des 135 176 structures de protéines ont été élucidées par cristallographie et 8,5% par RMN (le 24 octobre 2018). Dans le passé, plusieurs essais ont été faits afin de cristalliser sans succès la tLRAT. L'hétérogénéité observée par RMN a permis de comprendre pourquoi il nous a été impossible d'obtenir des cristaux de tLRAT (voir section 2.3). La RMN est une méthode puissante qui permet non seulement l'étude de la structure de molécules, mais aussi leur dynamique et leur agrégation. Beaucoup de chemin a été parcouru depuis la publication

de la première structure élucidée par RMN, soit la *proteinase inhibitor IIA* en 1985 (Williamson, Havel et al. 1985). Cette structure présentait un *root-mean square deviation* (RMSD) de 2,1 Å pour les C α alors qu'aujourd'hui, il est possible d'obtenir une structure de cette même protéine avec un RMSD de $0,60 \pm 0,11$ Å pour les atomes du squelette. De plus, avec des outils de plus en plus précis, il est possible d'obtenir des structures avec des RMSD inférieurs à 0,5 Å. La RMSD est un bon indicateur de la précision, mais pas nécessairement de l'exactitude, des modèles structuraux obtenus en RMN. Plus elle est faible, plus les différences entre les structures obtenues sont faibles et plus les modèles convergent vers des structures similaires.

3.4.1 Théorie de la RMN

La RMN est active dans les régions des ondes radio (λ variant entre 0,3 et 30 m). Elle est basée sur les propriétés magnétiques des noyaux des atomes. Les paramètres importants pour la RMN sont le nombre quantique de spin (I) et le nombre quantique magnétique (m). Il est important de noter que I peut prendre des valeurs supérieures ou égales à zéro et correspondent à des multiples de $1/2$ (e.g. $1/2$, 1 , $3/2$, etc.). D'un autre côté, m peut prendre des valeurs entre $-I$ et I par incrément entier. Par exemple, si $I=3/2$, m peut prendre les valeurs suivantes : $-3/2$, $-1/2$, $1/2$ et $3/2$. Si $I=1$, m peut prendre les valeurs de -1 , 0 et 1 . Le noyau se comporte comme un dipôle magnétique (Günther 2013). En effet, les noyaux tournent sur

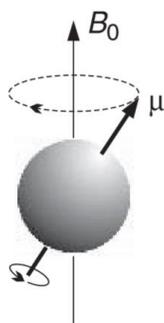


Figure 20: Représentation de la précession de Larmor d'un atome dans un champ magnétique (B_0) (Claridge 2009).

eux-mêmes, ce qui induit un moment magnétique (μ) orienté dans le même sens que le spin et qui tourne sur un axe incliné à un certain degré par rapport au champ magnétique externe

(B_0). Ce phénomène s'appelle la précession de Larmor (Figure 20). De plus, la valeur de μ est propre à l'atome étudié, car elle dépend de divers paramètres tel que décrit dans l'équation 2,

$$\mu = \frac{\gamma \cdot I \cdot h}{2\pi} \quad (2)$$

où γ est le rapport gyromagnétique de l'atome observé, I est le nombre quantique de spin et h est la constante de Planck.

Cependant, les noyaux pouvant être étudiés en RMN doivent avoir un spin qui est différent de 0. Par exemple, le ^{12}C a un spin de 0, ce qui ne permet pas de l'utiliser pour des études en RMN. Cependant, l'isotope ^{13}C a un spin de $\frac{1}{2}$, ce qui permet l'utilisation de ce noyau pour des analyses en RMN. Les atomes les plus souvent étudiés pour déterminer la structure des protéines incluent ^1H , ^{13}C et ^{15}N et ils ont tous un spin de $\frac{1}{2}$. Avec un tel spin, il est possible d'avoir deux niveaux d'énergie (Figure 21). La RMN est possible grâce à l'absorption d'énergie pour produire une transition entre ces deux niveaux d'énergie.

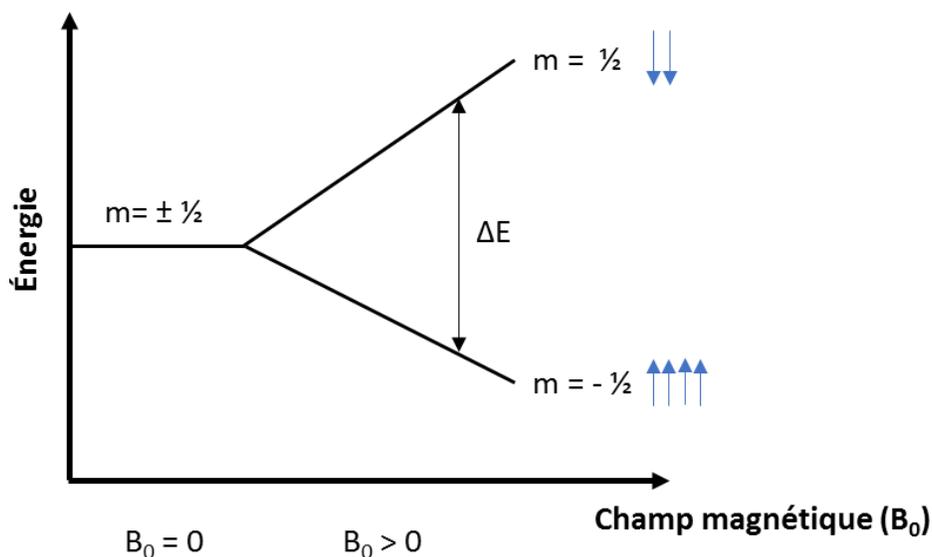


Figure 21: Représentation des niveaux possibles d'énergie pour un noyau où $I = \frac{1}{2}$. Lorsqu'aucun champ magnétique est appliqué, l'énergie des deux états est la même. Lorsque $B_0 > 0$, les noyaux s'alignent avec le champ magnétique de façon parallèle ou antiparallèle (flèches bleues). L'alignement parallèle au champ magnétique est la forme favorisée. Plus le champ magnétique est élevé, plus la différence d'énergie entre les deux états est élevée.

L'équation fondamentale en RMN est représentée par l'équation 3,

$$\Delta E = h \cdot \gamma \cdot B_0 \quad (3)$$

où ΔE est la différence d'énergie entre deux niveaux d'énergie, h est la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1}$), γ est le rapport gyromagnétique propre au noyau observé et B_0 est le champ magnétique induit.

L'interaction de la longueur d'onde avec le spin des noyaux se fait grâce au champ magnétique externe (B_0) induit par le spectromètre. Lorsqu'il n'y a pas de champ magnétique ($B_0 = 0$), l'orientation des vecteurs des atomes est répartie de façon aléatoire et les états ont la même valeur d'énergie. Cependant, en présence d'un champ magnétique ($B_0 > 0$), l'orientation des vecteurs des atomes est alors parallèle ou antiparallèle au champ induit (Figure 21). L'énergie des deux états est alors différente. La proportion des atomes ayant une préférence pour s'aligner de façon parallèle au champ magnétique est supérieure à celle où les atomes sont alignés de façon antiparallèle. La population est alors répartie selon une distribution de Boltzmann (équation 4) :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k_b T}} \quad (4)$$

où N est la population de spin dans les niveaux de haute (β) et basse (α) énergie, ΔE est la différence d'énergie, k_b est la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$) et T est la température.

Cette différence d'énergie mène à une aimantation macroscopique alignée avec le champ magnétique induit, ce qui permet ainsi de mesurer un signal RMN. Cela amène une oscillation à une fréquence qui dépend du champ magnétique ressenti (fréquence de Larmor) (Figure 22).

La sensibilité de la RMN dépend de l'abondance naturelle du noyau et de son rapport gyromagnétique. Ainsi, la sensibilité du noyau de ^1H est plus élevée que celle du ^{13}C et du ^{15}N en raison de sa très grande abondance dans la nature et son rapport gyromagnétique élevé. Les valeurs de l'abondance naturelle et du rapport gyromagnétique γ des atomes étudiés sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3: Propriétés des noyaux étudiés

Noyau	γ ($\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$) $\times 10^{-7}$	Abondance naturelle %	Sensibilité relative au proton %
^1H	26,753	99,98	100
^{13}C	6,728	1,11	$1,76 \times 10^{-4}$
^{15}N	-2,711	0,37	$3,85 \times 10^{-6}$

La composante principale du spectromètre est l'aimant supraconducteur qui génère un champ magnétique (B_0). L'échantillon, placé au centre de l'aimant, est soumis à une impulsion à une fréquence correspondant à la différence d'énergie du noyau étudié. L'impulsion dépend donc du noyau étudié et de la force du champ magnétique.

L'impulsion d'une certaine radiofréquence et durée génère un champ magnétique perpendiculaire qui permet une rotation de 90° du vecteur du noyau (Figure 22). Cette impulsion oscille à une fréquence égale ou proche de la fréquence de Larmor. L'aimantation globale est alors perpendiculaire au champ externe et le retour à l'équilibre résulte en un signal qui peut être enregistré. Ce signal s'appelle la *free induction decay* (FID) et représente l'intensité en fonction du temps. Une transformée de Fourier sur la FID permet d'obtenir un spectre RMN représentant l'intensité en fonction de la fréquence (Figure 23). Comme il est possible de voir dans la Figure 23, plus le signal de la FID est court, plus le pic à la suite d'une transformée de Fourier est large.

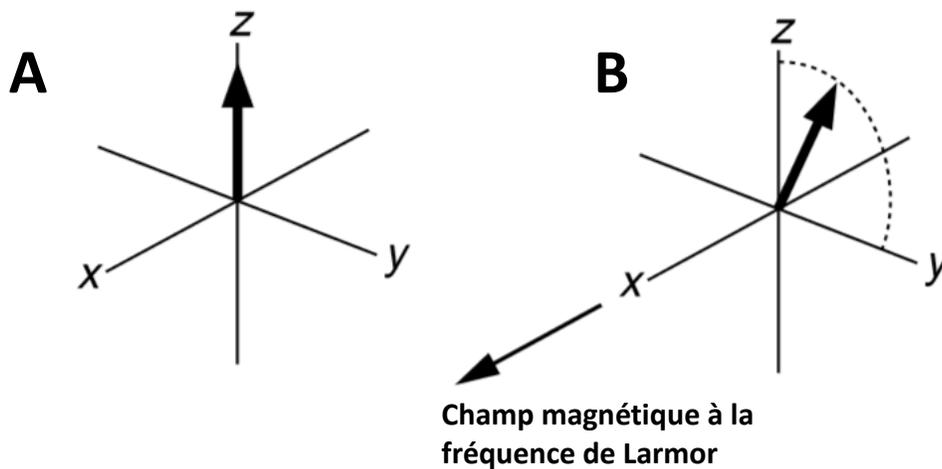


Figure 22: Représentation de l'effet d'une impulsion sur le champ magnétique (B_0). A) Le champ magnétique (B_0) se retrouve sur l'axe des z. B) Si un champ magnétique temporaire équivalent à la fréquence de Larmor est induit par une impulsion sur l'axe des x (à 90° de l'axe des z), B_0 sort de l'axe des z, avec un axe similaire à celui du noyau étudié (Keeler 2002).

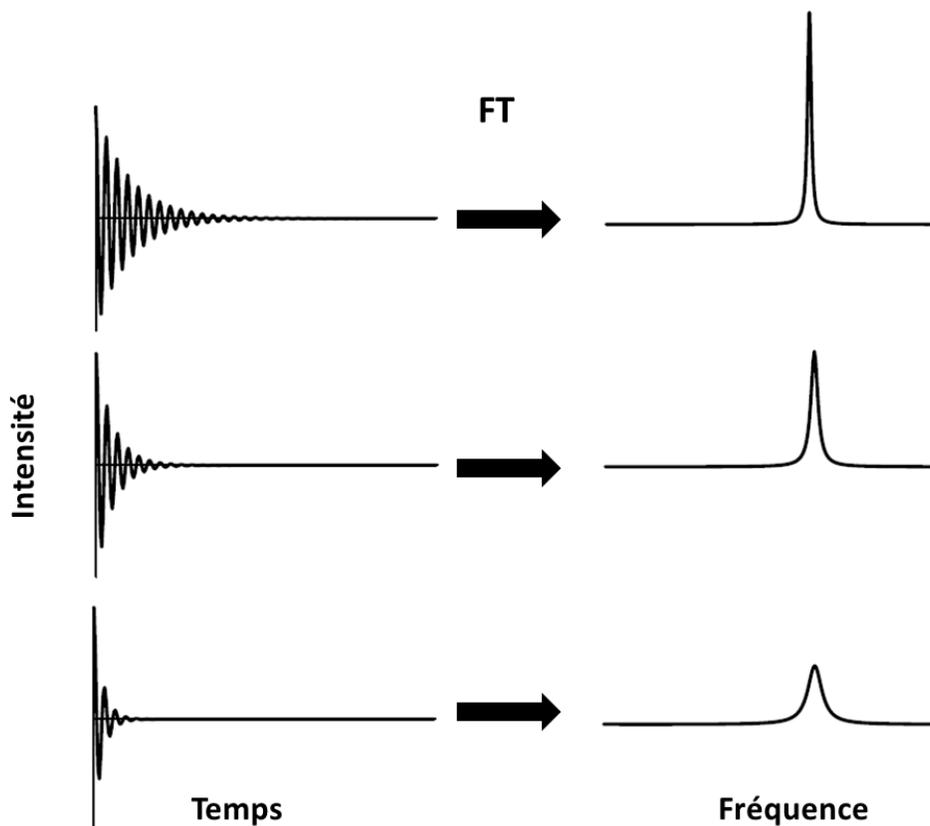


Figure 23: Transformée de Fourier. Le signal enregistré donne des spectres de l'intensité en fonction du temps. Une transformée de Fourier (FT) permet d'obtenir des spectres de l'intensité en fonction de la fréquence. Plus le signal est long, plus le pic à la suite de la transformée de Fourier est mince et allongé (Keeler 2002).

En résumé, afin de mesurer des spectres, l'échantillon est soumis à une impulsion brève qui permet l'excitation des noyaux. La précession des moments magnétiques en phase (aimantation globale) est enregistrée sous forme de FID. Les noyaux retournent à l'équilibre (distribution de Boltzmann) via divers mécanismes de relaxation, prêts pour de nouvelles impulsions. À la fin de l'enregistrement des spectres, une transformée de Fourier est requise afin d'obtenir des spectres de l'intensité des pics en fonction de la fréquence.

Plusieurs informations peuvent être obtenues en analysant les pics dans les spectres. Tout d'abord, l'intensité des pics est analysée. Celle-ci nous informe sur l'existence de noyaux équivalents donnant une forme particulière au pic. Plus l'intensité est élevée, plus de noyaux résultent en un seul pic. Par la suite, la multiplicité des pics provient du couplage, soit de l'interaction d'un noyau avec ses noyaux voisins. Dans le cas des noyaux de spin $\frac{1}{2}$, la multiplicité d'un pic est déterminée par $n+1$, où n est le nombre de noyaux avec lequel il y a un couplage. Par exemple, deux protons couplés vont donner un triplet dans un spectre. Finalement, les déplacements chimiques de chacun des pics donnent de l'information importante sur la structure de la protéine. En effet, chaque noyau a un champ magnétique induit par les électrons les entourant (Figure 24). Le champ magnétique produit par les

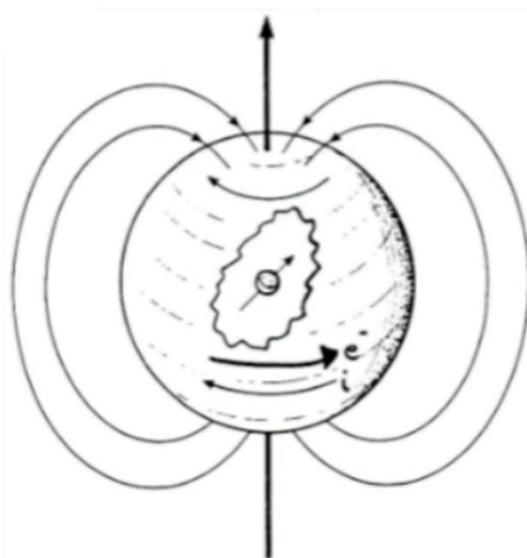


Figure 24: Représentation du blindage diamagnétique d'un atome. Les électrons d'un atome créent un champ magnétique autour du noyau, produisant ainsi un effet de « blindage ».

électrons dépend de leur nombre. Un atome d'oxygène et d'azote sont donc plus « blindés » qu'un atome d'hydrogène ou de carbone. Ce champ magnétique influence celui des atomes voisins, ce qui induit un « blindage naturel ». Cela mène à une résonance des noyaux à une fréquence différente, ce qu'on appelle le déplacement chimique ($\Delta\delta$). Puisque le déplacement chimique est fortement influencé par l'environnement électrochimique de l'atome observé, celui-ci peut être influencé par les atomes qui lui sont liés et non liés. Donc, lorsqu'à proximité d'atomes ayant plus d'électrons, il y a donc un effet de « déblindage » sur l'atome observé. Par exemple, le noyau d'un atome d'hydrogène sera « déblindé » lorsque celui-ci se

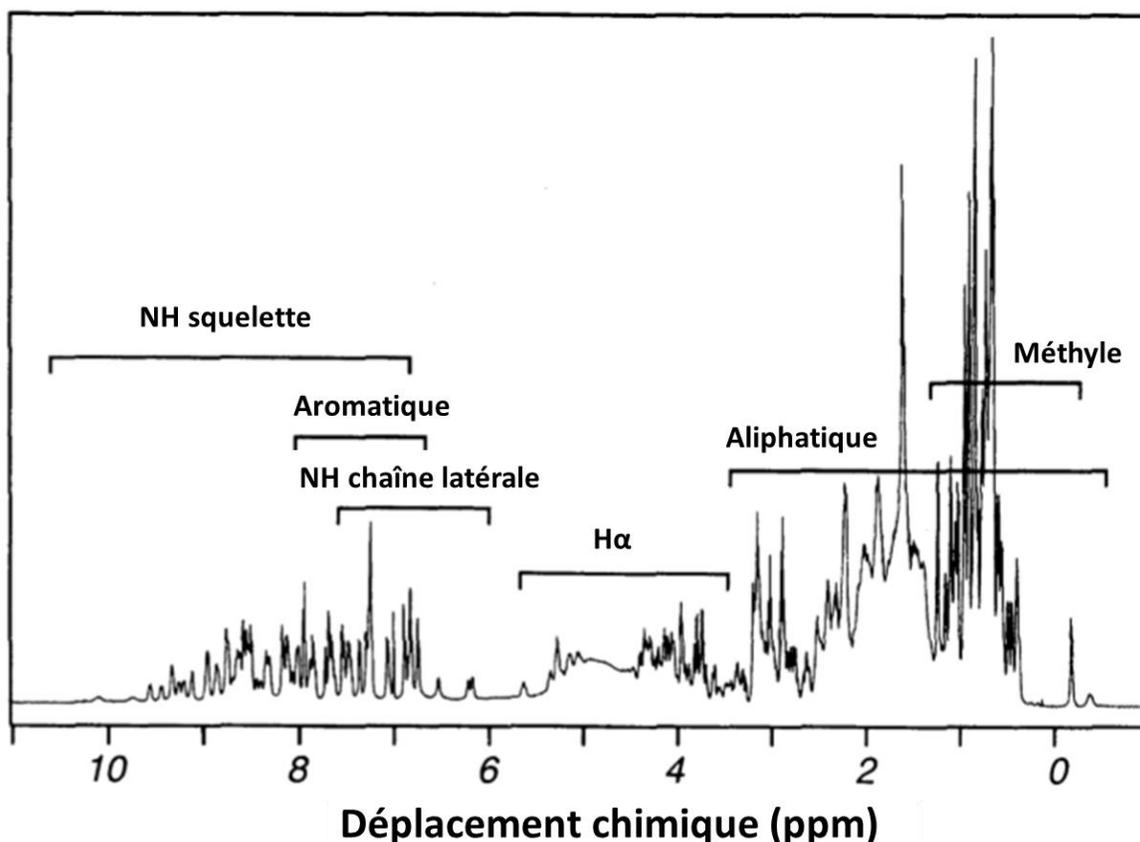


Figure 25: Déplacements chimiques de différents groupements présents dans les acides aminés. Le déplacement chimique de l'hydrogène est moins élevé lorsque celui-ci est lié à des atomes d'hydrogène (par exemple, méthyle, aliphatique) que dans un cycle aromatique ou lié à un atome d'azote. Exemple d'un spectre 1D de l'ubiquitine.

retrouve à proximité d'un atome d'azote que lorsqu'il se retrouve dans un groupement méthyle, car le champ magnétique induit par les électrons de l'azote aura un effet sur l'atome à proximité. Par conséquent, le déplacement chimique de l'hydrogène sera plus élevé

(Figure 25). Les déplacements chimiques observés avec les spectres donneront de l'information sur les atomes liés et non liés. Les données récoltées par rapport aux atomes non liés donneront de l'information sur le repliement de la protéine.

3.4.2 La RMN des protéines

Dans la détermination de la structure de protéines, différents types de spectres RMN peuvent être enregistrés. Il y a les spectres RMN 1D, où un seul atome est observé; ce type de RMN est très limité dans l'étude des macromolécules en raison du très grand nombre de chevauchement entre les pics dans les spectres. La RMN 2D est utilisée pour l'étude de protéines en plus de la RMN 3D et 4D. Dans le cadre de ce projet, des spectres 1D, 2D et 3D ont été mesurés. Les spectres 1D n'ont pas donné beaucoup d'information par rapport à la structure de la protéine, mais ils ont été utiles afin de déterminer la concentration réelle de SDS dans les échantillons. Le spectre 2D auquel on réfère le plus souvent est le ^{15}N -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Ce spectre permet d'observer la corrélation entre les noyaux d'hydrogène et les noyaux d'azote des groupements NH et NH₂ (Figure 16). Puisqu'il s'agit d'un spectre relativement court à enregistrer (4 heures), plusieurs de ces spectres ont été enregistrés afin d'observer la stabilité dans le temps de notre échantillon. Les spectres 3D qui ont été enregistrés incluent le HNCOC, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, CCONH et HCONH. Chacun de ces spectres donne de l'information sur la corrélation entre différents atomes d'un même résidu ou d'un résidu avec le résidu précédent. Les spectres HNCOC, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH et HNCACB permettent l'attribution des atomes du squelette. Les spectres CCONH et HCONH permettent l'attribution des atomes des chaînes latérales des acides aminés. Toutes les corrélations observées dans les différents spectres sont présentées dans l'Annexe 2. Dans l'étude de ces spectres 3D, la corrélation observée est celle entre un atome d'hydrogène et l'atome d'azote lui étant lié en plus d'un atome de carbone (CO, C α , C β , etc.) (Figure 26A). Les spectres 3D permettent d'observer moins de chevauchement entre les pics, mais il est préférable de travailler avec des tranches. Pour ce faire, les spectres 3D sont « coupés » en plan (Figures 26B et C) sur différents déplacements chimiques d'un axe d'un des atomes (du ^{15}N dans cet exemple). Des « tranches » peuvent aussi être faites (Figures 26D, E et F) afin

d'analyser les pics. Cette dernière méthode est très utile afin de déduire à quel acide aminé appartiennent les pics.

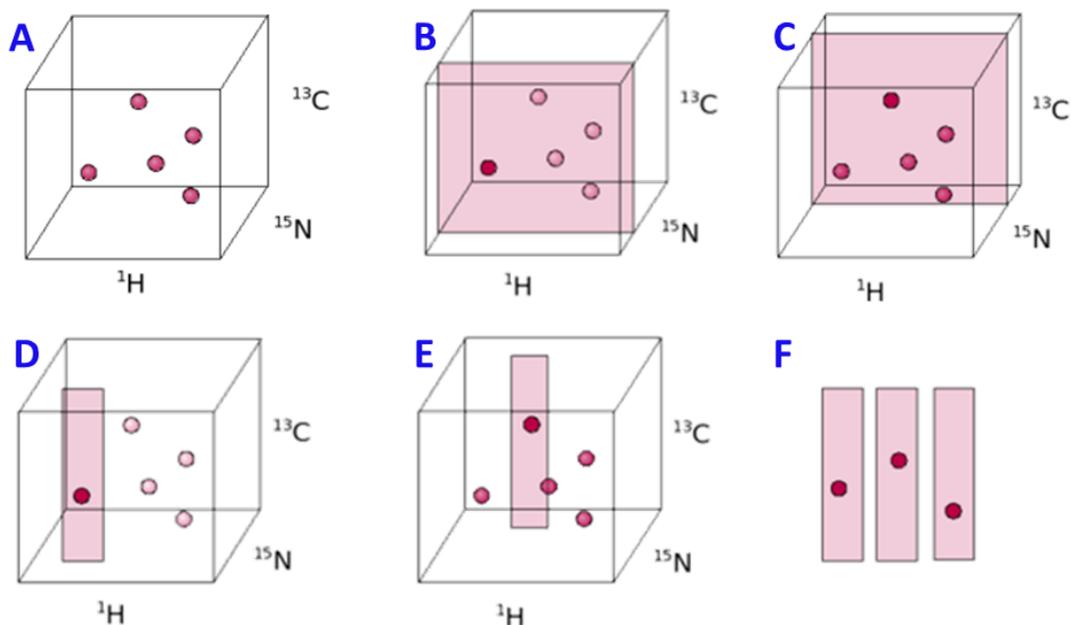


Figure 26: Représentation de l'analyse des spectres 3D. A) Le spectre 3D où ^1H est sur l'axe des x, ^{13}C sur l'axe des y et ^{15}N est sur l'axe des z. B) Un plan est coupé sur l'axe des z à un certain déplacement chimique pour observer la corrélation entre des atomes à ce déplacement chimique précis de l'azote. Le pic rouge foncé indique que le pic est dans le plan observé. Les pics roses sont à des déplacements chimiques plus élevés et ne sont pas dans le plan. C) Un plan est coupé sur l'axe des z à un déplacement chimique plus élevé qu'en B. Le pic rouge foncé indique que le pic est sur le plan observé. Les pics rose foncé sont à des déplacements chimiques moins élevés et ne sont pas dans le plan. D) et E) Tranches des plans en B et C prises à différents déplacements chimiques de l'axe des z. F) Montage des tranches afin d'analyser les pics. Image tirée et modifiée du site internet <http://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/assignment-theory/visualising-3d-spectra>

Un spectre 3D ^{13}C -HSQC NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) a aussi été enregistré. Il est basé sur l'effet nucléaire Overhauser (NOE). Celui-ci donne de l'information sur la proximité spatiale des atomes lorsque la protéine est repliée. Tel que mentionné précédemment, après une impulsion, le spin de l'atome retourne dans un état d'équilibre. Par contre, un spin seul est très long à se relaxer, mais la première cause de relaxation des atomes provient du champ magnétique local d'un spin à proximité, qui a un effet sur les atomes voisins en fonction de la distance entre deux noyaux. C'est ce que l'on appelle le NOE. Cet effet peut être observé jusqu'à une distance de 5 Å.

3.4.3 Attribution des atomes

Les spectres enregistrés ont été analysés grâce au logiciel *NMRViewJ*. Il s'agit d'un outil permettant de visualiser, analyser et organiser les diverses informations données par les spectres. Un des avantages est la possibilité d'étudier plusieurs spectres en même temps, facilitant ainsi l'analyse des pics et leur attribution aux différents atomes de la protéine. Une des fonctions le permettant est *RunAbout* qui permet d'organiser les spectres de manière à déduire les pics faisant partie d'un même résidu, du résidu précédent de celui observé et celui le suivant afin de faire l'attribution des pics aux résidus de la protéine (Figure 27). Cette méthode se base sur les « tranches » présentées précédemment (Figure 26F). Les premiers spectres avec lesquels l'attribution des pics a été faite sont les suivants : HNCOC, HNCACO, HNCOCA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, CCONH et HCONH. L'attribution des pics est par la suite transposée sur le spectre 3D NOESY. C'est à partir de l'attribution de ce spectre que les calculs ont été faits.

L'attribution des pics a aussi été utilisée pour prédire la structure secondaire par le logiciel *TALOS-N*. Ce programme a permis de prédire la structure secondaire de la protéine grâce à l'attribution des atomes à des déplacements chimiques (Shen and Bax 2013). Plus précisément, *TALOS-N* se sert des données RMN afin de prédire les angles de torsion ϕ , ψ et χ_1 en fonction des déplacements chimiques des N, NH, H α , CO C α et C β . Seulement l'attribution des pics des spectres des HCNO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH et HNCACB sont requis. La prédiction de la structure secondaire peut alors être faite avec le diagramme de Ramachandran qui se base sur les valeurs des angles de torsion obtenues par *TALOS-N*.

3.4.4 Calcul de la structure des protéines

Finalement, grâce à toute l'information récoltée par les différents spectres enregistrés, des calculs pour déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine ont été lancés avec le logiciel *CYANA*. En se basant sur les contraintes structurales, qui sont basées sur l'attribution des pics du spectre 3D NOESY pour les différents atomes constituant la protéine, ainsi que sur la prédiction de la structure secondaire faite par le logiciel *TALOS-N*, il est possible de

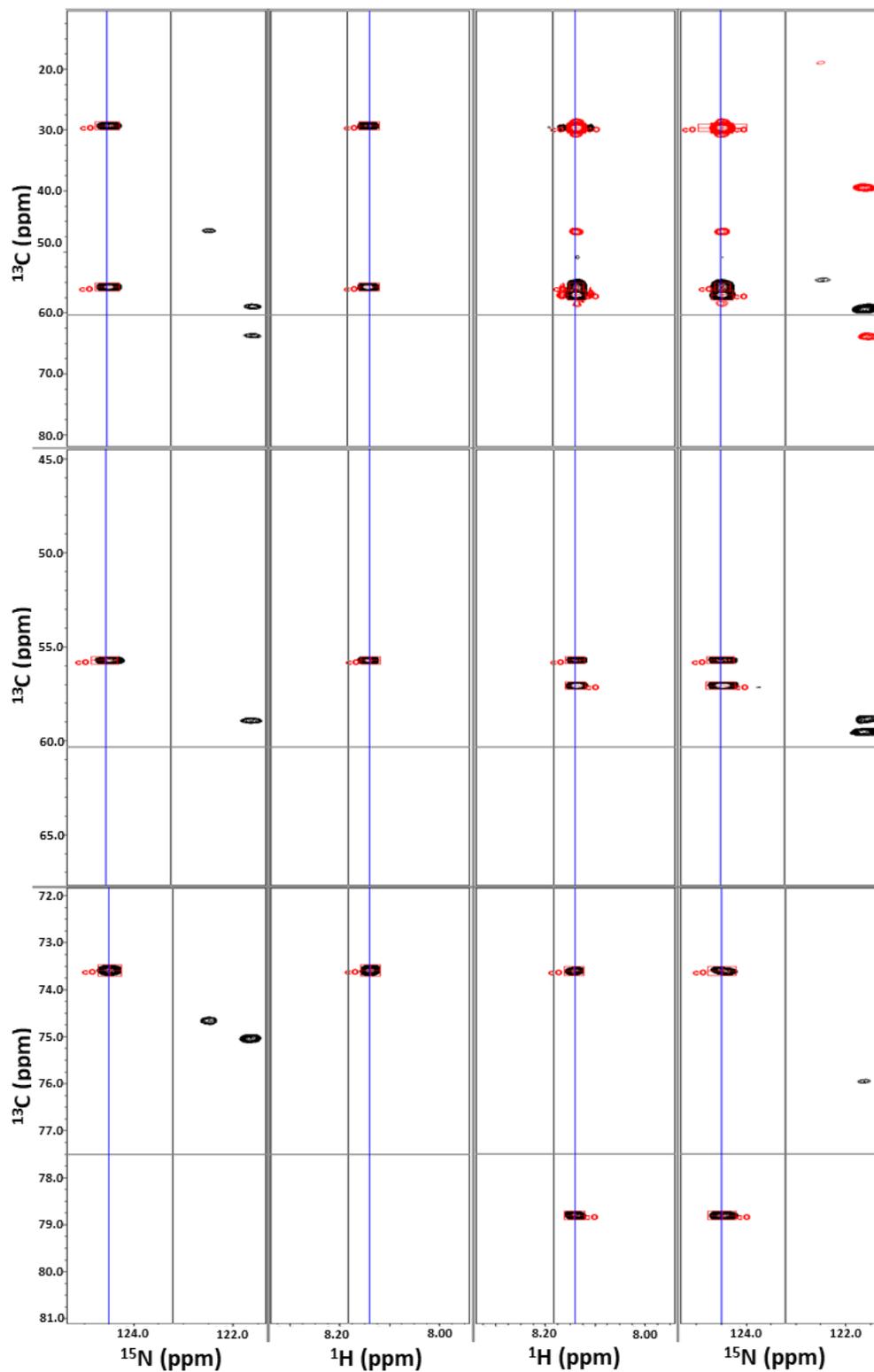


Figure 27: Exemple de vue du programme RunAbout de NMRViewJ. Les pics s'alignant sur la même ligne (ici en bleu) font partie d'un même groupe. Ce groupe rassemble le résidu observé, celui le précédent ainsi que celui le suivant. Le résidu observé peut être déduit en fonction des plans des différents spectres observés.

procéder aux calculs avec le logiciel *CYANA*. À la suite des calculs, 100 structures sont proposées et les 20 meilleures sont retenues et la RMSD entre ces 20 structures est calculée. Le script utilisé pour lancer les calculs sur *CYANA* est présenté en Annexe 4.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1 Purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 ¹⁵N ¹³C

À la suite de l'étape de purification par chromatographie d'affinité et du dessalage, il a été possible d'obtenir une grande quantité de protéine pure (21 mg/mL pour 1 L de milieu minimal). Selon l'analyse de l'intensité des bandes obtenues par électrophorèse, on évalue la pureté de la protéine à plus de 95%, ce qui est idéal pour les analyses par RMN. De plus, sur le gel SDS-PAGE, il est possible d'observer une seule bande correspondant à la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 (Figure 28). Cela permet de confirmer que nous avons uniquement la forme non-acylée dans notre échantillon et ainsi d'éliminer cette possible source d'hétérogénéité lors de l'analyse des spectres RMN.

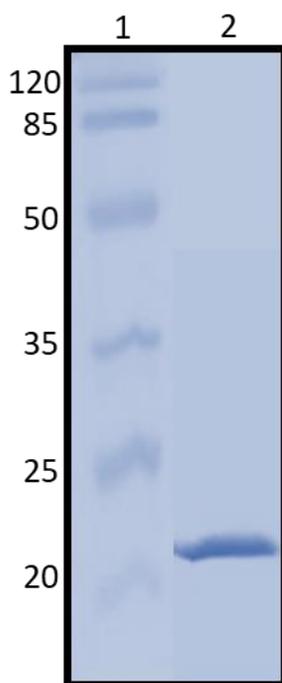


Figure 28: Gel SDS-PAGE de la purification de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196. Puits 1 : Marqueur de masse moléculaire (kDa). Puits 2 : 1 µg de protéine. Une seule bande est présente et la pureté de la protéine est évaluée à >95%.

4.2 Stabilité dans le temps de la C161S/C168S/S175R-tLRAT pour l'enregistrement des spectres RMN

Afin de s'assurer d'avoir des spectres RMN de qualité à long terme, il a fallu déterminer la température à laquelle la C161S/C168S/S175R-tLRAT était la plus stable pendant une période de quatre semaines. Il a précédemment été décrit dans la littérature que la tLRAT est

une protéine thermostable (Horchani, Bussieres et al. 2014). Par contre, ces études portaient sur l'incubation de la protéine pendant 20 minutes à des températures variant entre 20 et 100 °C. Des études de la stabilité dans le temps de la tLRAT ont donc été faites en analysant son patron de migration par électrophorèse SDS-PAGE ainsi que son activité enzymatique et en procédant à la mesure de spectres de masse et de dichroïsme circulaire (CD). Ces mesures ont été faites avec la tLRAT afin d'être en mesure d'évaluer son activité enzymatique car la C161S/C168S/S175R-tLRAT a une activité négligeable. La tLRAT a toutefois été préparée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la RMN (concentration de 1 mM, tampon citrate 10 mM à pH 6,0, DTT 50 mM et DSS 1 mM) à l'exception du milieu minimal. En effet, un milieu minimal (section 3.1) ne contenant pas de $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ et de $^{13}\text{C-glucose}$ a été utilisé. À partir de l'échantillon concentré, un test d'activité a été fait selon les conditions habituelles, soit en utilisant le DHPC comme premier substrat et le rétinol comme second substrat. Le rétinyl ester produit lors de la réaction est extrait avec de l'hexane et est séparé du tout-*trans* rétinol par HPLC (Horchani, Bussieres et al. 2014). Des aliquotes de l'échantillon incubé à chaque température (25, 35 et 45 °C) ont été prélevées à chaque semaine pendant une période de quatre semaines afin de procéder aux analyses. La Figure 29 montre le patron d'électrophorèse de la tLRAT par SDS-PAGE, après 4 semaines d'incubation à chaque température. On peut observer l'apparition de bandes supplémentaires lorsque la protéine est incubée à 35 et 45 °C mais plus importantes à 45 °C. Un tel comportement a été observé seulement après 4 semaines d'incubation. Ces premières données ont permis d'observer l'effet de la température à plus long terme sur la protéine.

Les analyses de spectrométrie de masse ont aussi permis d'observer la dégradation de la tLRAT à toutes les températures étudiées après 4 semaines d'incubation (Figure 30). En effet, comparativement au jour 0 (Figure 30A), des pics additionnels apparaissent après 4 semaines, ce qui indique une dégradation partielle de la tLRAT. L'intensité des pics à 25 °C (Figure 30B) est un peu moins importante que celle observée à 35 et 45 °C (Figures 30C et D, respectivement). L'observation de pics à 25°C était surprenante car aucune dégradation n'était apparente par électrophorèse à cette température (Figure 30B).

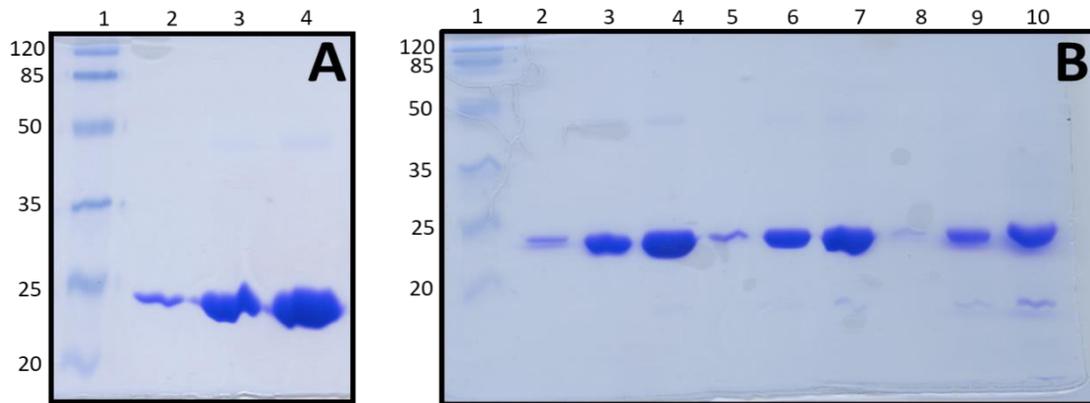


Figure 29: Patrons d'électrophorèse SDS-PAGE de la tLRAT au jour 0 (A) et incubée à 25, 35 et 45 °C pendant 4 semaines (B). A) tLRAT au jour 0. Puits 1 : marqueur de masse moléculaire (kDa). Puits 2, 3 et 4 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT. B) tLRAT après 4 semaines d'incubation. Puits 1 : marqueur de masse moléculaire. Puits 2, 3 et 4 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT incubée à 25 °C. Puits 5, 6 et 7 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT incubée à 35 °C. Puits 8, 9 et 10 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT incubée à 45 °C (résultats obtenus par Line Cantin).

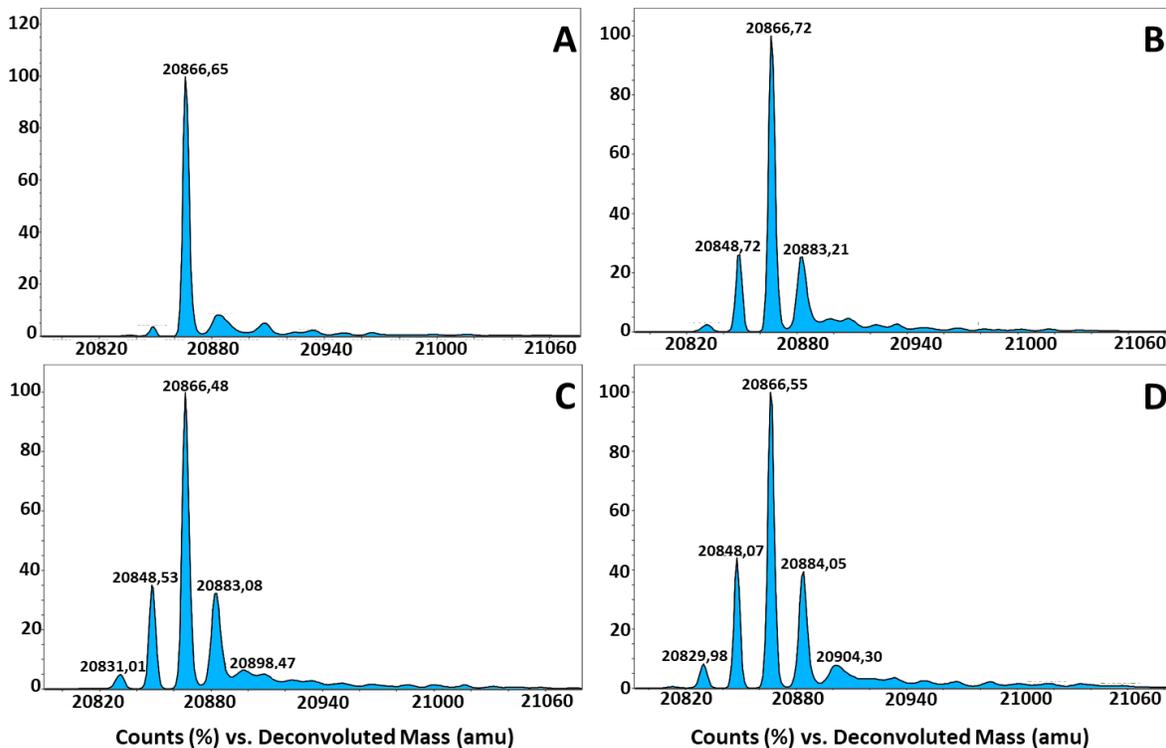


Figure 30: Spectres de masse de la tLRAT au jour 0 (A) et incubée pendant 4 semaines à 25 (B), 35 (C) et 45 °C (D). Après 4 semaines d'incubation, des pics additionnels apparaissent, ce qui indique une certaine instabilité temporelle de la tLRAT (résultats obtenus par Sarah Roy).

Par ailleurs, les analyses en CD n'ont pas permis de tirer des conclusions valables. En effet, comparativement au jour 0, on n'observe pas ou peu d'effet de la température sur la structure secondaire de la tLRAT (Figure 31). Cela permet de conclure que l'instabilité de la tLRAT observée grâce aux patrons d'électrophorèse et par spectrométrie de masse n'est pas reliée à une dénaturation de la structure globale de la protéine et que le CD n'est pas assez sensible pour détecter l'apparition d'une dégradation partielle de la protéine.

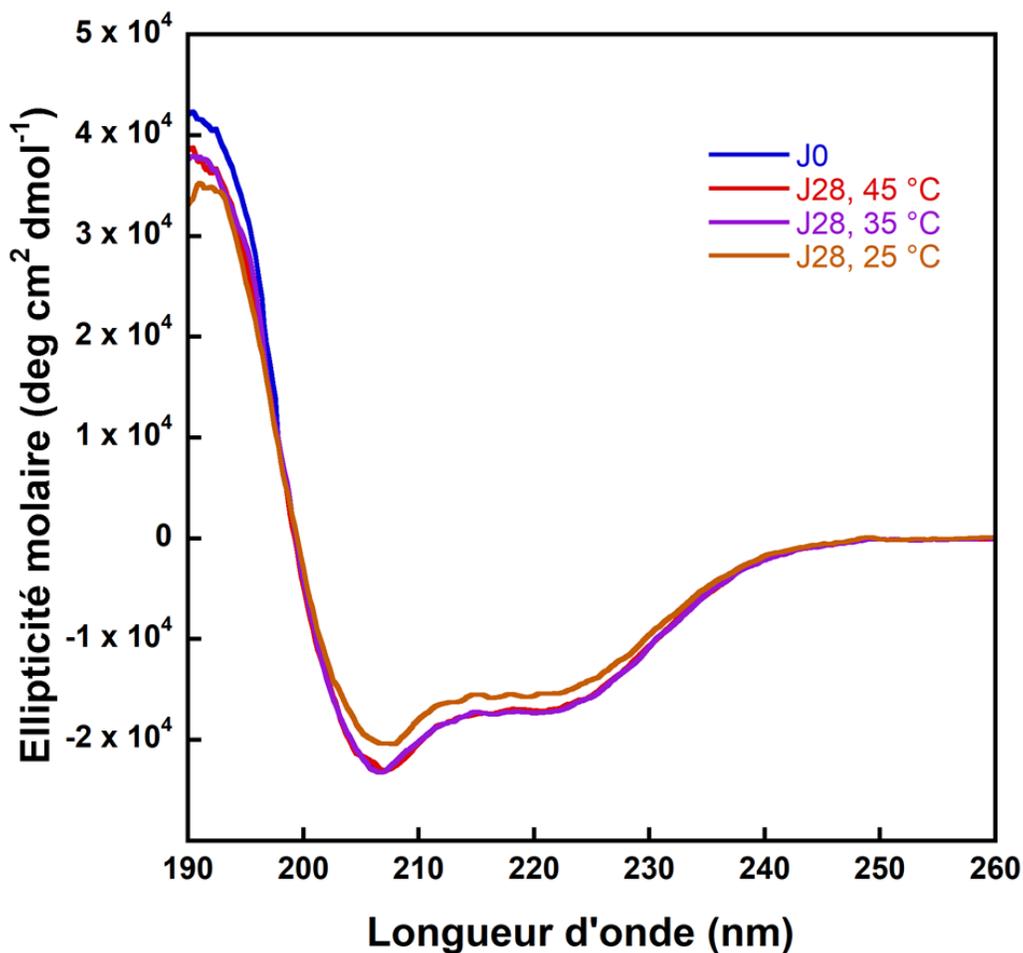


Figure 31: Spectres CD de la tLRAT. Aucune différence importante n'est constatée entre la tLRAT au jour 0 et après une incubation de 4 semaines à 25, 35 et 45 °C (résultats obtenus par Sarah Roy).

Finalement, ce sont les tests d'activité enzymatique qui ont permis d'évaluer plus adéquatement la stabilité de la tLRAT en fonction du temps. En effet, les mesures d'activité ont permis de conclure que la tLRAT était encore très stable après 4 semaines d'incubation à 25 °C où

elle maintient 98% d'activité résiduelle (Figure 32). La tLRAT incubée à 35 °C a aussi démontré une très bonne stabilité en fonction du temps avec 82% d'activité résiduelle après 4 semaines. Toutefois, la tLRAT a perdu une très grande partie son activité catalytique après une incubation de 4 semaines à 45 °C (24% d'activité résiduelle). Cela permet de conclure que la tLRAT est encore très active lorsqu'elle est incubée à 25 et 35 °C pendant quatre semaines, mais qu'une incubation à 45 °C mène à une dégradation de la protéine importante qui affecterait son repliement et la position relative des résidus catalytiques.

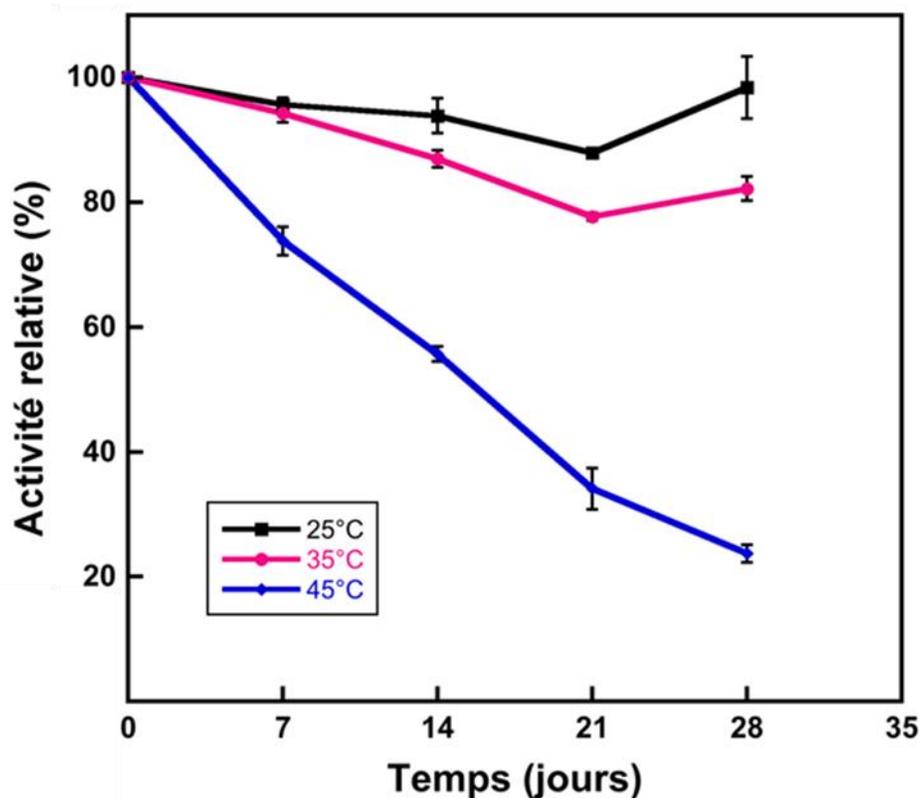


Figure 32: Mesure de l'activité enzymatique de la tLRAT incubée à 25, 35 et 45 °C pendant une période de 4 semaines. L'incubation à 45 °C mène à une perte importante de l'activité enzymatique de la tLRAT (résultats obtenus par Line Cantin).

À la suite de ces résultats, des mesures d'activité enzymatique et d'analyse des patrons d'électrophorèse ont été faites avec un nouvel échantillon dans les mêmes conditions mais en incubant la protéine pendant quatre semaines à 35, 37 et 40 °C. Les patrons d'électrophorèse de la tLRAT incubée à 37 °C montrent des signes de dégradation similaires (Figure 33) à ceux observés à 35 °C (Figure 29) et de la dégradation significativement plus importante

pour celle incubée 40 °C (Figure 33). Ces données indiquent qu'il ne serait pas plus avantageux de procéder à des mesures RMN à 40 °C qu'à 45 °C où une dégradation significative avait aussi été observée (Figures 29 et 30).

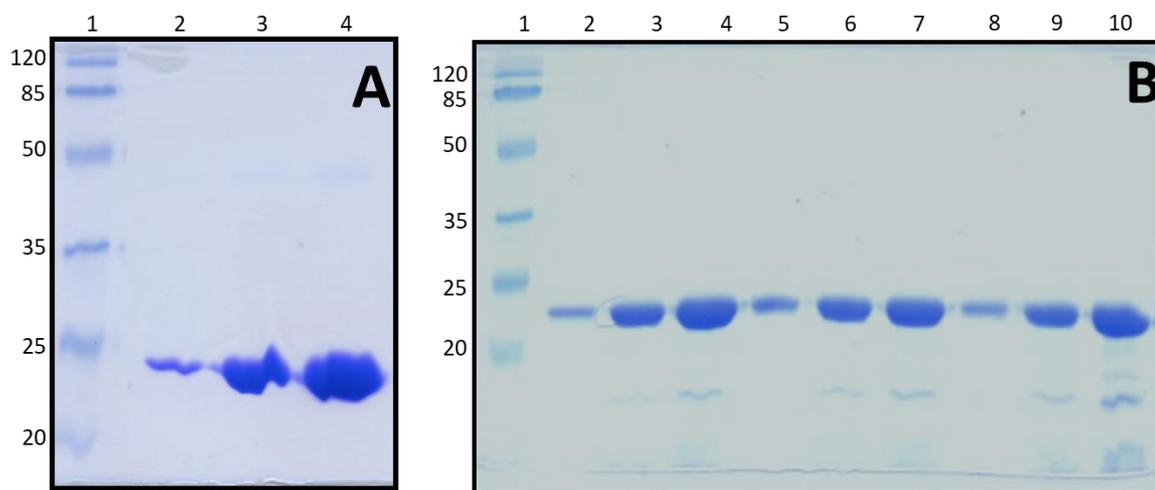


Figure 33: Patrons d'électrophorèse SDS-PAGE de la tLRAT au jour 0 (A) et incubée à 35, 37 et 40 °C pendant 4 semaines (B). A) tLRAT au jour 0. Puits 1 : marqueur de masse moléculaire (kDa). Puits 2, 3 et 4 : 1, 5 et 10 µg de tLRAT, respectivement. B) tLRAT après 4 semaines d'incubation. Puits 1 : marqueur de masse moléculaire. Puits 2, 3 et 4 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT incubée à 35 °C. Puits 5, 6 et 7 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT incubée à 37 °C. Puits 8, 9 et 10 : 1, 5 et 10 µg, respectivement, de tLRAT incubée à 40 °C.

Finalement, les mesures d'activité enzymatique de la tLRAT ont démontré qu'un pourcentage équivalent d'activité résiduelle est observé après une incubation à 37 °C (81%, Figure 34) et à 35 °C (82%, Figure 34). Cependant, l'incubation à 40 °C (Figure 34) n'a pas un effet aussi néfaste pour la stabilité de la tLRAT pendant 4 semaines comparativement à 45°C (Figure 32) avec une activité enzymatique résiduelle de 68%, comparativement au jour 0.

À la suite de ces analyses, puisque la tLRAT semble adéquatement stable pendant une période de quatre semaines lorsqu'elle est incubée à 25, 35 et 37 °C, nous avons choisi de mesurer les spectres RMN à 37 °C. Ainsi, la protéine sera stable tout au long de l'enregistrement des spectres en plus d'utiliser une température plus élevée afin d'obtenir des spectres de meilleure qualité. De plus, cela permettra d'obtenir une structure à la température physiologique.

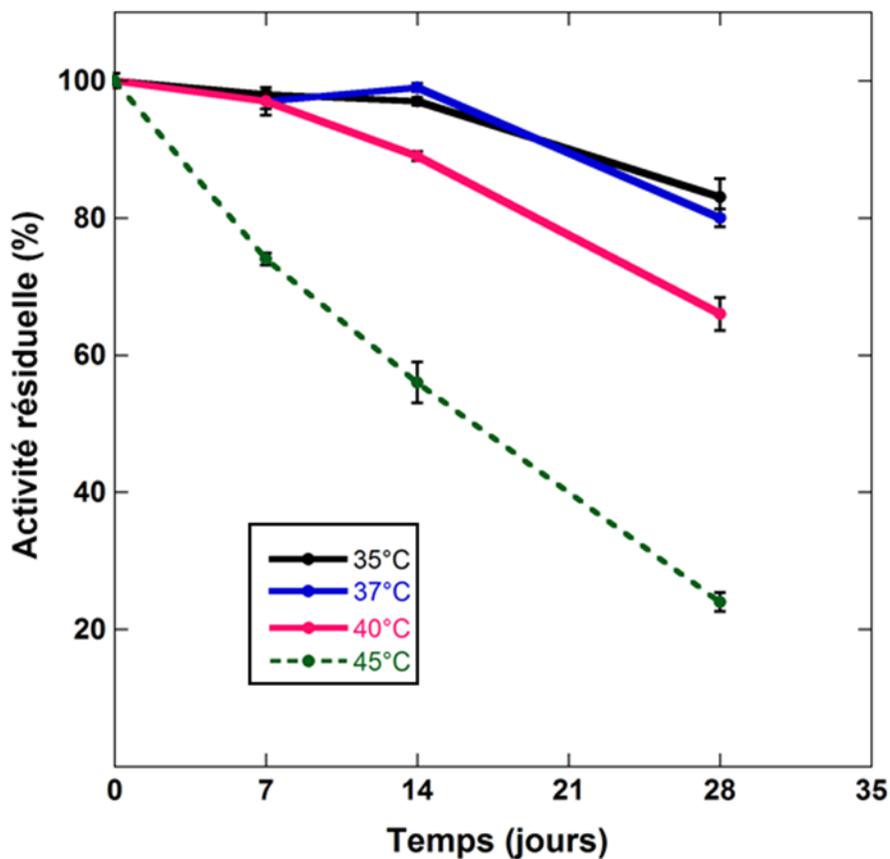


Figure 34: Mesures d'activité enzymatique de la tLRAT incubée à 35, 37 et 40 °C pendant une période de 4 semaines. L'incubation à 35 et 37 °C mène à une réduction similaire de l'activité enzymatique. Une incubation à 40 °C résulte en une perte d'activité un peu plus importante, sans toutefois être aussi drastique qu'à 45 °C.

4.3 Attribution des pics des spectres RMN et conformations mineures

En combinant les spectres ^{15}N -HSQC, HNCOC, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, CCONH et HCONH, 3 892 pics ont été attribués à différents atomes constituant la protéine. La Figure 35 montre l'attribution faite avec le spectre ^{15}N -HSQC. Ce spectre a permis d'observer en premier lieu que la protéine ne forme pas d'homodimères, contrairement aux observations précédentes d'autres groupes (Jahng, Cheung et al. 2002, Bok, Ruiz et al. 2003). En effet, les pics de la C161S/C168S/S175R-tLRAT seraient plus larges si elle était sous la forme d'homodimères. Par ailleurs, il est possible de voir des pics correspondant à des conformations alternatives, ce qui indique la présence d'hétérogénéités qui ne résulteraient pas de l'auto-acylation (en raison de l'absence des

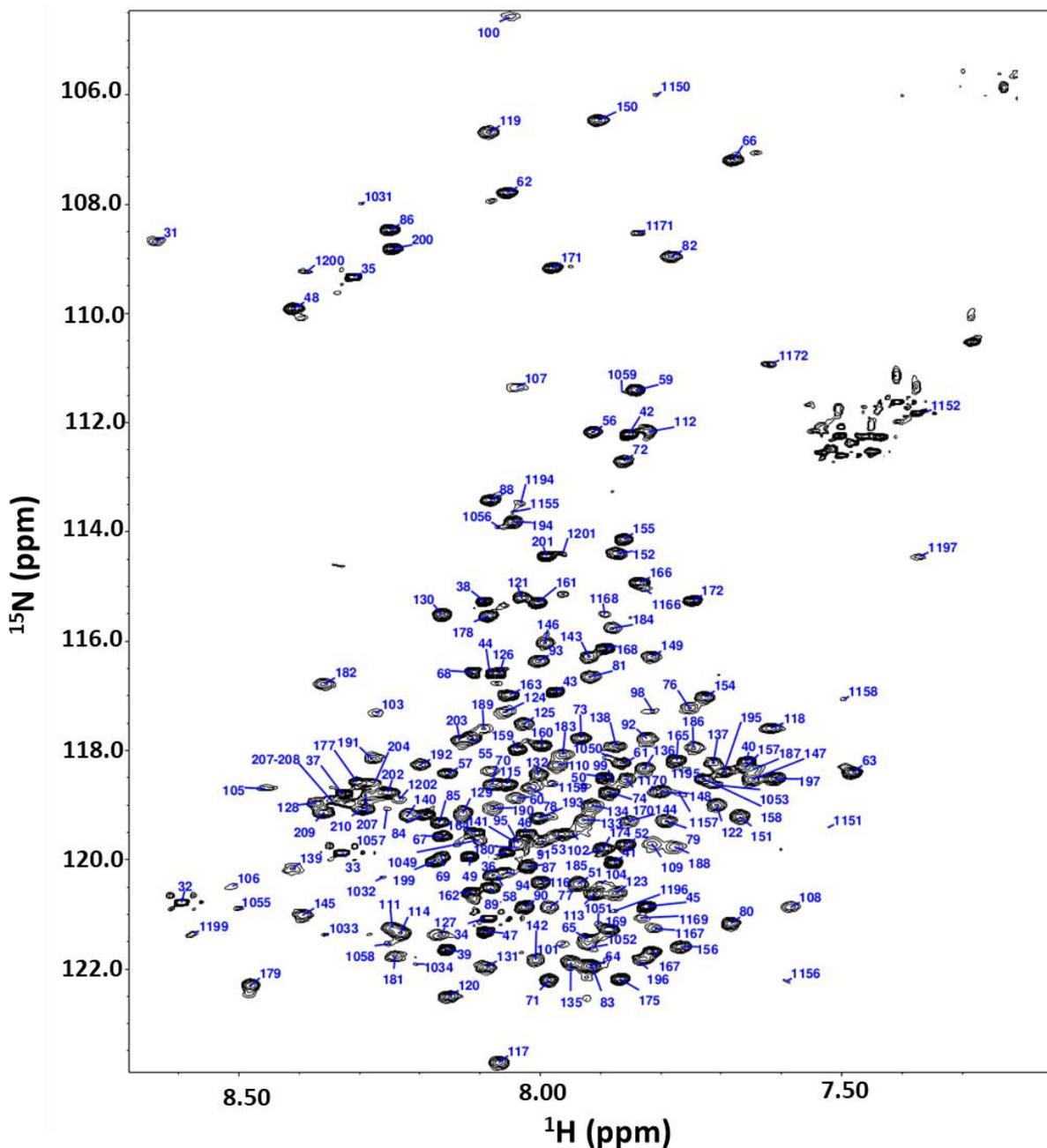


Figure 35: Attribution des pics du spectre ^{15}N -HSQC de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196. L'attribution des pics à une conformation mineure de la protéine commence par 1000 (par exemple, 31 et 1031).

C161 et C168) ni de la présence d'une méthionine en position 30 (confirmé par spectrométrie de masse, Figure 19). Des conformations mineures ont été identifiées aux positions suivantes : 30-34, 48-59, 149-159, 165-172 et 193-200. La raison de ces observations est encore inconnue, mais elles pourraient être liées à l'hétérogénéité de l'échantillon. À l'exception

de la Y154, aucun résidu essentiel à la catalyse n'est retrouvé dans ces conformations mineures.

En tenant compte uniquement des atomes attribuables (en enlevant, par exemple, les atomes d'oxygène, les atomes d'azote présents dans les chaînes latérales et les cycles aromatiques), les atomes du squelette ont été attribués à 97%, alors que 94% des atomes des chaînes latérales ont été attribués. Par conséquent, l'attribution des pics des atomes des différents acides aminés de la C161S/C168S/S175R-tLRAT a été faite à 96%. Ces attributions ont par la suite été transposées sur le spectre de type NOESY afin de compléter l'attribution en plus d'obtenir de l'information sur la proximité spatiale de quelques atomes. Ainsi, 3 123 pics de ce spectre ont été attribués. C'est à partir de cette dernière attribution que les calculs ont été faits pour obtenir la structure de la protéine.

4.4 Prédiction de la structure secondaire de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 avec *TALOS-N*

Tel que mentionné dans la section 2.2, *TALOS-N* est un logiciel permettant la prédiction de la structure secondaire d'une protéine à partir de seulement les déplacements chimiques des N, NH, H α , CO, C α et C β . Ainsi, seulement les données des spectres HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH et HNCACB ont été pris en considération pour effectuer cette prédiction. La Figure 36 montre que la structure secondaire de la C161S/C168S/S175R-tLRAT est composée uniquement d'hélices- α et de pelote statistique et ce, avec un très haut niveau de confiance. Cela concorde grandement avec les résultats obtenus pour la C161S/C168S-tLRAT-His₁₀ 31-196 (Figure 14), où seulement des hélices- α ainsi que de la pelote statistique ont été obtenues en utilisant la même procédure. L'absence de feuillets- β vient encore contredire les modèles de prédiction (Figures 10 et 11).

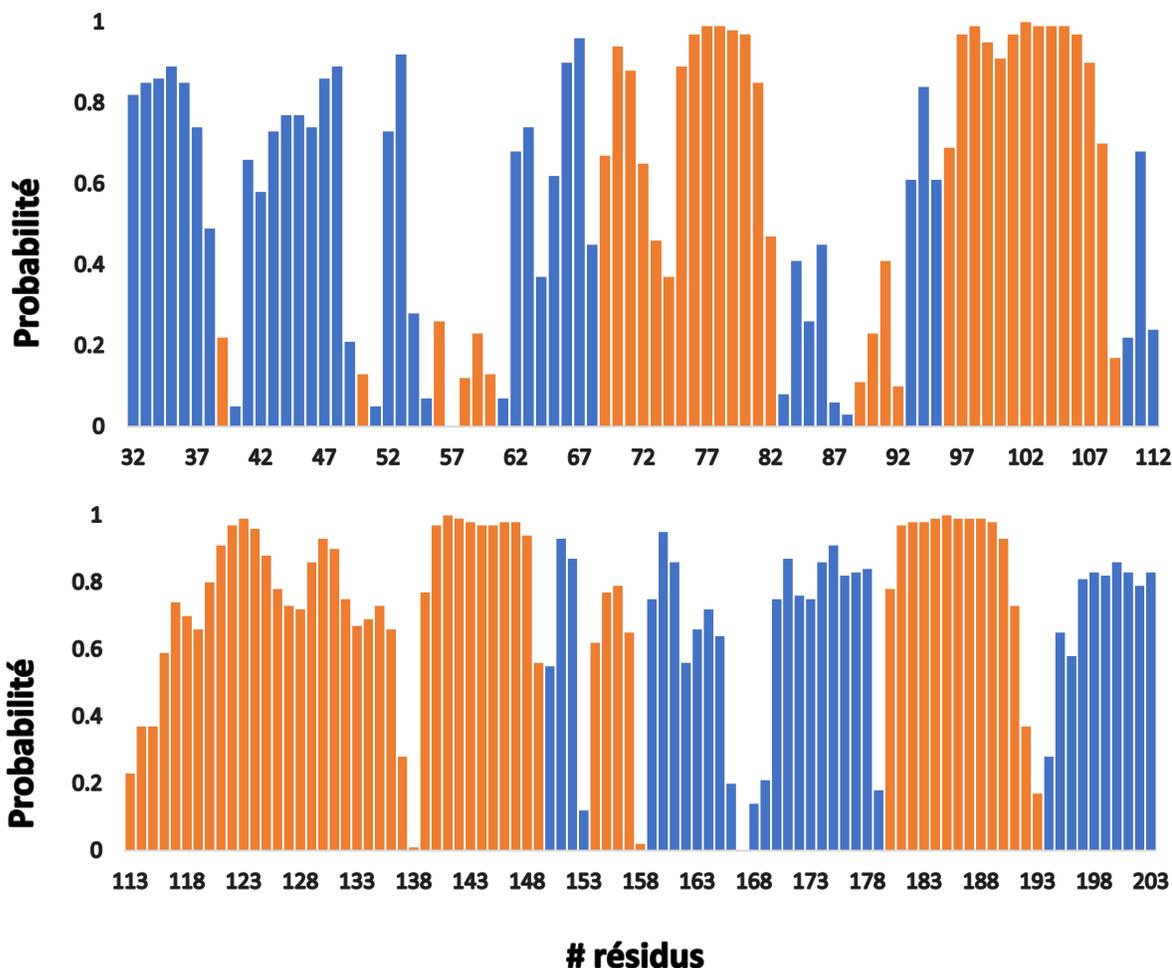


Figure 36: Prédiction de la structure secondaire de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 avec TALOS-N. Les bandes indiquent sur une échelle de 0 à 1 la probabilité d'obtenir des hélices- α (bande orange), des feuillettes- β (bande grise) et de la pelote statistique (bande bleue). TALOS-N prédit pour la protéine (résidus E32 à H203) une forte probabilité d'avoir uniquement des hélices- α et de la pelote statistique.

4.5 Influence de la mutation S175R sur les déplacements chimiques des atomes de la C161S/C168S-tLRAT

Avant de procéder aux calculs pour obtenir une structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT, des analyses ont d'abord été faites en comparant les déplacements chimiques des atomes de cette protéine avec ceux obtenus avec la C161S/C168S-tLRAT par Stéphane Gagné. Il faut toutefois noter les spectres RMN de la C161S/C168S-tLRAT ont été enregistrés à 45 °C (au lieu de 37 °C), ce qui aura une influence sur la différence entre les déplacements chimiques, en particulier pour les HN et ^{15}N . En procédant au calcul de la différence entre

les déplacements chimiques des atomes de la C161S/C168S/S175R-tLRAT et de la C161S/C168S-tLRAT, il a été possible d'identifier des résidus dont les déplacements chimiques sont modifiés en conséquence de la mutation S175R. Tout d'abord, en comparant les déplacements chimiques des atomes ^{15}N , on remarque une différence importante induite par la mutation sur l'azote des résidus suivants : l'acide aspartique en position 33 (D33), isoleucine en position 77 (I77), la valine en position 92 (V92), la thréonine en position 172 (T172), l'isoleucine en position 174 (I174), l'arginine en position 175 (S175R) et l'acide glutamique en position 177 (Q177) (Figure 37). Pour la R175, il est normal de noter une aussi grande différence au niveau du déplacement chimique de l'azote. En effet, en modifiant la sérine pour une arginine, deux acides aminés très différents du point de vue de leur taille, leur charge et leur polarité, il était attendu à ce que cette modification influence le déplacement chimique de cet atome. De plus, dans les Figures 38, 39 et 40, le même type de changement important est observé en raison de la mutation S175R. Dans le cas des résidus T172, I174 et Q177, l'observation de changements des déplacements chimiques étaient aussi attendus puisque ce sont des résidus proches de la position de la mutation dans la séquence en acides aminés. Dans le cas de la I77 et la V92, il ne s'agit pas de changements importants dans leur déplacement chimique, mais il sera intéressant de vérifier au niveau de la structure 3D si ces résidus sont proches de la R175 lorsque la protéine est repliée ou si ces différences ne devraient pas être considérées comme étant significatives. Finalement, pour la D33, une différence notable est observée, mais celle-ci ne devrait pas être prise en considération. En effet, la C161S/C168S/S175R-tLRAT diffère de la C161S/C168S-tLRAT non seulement au niveau de la mutation S175R additionnelle, mais en plus elle comprend les acides aminés 30 à 196 alors qu'on retrouve les acides aminés 31 à 196 pour la C161S/C168S-tLRAT. Ainsi, il est normal qu'il y ait des différences dans les déplacements chimiques pour les résidus à proximité du résidu 30 lorsque les deux protéines sont comparées, car les déplacements chimiques dépendent des atomes des résidus voisins. De plus, la comparaison entre les déplacements chimiques a été faite uniquement pour les résidus 32 à 203 (les résidus A30 et G31 sont omis car la A30 est présente seulement dans la C161S/C168S/S175R-tLRAT alors que la G31 est le premier résidu de la C161S/C168S-tLRAT et n'a pas été attribuée). Par conséquent, l'analyse des premiers résidus pour les Figures 38, 39 et 40 sera omise puisque le même raisonnement est valable.

Par la suite, en comparant les déplacements chimiques des carbonyles, il a été possible d'observer une influence de la mutation S175R sur le déplacement chimique du carbonyle de la glycine en position 100 (G100) (Figure 38). En effet, ces données permettent de postuler que les résidus S175 et G100 sont à proximité lorsque la tLRAT est repliée, mais cela reste à confirmer avec la structure 3D.

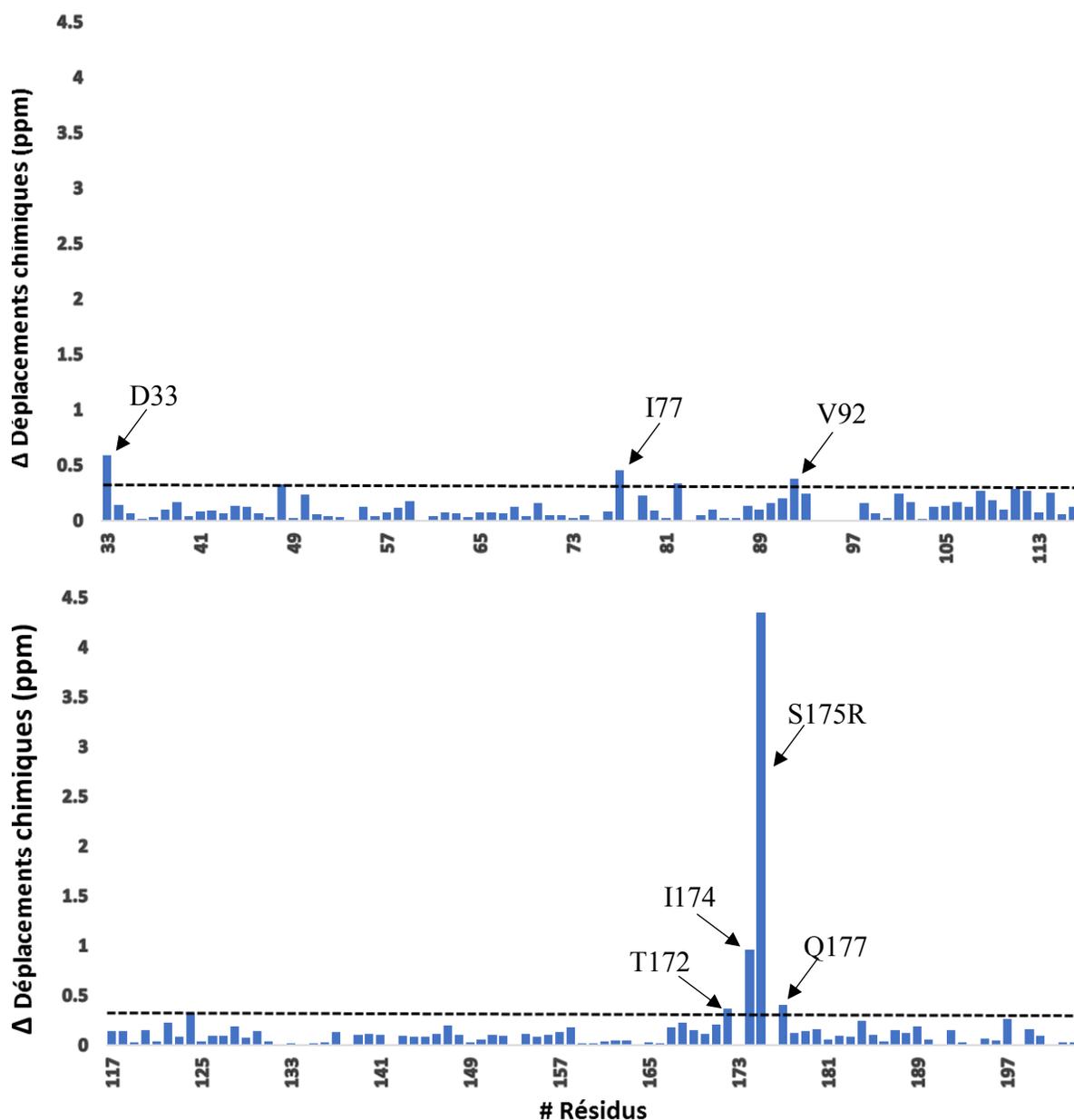


Figure 37: Différences entre les déplacements chimiques des atomes ^{15}N des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT. Le trait pointillé correspond à la moyenne plus deux fois l'écart-type ($\bar{x} + 2\sigma$) des valeurs de déplacement chimique pour les résidus 33 à 203. Des différences plus importantes dans les déplacements chimiques sont observées au niveau des résidus D33, I77, V92, T172, I174, R175 et Q177.

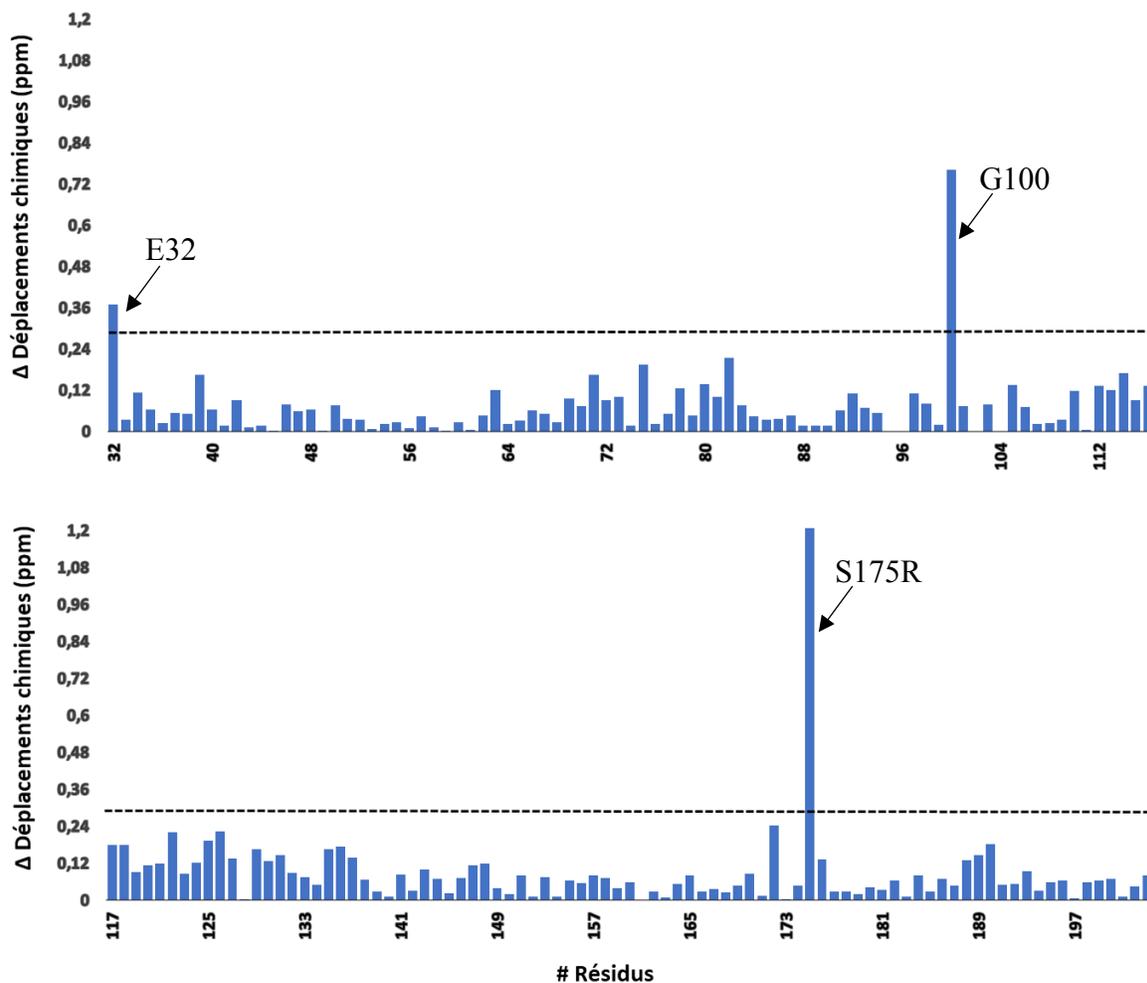


Figure 38: Différences entre les déplacements chimiques des atomes des carbonyles (^{13}CO) des mutants *C161S/C161S/S175R-tLRAT* et *C161S/C168S-tLRAT*. Le trait pointillé correspond à la moyenne plus deux fois l'écart-type ($\bar{x}+2\sigma$) des valeurs de déplacement chimique pour les résidus 32 à 203. Des différences plus importantes dans les déplacements chimiques sont observées au niveau des résidus E32, G100 et R175.

Lors de l'analyse des $\text{C}\alpha$, un changement significatif dans le déplacement chimique est observé pour la thréonine en position 82 (T82, Figure 39). Cette différence est toutefois assez faible; il est donc difficile de conclure qu'il s'agit vraiment d'une influence de la mutation S175R ou d'une différence plus élevée que la moyenne lors de l'attribution des atomes pour les deux protéines.

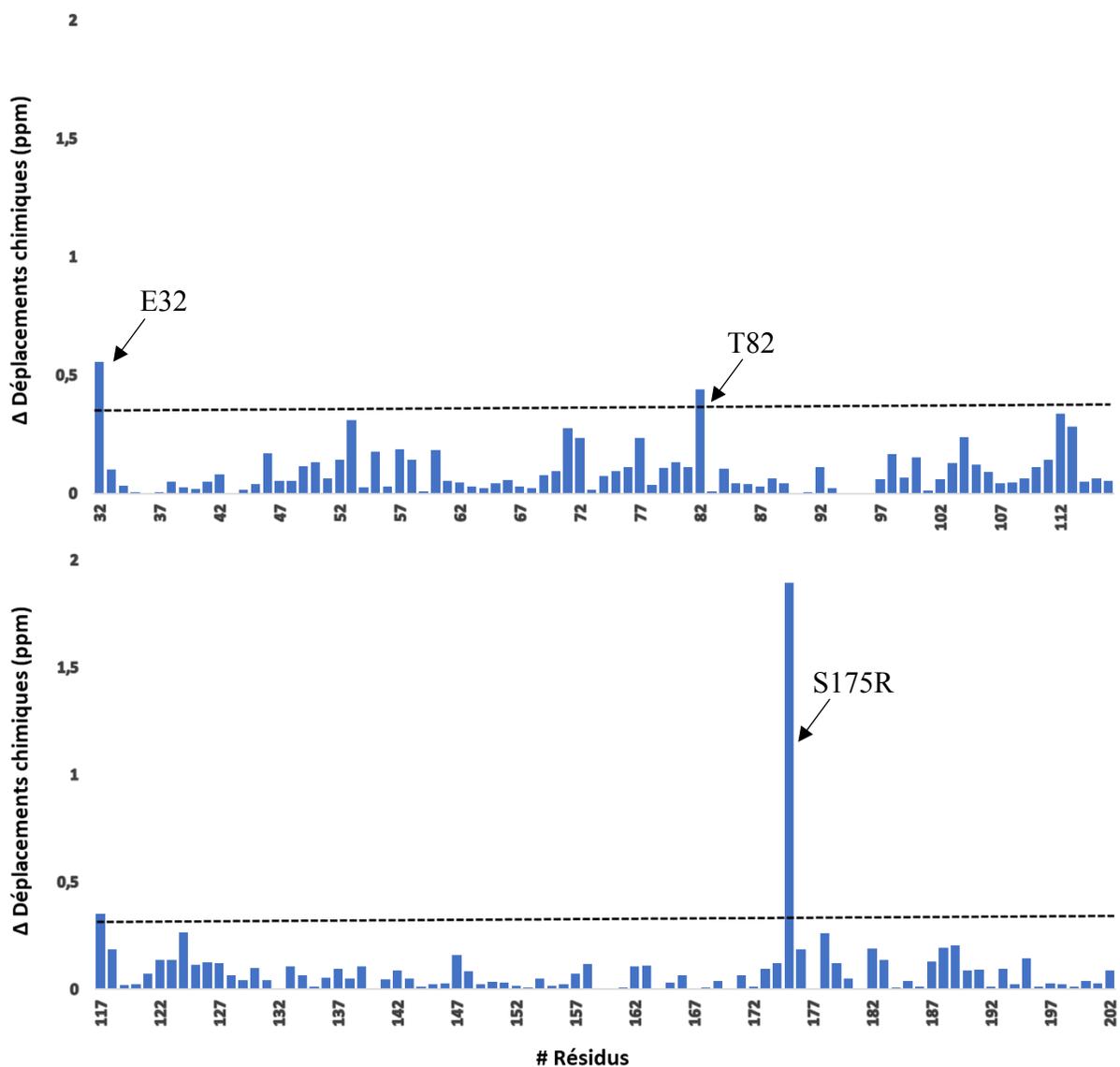


Figure 39: Différences entre les déplacements chimiques des atomes Ca des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT. Le trait pointillé correspond à la moyenne plus deux fois l'écart-type ($\bar{x}+2\sigma$) des valeurs de déplacement chimique pour les résidus 32 à 202. Des différences plus importantes dans les déplacements chimiques sont observées au niveau des résidus E32, T82 et R175.

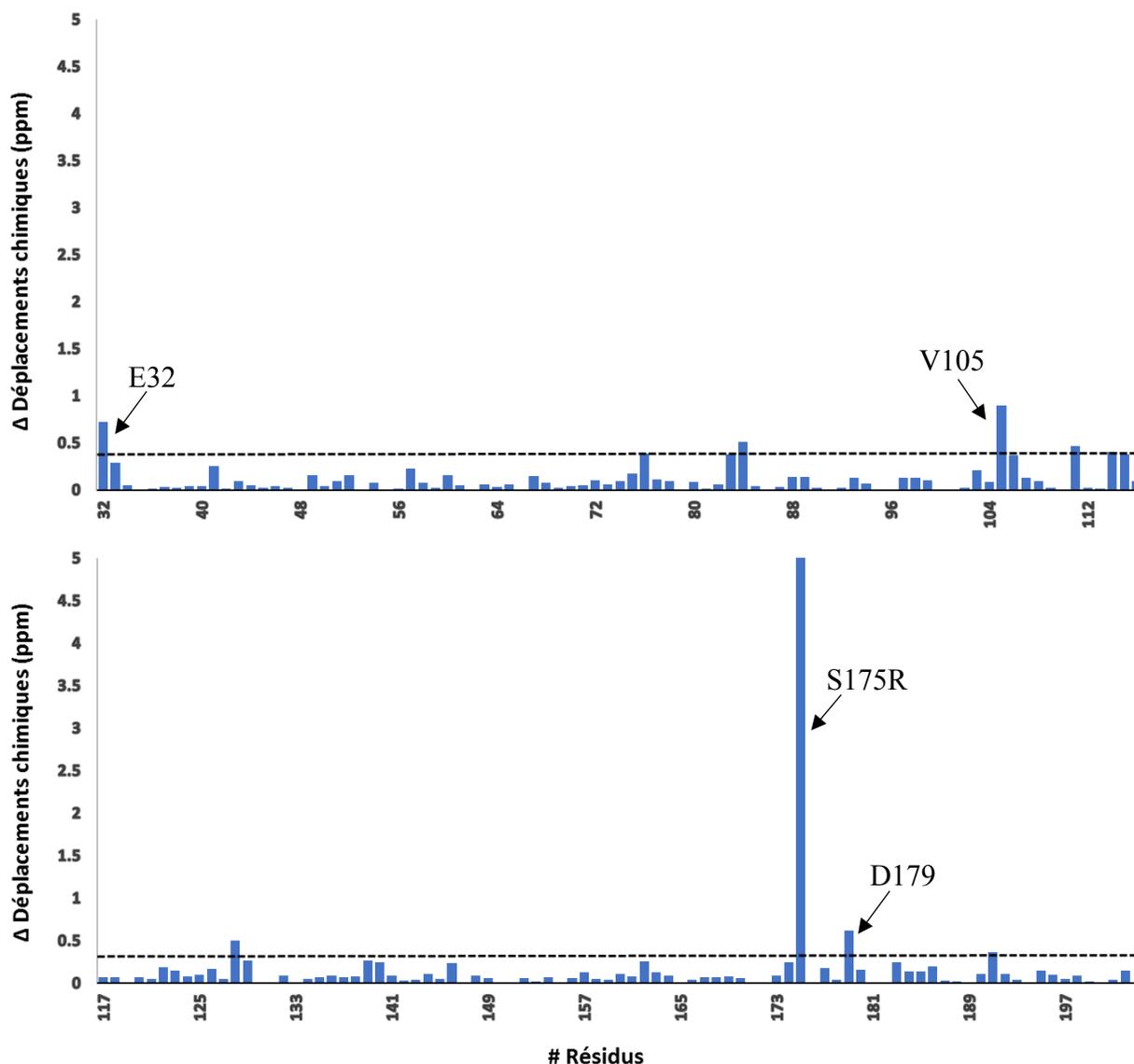


Figure 40: Différences entre les déplacements chimiques des atomes C β des mutants C161S/C161S/S175R-tLRAT et C161S/C168S-tLRAT. Le trait pointillé correspond à la moyenne plus deux fois l'écart-type ($\bar{x}+2\sigma$) des valeurs de déplacement chimique pour les résidus 32 à 202. Des différences plus importantes dans les déplacements chimiques sont observées au niveau des résidus E32, V105, R175 et D179.

Enfin, les déplacements chimiques entre les atomes des C β ont été comparés en Figure 40. Une différence considérable au niveau de la valine en position 105 (V105) est observée, ce qui permet de postuler que cet acide aminé serait proche de la R175 lorsque la protéine est repliée; cette possibilité doit donc être confirmée avec la structure 3D. De plus, une différence

dans les déplacements chimiques des C β de l'acide aspartique en position 179 est aussi observée. Cette disparité pourrait être attribuée à la mutation S175R en raison de la proximité de ces résidus dans la séquence.

Tel que mentionné précédemment, la mutation S175R mène à une perte complète de l'activité enzymatique de la tLRAT, même si cette mutation ne correspond pas à un résidu essentiel à la catalyse. Il est donc probable que la modification d'une sérine pour une arginine en position 175 intervienne sur des résidus importants pour la catalyse. Il est à noter que, selon les données existantes, la G100 et la V105 ne sont pas des résidus qui semblent être essentiels pour la catalyse. Ils pourraient toutefois jouer un rôle important dans l'activité de la protéine. En effet, les résidus 96 à 109 pourraient faire partie d'une hélice amphiphile qui jouerait un rôle dans l'activité enzymatique de la LRAT. De plus, il a été montré qu'il était possible pour une protéine apparentée d'acquérir la capacité de lier la vitamine A comme substrat en substituant les résidus 41-57 de la HRASLS3 pour les résidus 76-105 de la LRAT murine (Golczak, Sears et al. 2015). La HRASLS3 ne possède pas l'activité enzymatique nécessaire pour produire du rétinyl ester en utilisant la vitamine A comme substrat. Par contre, ces auteurs ont montré que la protéine chimérique HRASLS3/LRAT était capable de former du rétinyl ester en présence de vitamine A. Cela a permis de conclure que des résidus contenus dans le segment 76-105 de la LRAT murine sont importants dans l'activité catalytique de la LRAT, sans toutefois mettre en évidence quels résidus pourraient spécifiquement jouer ce rôle. Il est important de noter que ces résidus de la protéine murine sont conservés dans la protéine humaine (Annexe 3). Ces observations concordent avec nos données montrant que les résidus G100 et V105 du segment 76-105 subissent des modifications en conséquence de la présence d'une sérine au lieu de l'arginine 175, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la perte complète d'activité de ce mutant de la LRAT.

4.6 Structure tridimensionnelle de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196

Les calculs ont permis d'obtenir une structure tridimensionnelle de la C161S/C168S/S175R-tLRAT-His₁₀ 30-196 (Figure 41). Cette structure concorde avec la prédiction de la structure secondaire par *TALOS-N*. En effet, elle inclut seulement des hélices- α et de la pelote statis-

tique. Aucun feuillet ou brin- β n'est présent dans la structure. Les calculs ont permis de générer les 20 structures les plus probables de la C161S/C168S/S175R-tLRAT. Par la suite, la RMSD entre ses structures est calculée. Tel que mentionné précédemment, plus la RMSD est petite, plus les structures obtenues convergent vers une structure similaire. À la suite des calculs, la RMSD des atomes du squelette de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 est de $14,8 \pm 2,0 \text{ \AA}$, ce qui est très élevé et indique que le repliement des structures obtenues est différent, mais pas leur composition en hélices- α . Les statistiques structurales obtenues à la suite de calculs sur *CYANA* sont en Annexe 5.

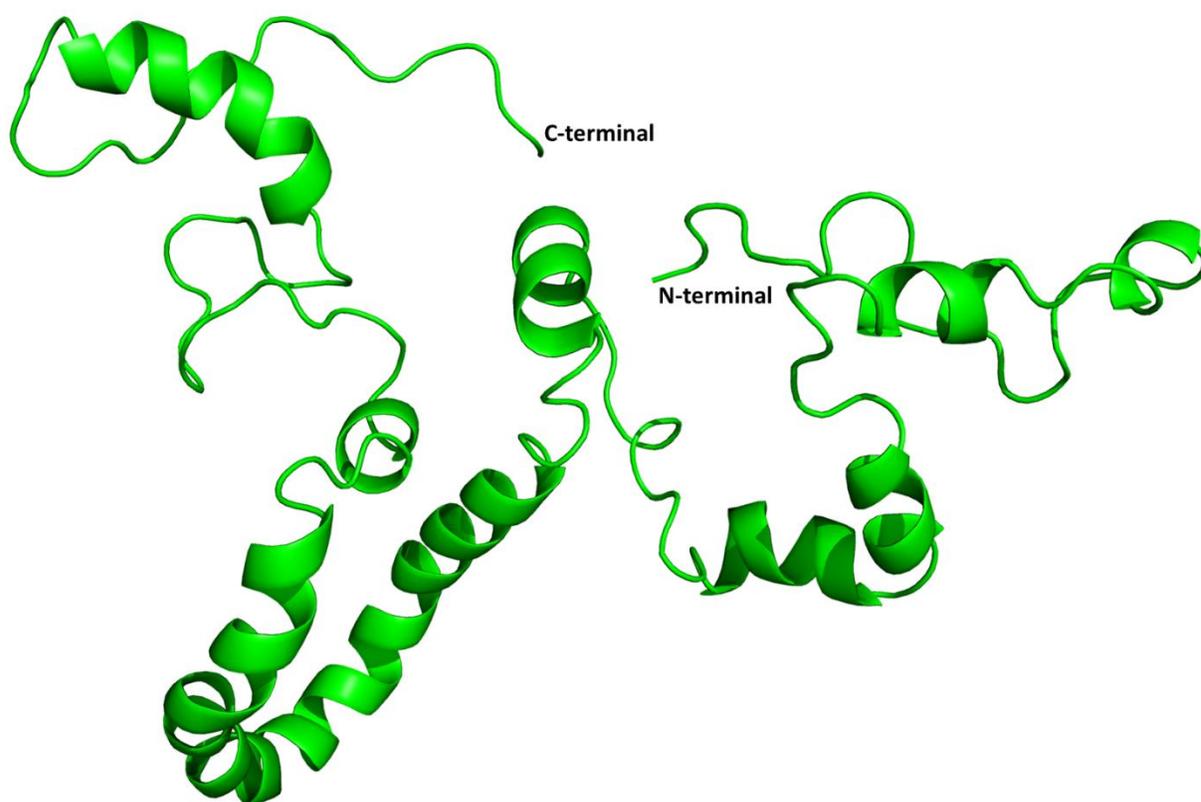


Figure 41: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 déterminée par RMN. La structure présentée est celle ayant la plus basse énergie parmi les 20 structures obtenues ($14,45 \text{ \AA}^2$).

En comparant la prédiction faite par *TALOS-N* (Figure 36) pour la structure secondaire de la C161S/C168S/S175R-tLRAT avec la structure 3D en Figure 41, il est possible d'observer une très grande ressemblance dans la composition en hélices- α de la protéine. En effet, à quelques résidus près, le contenu en hélices- α est le même. Dans la structure 3D en Figure

41, les hélices- α sont présentes aux positions 49-51, 55-60, 68-74, 76-84, 97-104, 110-149, 154-158 et 179-192 tout comme celles qui sont prédites en Figure 36 (résidus 39, 50, 55-60, 69-82, 89-92, 96-109, 113-149, 154-158 et 180-193).

Il est intéressant de noter la distance entre les différents résidus catalytiques dans la structure du mutant S175R de la tLRAT obtenue par RMN. Les résidus essentiels à la catalyse sont mis en évidence dans les Figures 42 et 43. La distance entre ces résidus a été calculée (Figure 43). Contrairement à ce que l'on s'attendrait pour des résidus impliqués dans une activité

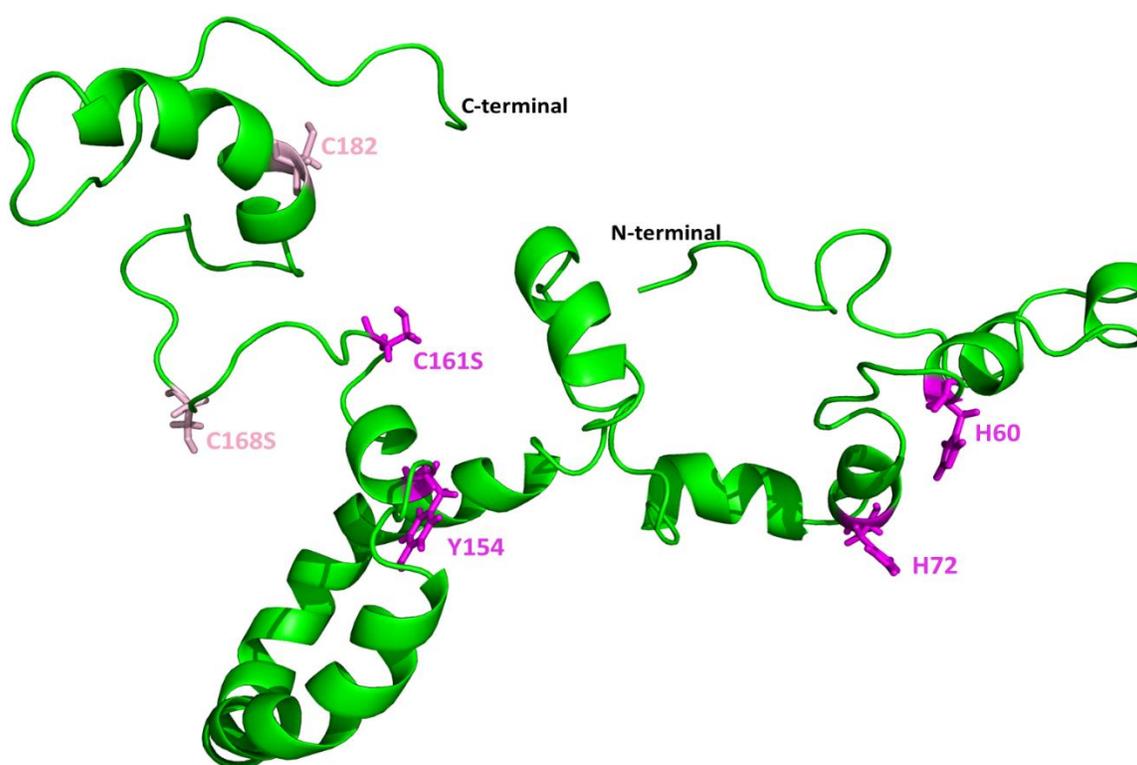


Figure 42: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196. Les résidus essentiels à la catalyse (H60, H72, Y154 et C161S) sont en bâtonnets mauves. Les C168S et C182 sont en bâtonnets roses.

catalytique, ils sont relativement éloignés les uns des autres. En effet, il y a 13,2 Å entre les deux histidines (H60 et H72) et 35,5 Å sépare la H60 et la C161S. De plus, 29 Å sépare la H72 de la Y154. La plus courte distance entre deux résidus (Y154 et C161S) est de 8,2 Å. De plus, il a aussi été possible d'observer le positionnement de la C168 (C168S dans ce cas-ci) par rapport aux résidus catalytiques (Figure 42). Celle-ci se trouve relativement proche

de la C161, ce qui implique qu'en cas de mauvais fonctionnement de la C161, la C168 peut prendre la relève en raison de sa proximité. Par ailleurs, la C182 est beaucoup plus éloignée, ce qui rendrait ainsi difficile son implication potentielle dans le processus d'acylation. Puisque ces résidus sont importants dans la catalyse, selon les informations existantes, on serait porté à croire qu'ils devraient se retrouver à proximité les uns des autres à des fins énergétiques et optimales. Il ne faut toutefois pas omettre l'hypothèse que lorsque la LRAT lie une chaîne acyle et/ou le rétinol, des changements de conformation peuvent se produire. Ces changements dans la structure pourraient faire en sorte que les résidus catalytiques se retrouvent plus proches des uns des autres. Tout dépend donc de la compréhension du mécanisme d'activité enzymatique de la LRAT qui est l'objet de la thèse de doctorat d'une collègue au laboratoire. En effet, afin de comprendre en détail le mécanisme d'activité enzymatique de la LRAT, il faut déterminer la structure de ses différents intermédiaires catalytiques (voir section Conclusions).

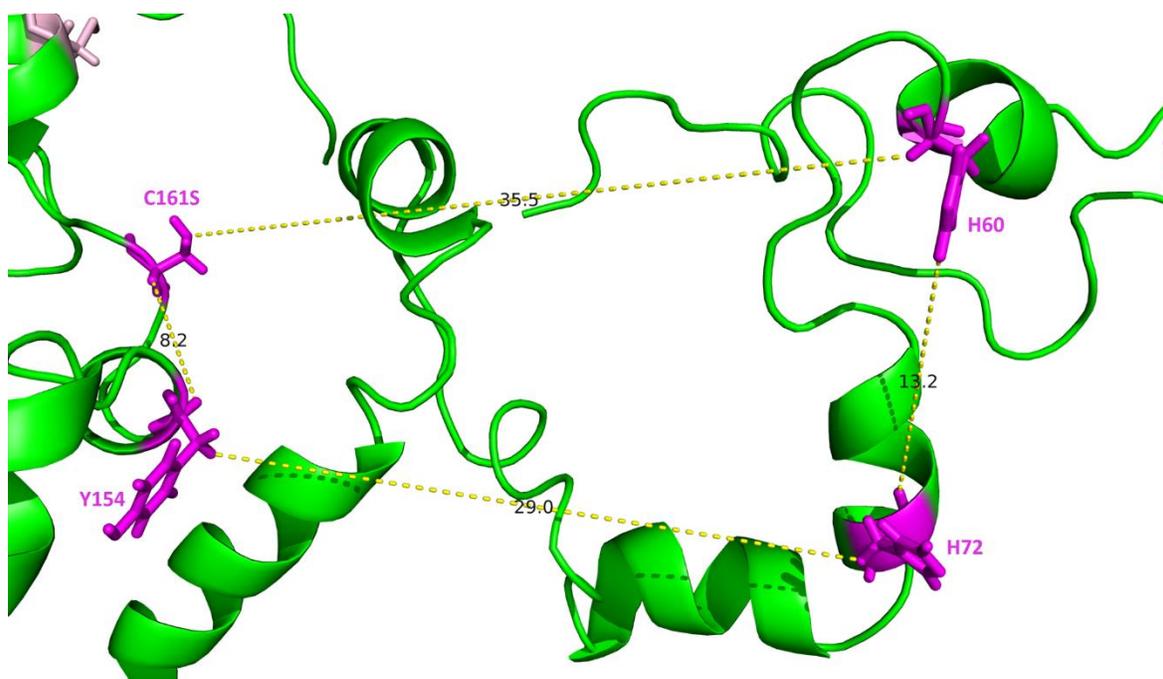


Figure 43: Zoom sur les résidus catalytiques de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196. Les distances entre les différents résidus catalytiques sont indiquées en Å.

Par la suite, il est intéressant d'observer l'emplacement dans la structure 3D des résidus impliqués dans les différentes mutations responsables de maladies de l'œil (Figure 44). Ainsi,

il n'est pas étonnant de constater la proximité entre la mutation Y61D et le résidu catalytique H60. Cela permet de postuler que cette mutation pourrait avoir une influence directe sur ce résidu catalytique, ce qui pourrait mener à une réduction de la liaison du rétinol et/ou de l'activité acyltransférase. Il faut par ailleurs se rappeler qu'il est très peu probable que les

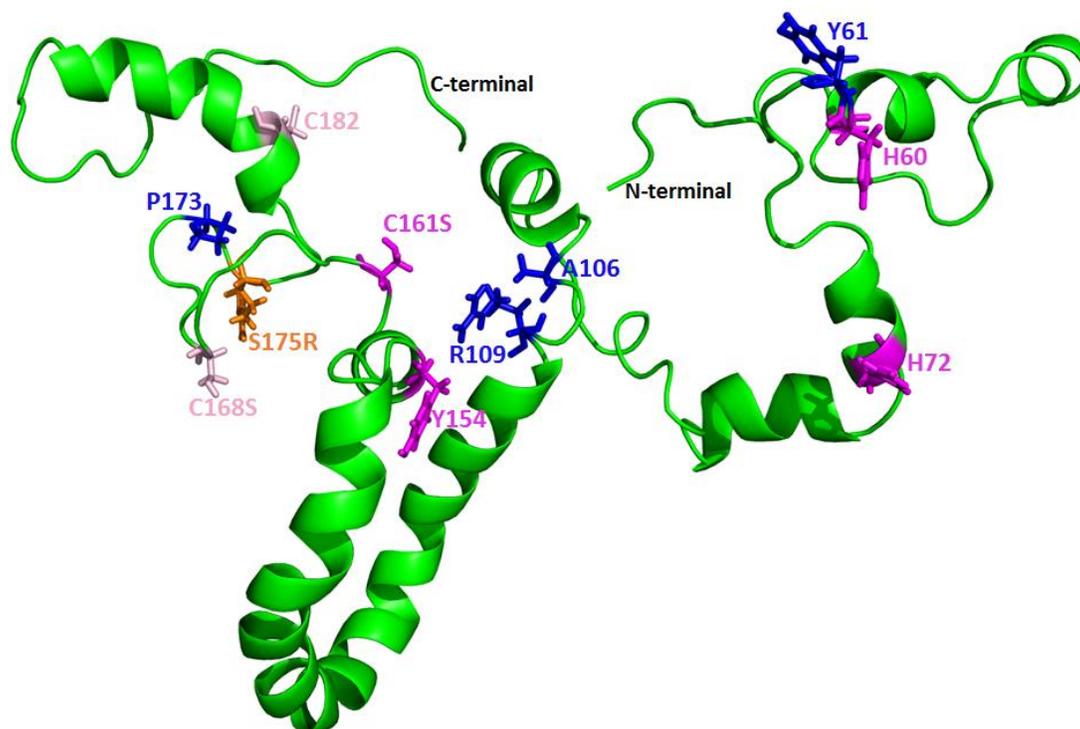


Figure 44: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196. Les résidus essentiels à la catalyse (H60, H72, Y154 et C161) sont représentés par des bâtonnets mauves. Les résidus touchés par des mutations liées aux maladies de l'œil sont représentés par des bâtonnets bleus à l'exception de la mutation S175R qui est en orange. La C182 et la mutation C168S sont représentées par des bâtonnets roses.

mutations naturelles mènent à un défaut dans l'activité phospholipase A1 et d'acylation de la C161 en raison de la présence de deux bandes en SDS-PAGE (section 2.3). De plus, il est possible de postuler que les mutations A106T et R109L (ou R109C) auraient un impact sur les résidus catalytiques C161 et Y154 en conséquence de leur proximité. L'introduction de ces mutations pourraient aussi engendrer des changements de conformation menant à des problèmes de liaison du rétinol. D'autre part, la mutation P173L pourrait avoir un effet sur le résidu C161 aussi à cause de leur relative proximité (Figures 44 et 45). Finalement, dans le

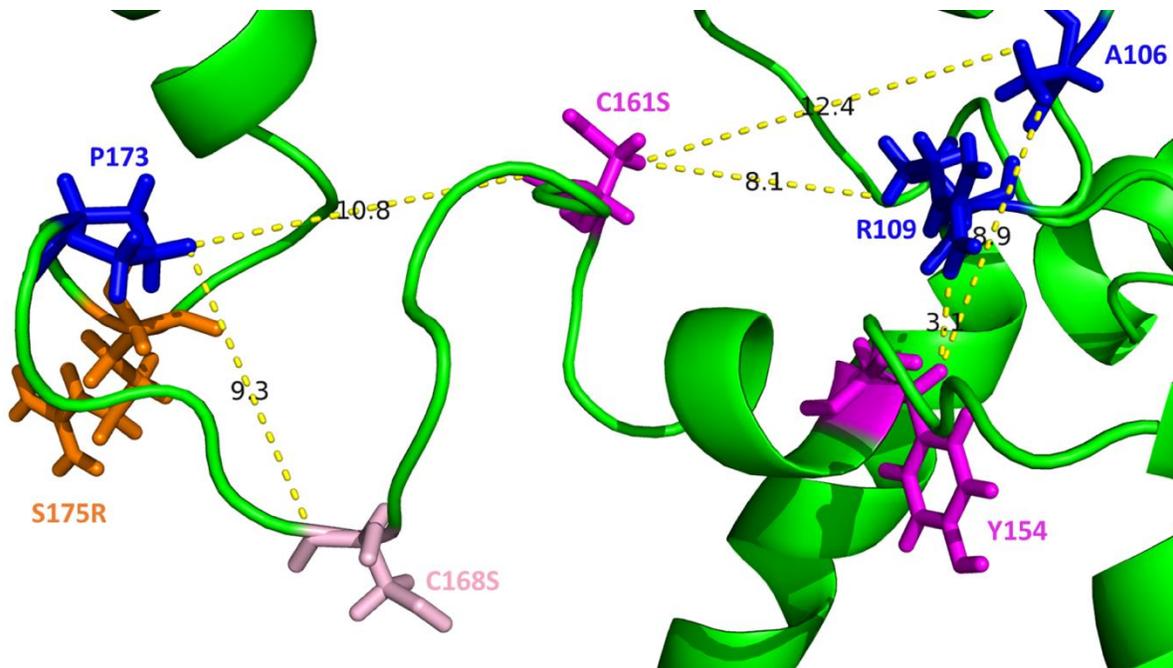


Figure 45: Zoom montrant les résidus catalytiques C161S et Y154, les cystéines C168S et C182 et des résidus affectés par des mutations naturelles (A106, R109, P173 et S175R). C161S et Y154 sont représentées par des bâtonnets mauves. C168S est représentée par des bâtonnets roses, les A106, R109 et P173 par des bâtonnets bleus et la S175R par des bâtonnets orange. Les distances entre les différents résidus sont indiquées en Å.

cas de la mutation étudiée dans ce projet, la S175R, elle pourrait résulter en des changements au niveau de la capacité catalytique de la C161 aussi en raison de leur proximité relative (Figure 46). Ainsi, le changement d'un petit acide aminé polaire pour un gros acide aminé chargé positivement pourrait mener à des changements importants dans la structure et l'emplacement de la C161. De plus, il est important de noter que cette mutation se trouve aussi à proximité de la C168 (Figure 46). Il faut se rappeler que la mutation S175R mène à une perte complète de l'activité enzymatique de la LRAT alors qu'une faible activité résiduelle est détectée lorsque la C161 est modifiée pour une sérine, vraisemblablement grâce à la C168 qui joue un rôle secondaire dans la liaison de la chaîne acyle (Figures 7 et 9). Ainsi, nous pourrions émettre l'hypothèse que la mutation S175R mène à une perte complète de l'activité enzymatique, en conséquence de changements structuraux au niveau des C161 et C168, ce qui les empêcherait de lier le rétinol et ainsi de former du rétinyl ester. La distance entre la mutation S175R et les résidus C161S, C168S et C182 a été calculée (Figure 46) : une distance équivalente est observée avec la C168S et la C182 (9,9 et 9,8 Å, respectivement) et un peu

plus éloignée pour la C161S (10,9 Å). Une analyse similaire pourrait être faite avec le mutant P173L-tLRAT lorsque sa structure sera élucidée. En effet, cette mutation a une activité résiduelle de 12% par rapport au type sauvage (WT) (Figure 9). De plus, des études enzymatiques avec les différents mutants C161S, C168S et C161S/C168S ont montré que l'activité enzymatique chute de 82% par rapport au WT lors de l'introduction de la mutation C168S (Figure 7). Ainsi, la mutation P173L pourrait avoir une influence sur la C161 et non sur la C168, car cette dernière compenserait les déficiences liées à la C161. Finalement, aucune mutation n'est assez proche de la H72 pour induire des changements conformationnels qui pourraient influencer l'activité enzymatique (Figure 44).

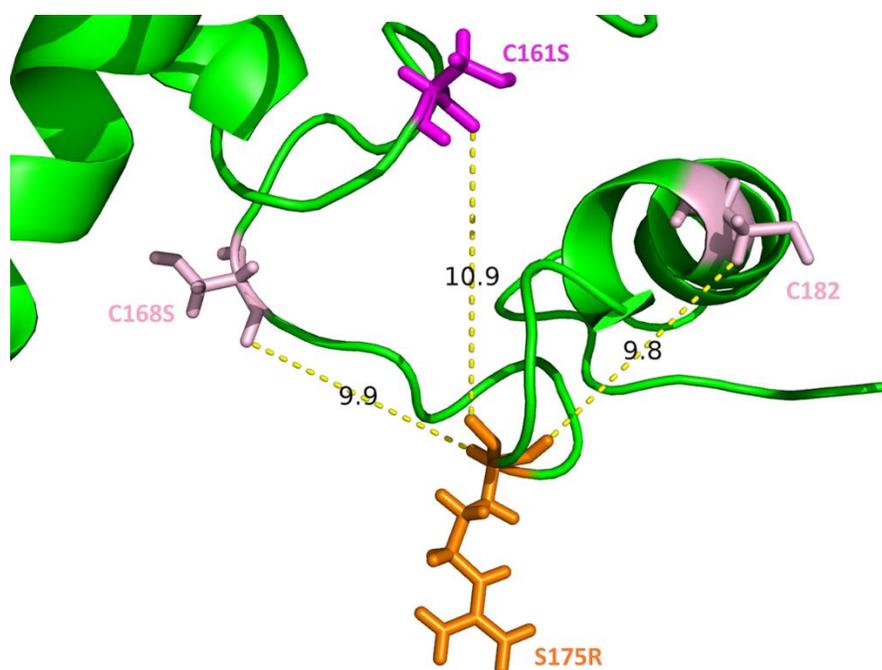


Figure 46: Zoom de la région de la mutation S175R et distance avec les résidus C161S, C168S et C182. La C161S est représentée par des bâtonnets mauves alors que les C161S et C182 sont représentées par des bâtonnets roses et la mutation S175R par des bâtonnets orange. Les distances entre les différents résidus sont indiquées en Å.

4.6.1 Influence de la mutation S175R sur la structure de la tLRAT

À la suite de l'obtention de la structure 3D, il est intéressant de revenir sur les résultats obtenus dans la section 4.5, où des possibles changements conformationnels de certains résidus ont été identifiés (Figures 37-40). Tel que montré en Figure 47, la mutation S175R semble être très éloignée des résidus E32, D33, I77, T82, V92, G100 et V105. La distance

entre la S175R et les atomes des résidus présentant la plus importante différence de déplacement chimique (I77, T82, V92, G100 et V105, Annexe 7) varie entre 23 et 42 Å, ce qui permet de conclure que ces déplacements chimiques ne résultent pas d'une influence quelconque de la mutation, mais plutôt de différences lors de l'attribution des pics. Puisque les différences de déplacement chimique n'étaient pas importantes dans le cas de la T82, la V92 et la V105, il est possible que le centre des pics était seulement un peu décalé. Il ne faut toutefois pas omettre l'influence de la température à laquelle les spectres ont été enregistrés. En effet, la température peut avoir un effet sur les déplacements chimiques des atomes et puisque la C161S/C168S-tLRAT a été étudiée à 45 °C, au lieu de 37 °C, il se peut que ces petits écarts soient dus à cette différence dans les conditions expérimentales. Par contre, pour la G100, où une importante différence a été observée, il pourrait y avoir une erreur d'attribution, soit au niveau de la C161S/C168S-tLRAT ou de la C161S/C168S/S175R-tLRAT, ce qui nécessiterait une vérification détaillée.

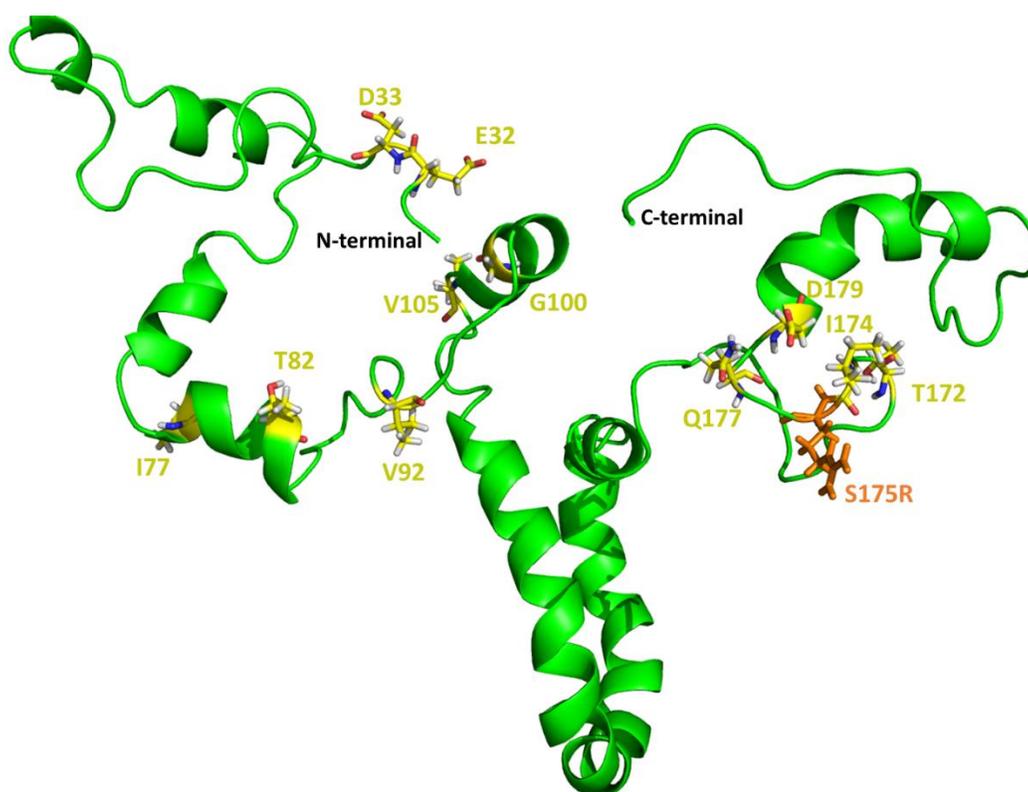


Figure 47: Structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196. La mutation S175R est représentée par des bâtonnets orange. Les résidus montrant des différences de déplacements chimiques comparativement à la C161S/C168S-tLRAT 31-196 (E32, D33, I77, T82, V92, G100, V105, T172, I174, Q177 et D179) sont représentés avec des bâtonnets jaunes.

En revanche, l'influence de la mutation S175R peut être confirmée pour les résidus T172, I174, Q177 et D179 (Figure 48). Il était évident que la mutation S175R aurait une influence sur ses résidus voisins dans la séquence (I174). Pour les résidus T172, Q177 et D179, ils sont très proches de la S175R au niveau structural (Figures 49, 50 et 51). En effet, la distance entre cette mutation et les atomes des résidus qui montraient des différences de déplacement chimique était inférieure ou égale à 7,6 Å, ce qui indique une très grande proximité. Malheureusement, ces résultats n'ont pas permis de confirmer directement l'influence directe de cette mutation sur les résidus catalytiques ou des résidus du segment 96-109, qui devrait inclure des résidus importants pour la catalyse (voir section 2.3).

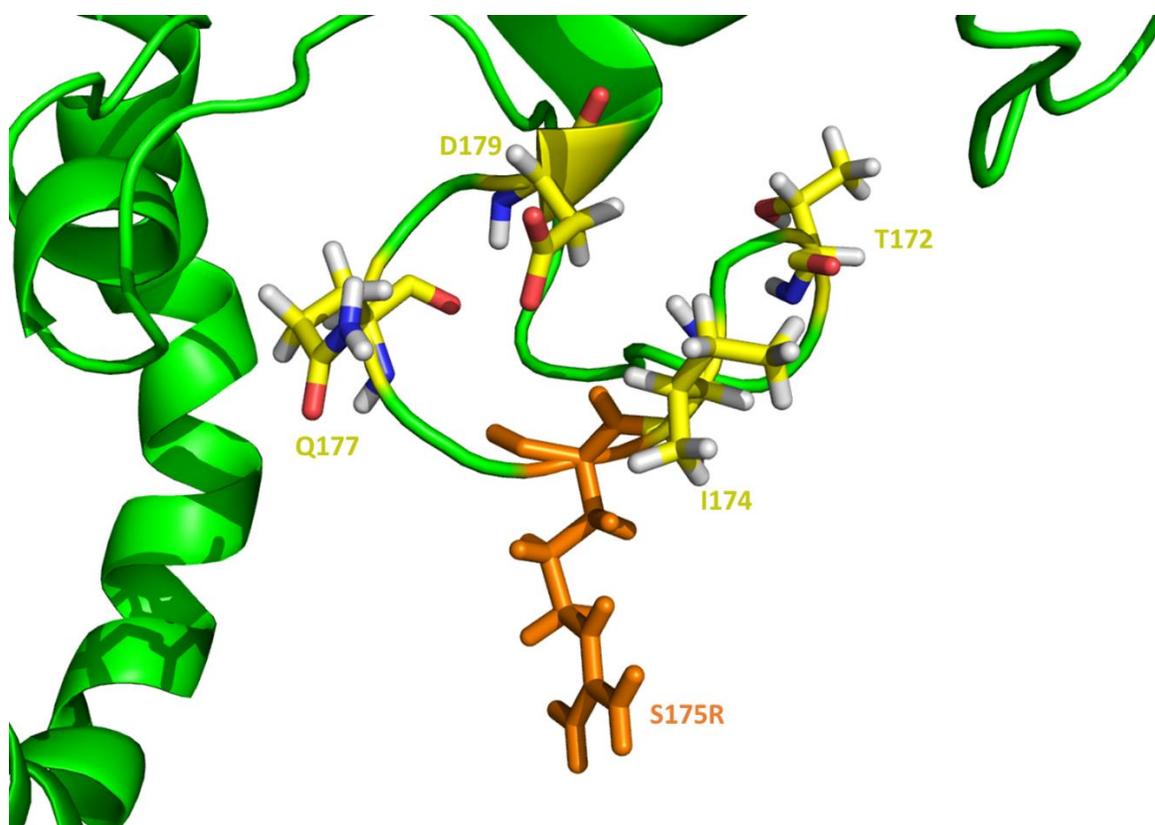


Figure 48: Zoom de la région de la mutation S175R et des résidus affectés. La mutation S175R est représentée par des bâtonnets orange et les résidus T172, I174, Q177 et D179 avec des bâtonnets jaunes.

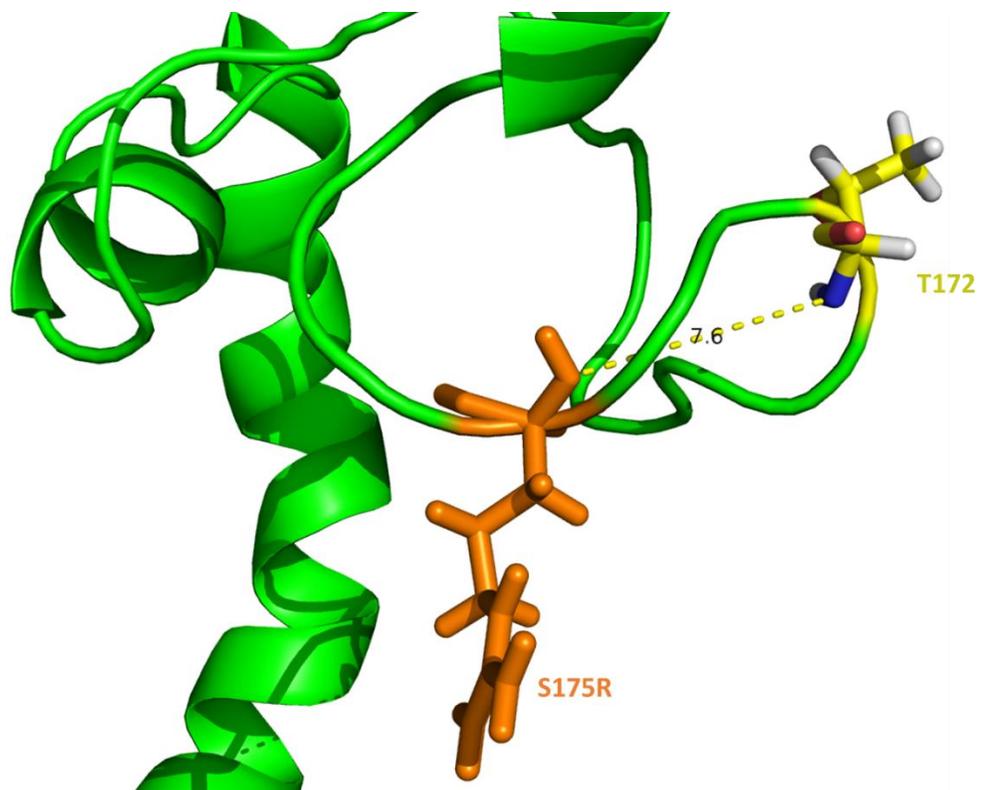


Figure 49: Zoom de la région de la mutation S175R et distance entre cette mutation et l'atome d'azote du résidu T172. La distance entre les résidus est indiquée en Å.

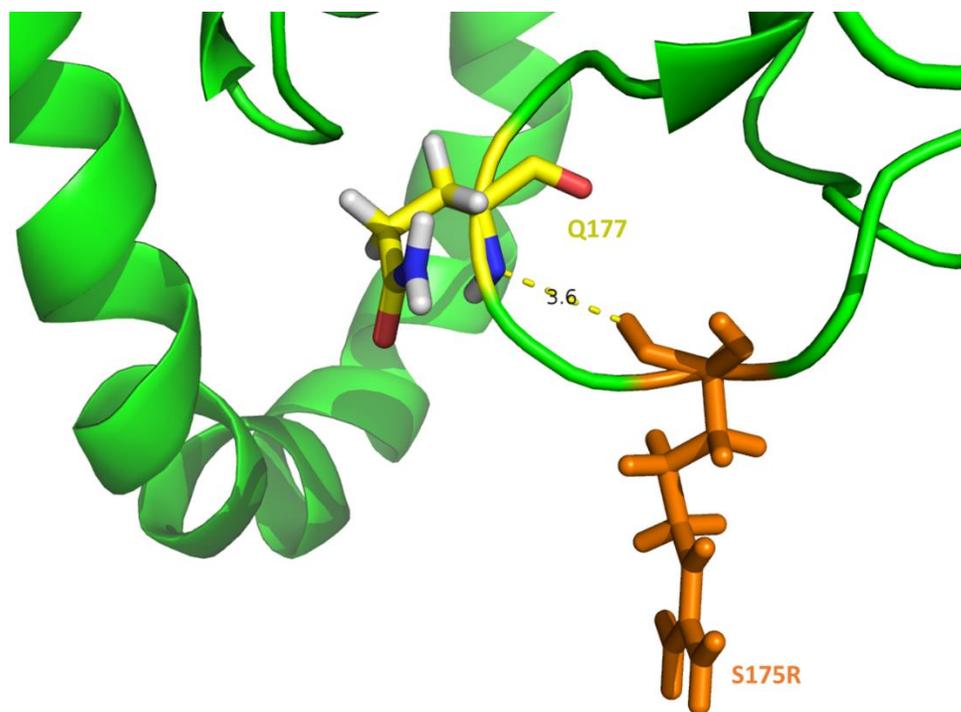


Figure 50: Zoom de la région de la mutation S175R et distance entre cette mutation et l'atome d'azote du résidu Q177. La distance entre les résidus est indiquée en Å.

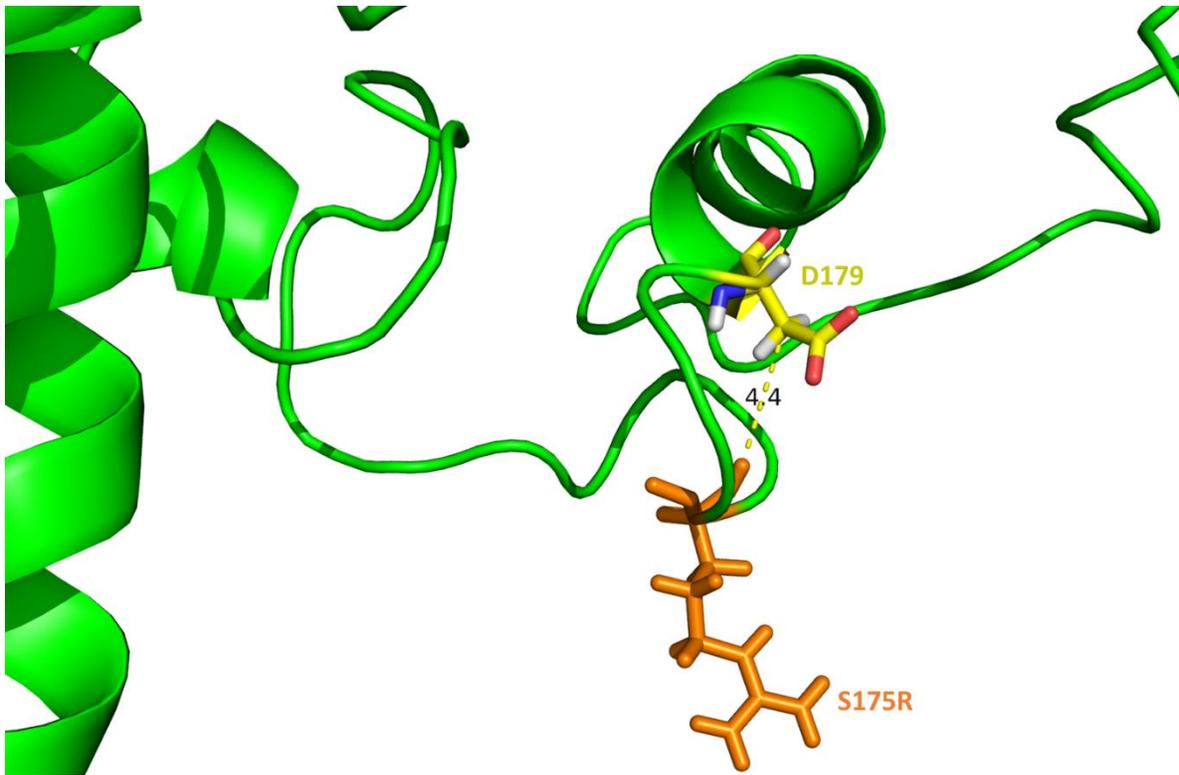


Figure 51: Zoom de la région de la mutation S175R et distance entre cette mutation et l'atome C β du résidu D179. La distance entre les résidus est indiquée en Å.

4.7 Comparaison entre la structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT et les modèles de prédiction ainsi que l'influence du SDS dans la structure

À la suite de l'obtention de la structure 3D de la protéine, il est intéressant de constater la présence prédominante d'hélices- α . Ce résultat concorde bien avec les prédictions faites par *TALOS-N*, autant dans le cas de la C161S/C168S-tLRAT que de la C161S/C168S/S175R-tLRAT (Figures 14 et 36). Par contre, tel que mentionné précédemment, les modèles de prédiction disponibles diffèrent toutefois de la structure obtenue par RMN. En effet, des feuillets- β sont prédits dans les structures présentées dans les Figures 10 et 11. Un alignement des structures secondaires obtenues par RMN (C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196, Figure 36) et des prédictions par *I-TASSER* (LRAT, Figure 10) ainsi que de la protéine chimère (HRA-SLS3/LRAT, Figure 11) sont montrées en Annexe 8. En comparant les prédictions faites avec *I-TASSER* et la protéine chimère, on remarque très peu de régions où il y a consensus pour la structure secondaire. De plus, la protéine chimère prédit un contenu plus important en feuil-

lets- β que le modèle *I-TASSER*, mais avec une présence importante d'hélices- α . En comparant les structures secondaires obtenues par RMN et *I-TASSER*, il y a plus de similarités par rapport à l'emplacement des hélices- α . De plus, il semble aussi que les hélices- α remplacent les feuillets- β qui sont présents dans la structure de *I-TASSER*.

4.7.1 Effet de concentration du SDS par la tLRAT

L'absence complète de feuillet- β et l'importante présence d'hélices- α dans la structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT, ainsi que dans la prédiction de la structure secondaire par *TALOS-N* de la C161S/C168S-tLRAT, suggère que LRAT correspondrait à un nouveau repliement. Par contre, depuis peu, une nouvelle hypothèse suggère que la présence de SDS dans l'échantillon pourrait favoriser la présence d'un contenu élevé en hélices- α . De plus, la concentration en SDS dans l'échantillon de protéine concentré est en beaucoup plus grande quantité que prévu initialement. En effet, il a été déterminé par RMN que pour les trois échantillons préparés pour l'enregistrement des spectres, la concentration en SDS était en moyenne équivalente à 183 ± 22 mM. Cette tendance a aussi été observée pour tous les échantillons très concentrés de la tLRAT et de ses mutants lors de la mesure des spectres HSQC (1 mM). La concentration en SDS dans ces échantillons variait entre 100 et 150 mM. Avec une protéine concentrée à 1 mM, cela mène à un rapport molaire de tLRAT:SDS de plus de 1:100. Il était très étonnant de constater une aussi forte concentration en SDS lors des analyses par RMN en considérant que le tampon d'élution, contenant 3,4 mM SDS, est changé pour un tampon citrate avec une concentration de SDS de 1,7 mM lors de l'étape de dessalage. Afin de comprendre cette forte augmentation, plusieurs échantillons ont été récoltés lors des étapes de purification et de préparation de l'échantillon pour la RMN. Par la suite, la concentration en SDS à ces différentes étapes a été déterminée par RMN avec une courbe standard (Annexe 9). Il a été constaté que la concentration de SDS augmentait à chacune des étapes de la purification. En effet, il semble que la tLRAT possède une très grande affinité pour le SDS. Puisque le SDS est présent dans toutes les solutions utilisées lors de la purification (tampon de chargement, tampon de lavage et tampon d'élution), il apparaît évident que la tLRAT se lie très fortement aux molécules de SDS, ce qui résulte ainsi en une concentration élevée de SDS dans la colonne. De plus, lors de l'étape de concentration, une augmentation de la con-

centration de SDS est aussi observée. Des contrôles avec seulement le tampon citrate contenant 1,7 mM de SDS à l'étape de concentration de la protéine avec les filtres Amicon ultra-4 ont démontré que la majorité du SDS ne traversait pas le filtre. En présence de tLRAT, la concentration de SDS augmentait encore plus. De plus, nous avons démontré que la concentration en SDS dépendait de la vitesse ainsi que du temps de centrifugation. En effet, plus la centrifugation était rapide, plus la concentration en SDS augmentait et ce pour la même période de temps. Cela a permis de conclure que la concentration élevée en SDS est reliée aux différentes étapes de purification, de dessalage et de concentration ainsi qu'à la forte affinité de la tLRAT pour ce détergent. Par conséquent, chaque molécule de tLRAT semble recruter graduellement au moins 100 molécules de SDS à haute concentration de protéines.

4.7.2 Effet du SDS sur la stabilité des protéines

À une concentration aussi haute de SDS, il faut donc se questionner sur la validité de la structure 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT. En effet, diverses études portant sur l'influence du SDS sur la structure des protéines ont été publiées, car l'interaction entre les protéines et le SDS est encore mal comprise. Le SDS est très couramment utilisé comme agent dénaturant (Nielsen, Borch et al. 2007, Otzen, Sehgal et al. 2009). Dans les conditions utilisées pour le SDS-PAGE, il suffit d'une concentration de 3,5 mM de SDS pour dénaturer les protéines lors d'une incubation à 95 °C pendant 5 minutes. Par contre, un groupe de protéines résistant à la dénaturation par le SDS à une concentration aussi élevée que 35 mM a été identifié (Manning and Colon 2004). Il a aussi été suggéré que la dénaturation par le SDS pourrait être due aux fortes attractions électrostatiques de ce détergent avec des acides aminés chargés positivement ainsi que d'interactions entre la chaîne alkyle du SDS et les chaînes latérales des lysines et des arginines (Otzen, Sehgal et al. 2009). Le SDS est aussi utilisé comme un agent favorisant l'agrégation grâce à ses caractéristiques électrochimiques et ses interactions hydrophobes (Barghorn, Nimmrich et al. 2005, Khan, Qadeer et al. 2012, Khan, Chaturvedi et al. 2014). D'un autre côté, le SDS peut être aussi utilisé comme un agent stabilisant des protéines (Nielsen, Borch et al. 2007, Moriyama, Watanabe et al. 2008). L'effet du SDS sur les protéines dépend grandement de son interaction avec celles-ci et est difficile à prédire. Dans le cas de la tLRAT, le SDS est utilisé afin de la solubiliser et l'aiderait à maintenir sa stabilité. Il est par ailleurs important de noter que la tLRAT est une protéine particulièrement

thermostable. En effet, comme montré en Figure 52 aucune dénaturation n'est observée dans les spectres de dichroïsme circulaire de la tLRAT (0,8 mg/mL) lorsqu'elle est chauffée à 90 °C pendant 20 minutes (Gauthier *et al.* 2018).

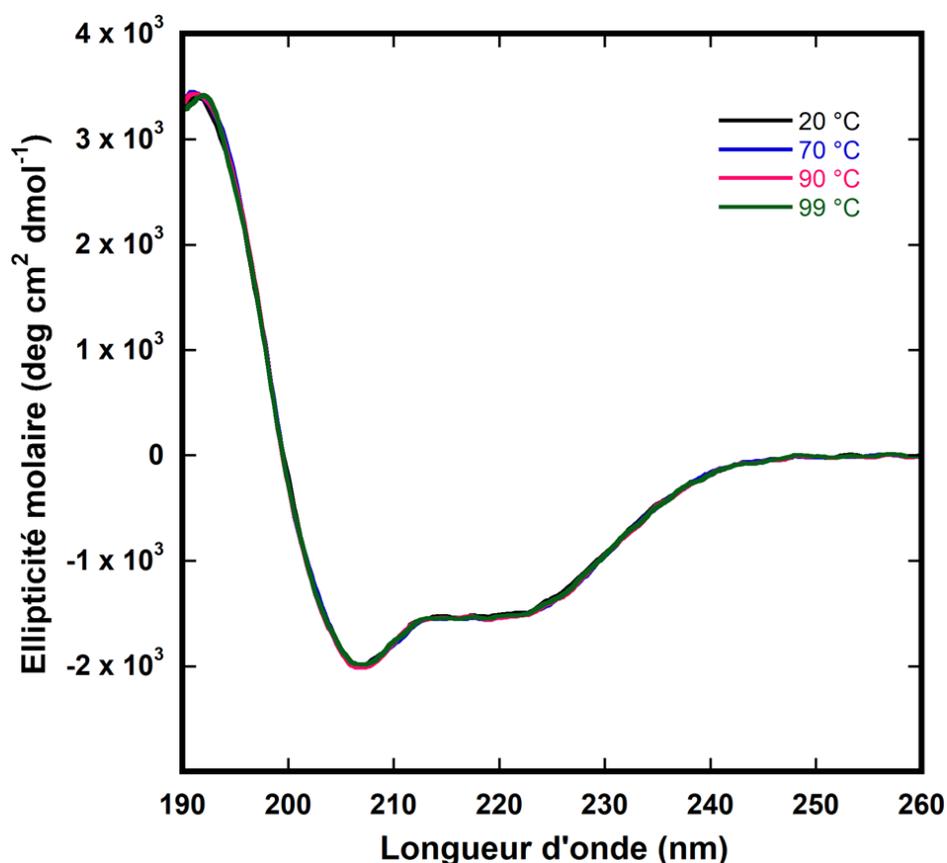


Figure 52: Spectres CD de la tLRAT incubée 20 minutes à 20, 70, 90 et 99 °C. La tLRAT ne présente pas de changement dans sa structure secondaire après une incubation de 20 minutes à des températures aussi élevées que 90 et 99 °C lorsque concentrée à 0,8 mg/mL (Gauthier *et al.* 2018).

Par contre, très peu d'études traitent de l'effet engendré sur la structure d'une protéine par le SDS pour un ratio >1:100. Nielsen *et al.* ont déterminé que la *Humicola insolens Cutinase* (HiC) était stable et ne formait pas d'agrégation ou de précipité dans une solution aqueuse contenant du SDS (avec un ratio molaire HiC:SDS de 1:10) (Nielsen, Borch *et al.* 2007). D'autres auteurs ont étudié l'effet du SDS à des ratios molaires aussi élevés que 1:100 sur 25 protéines différentes (Khan, Qadeer *et al.* 2012). Ils ont observé une agrégation que lorsque les protéines se trouvaient dans une solution à un pH de deux unités en dessous de leur pI. D'un autre côté, aucune agrégation n'était notée lorsque le pH était deux unités au-dessus du

pI. Cela a permis d'émettre l'hypothèse qu'en présence d'une protéine chargée positivement ($\text{pH} < \text{pI}$), il y a interaction avec la tête polaire chargée négativement du SDS, ce qui mène à l'agrégation. Dans la même ligne de pensée, lorsque la protéine est chargée négativement ($\text{pH} > \text{pI}$), il y a répulsion entre les charges négatives de la protéine et du SDS, ce qui empêche la formation d'un précipité. Malheureusement, cette hypothèse ne peut pas être appliquée à la tLRAT. En effet, le pI de la C161S/C168S/S175R-tLRAT est estimé à 8,7. Puisque le tampon citrate est à un pH de 6,0, la protéine devrait alors être chargée positivement, ce qui aurait dû favoriser l'agrégation de la protéine. Aucune évidence d'agrégation n'est toutefois observée dans nos spectres RMN. De plus, cette étude a été faite avec des concentrations de protéines et de SDS grandement inférieures à notre étude. En effet, les protéines étaient à une concentration de 5 μM . La concentration en SDS est alors de 0,5 mM, soit plus de 200 fois moins concentrée que dans notre cas.

4.7.3 Formation de micelles de SDS

À des concentrations aussi élevées que 100 mM de SDS, il a fallu se questionner sur la possible présence de micelles. Nous avons déterminé par RMN que la CMC du SDS à 37 °C est de 15,3 mM. Celle-ci a été déterminée avec une courbe standard (Annexe 9). Il est donc évident que le SDS contenu dans les échantillons a formé des micelles à une concentration de 183 ± 22 mM. Par contre, des micelles de détergent sont souvent utilisées pour les analyses structurales en RMN (Mus-Veteau, Demange et al. 2014; <http://www.dror-list.com/nmr/MPNMR.html>). De plus, il est probable que la tLRAT inclut un segment amphiphile (résidus 96 à 109). On pourrait ainsi supposer que la présence de micelles permettrait de stabiliser ce segment et d'obtenir une structure plus près de la réalité. La présence de micelles pourrait aussi expliquer l'absence d'homodimères en isolant les molécules de tLRAT les unes des autres.

4.7.4 Effet du SDS sur l'activité enzymatique de la tLRAT

Il était important de déterminer si la présence de micelles de SDS avait un impact sur l'activité enzymatique de la tLRAT. Si celle-ci n'est pas active, la structure obtenue ne reflètera pas la structure qui permet d'estérifier le tout-*trans* rétinol. Malheureusement, il a été démontré que la tLRAT en présence de SDS à 100 mM n'avait aucune activité enzymatique. Afin

de comprendre l'effet du SDS sur l'activité de la tLRAT, des mesures d'activité enzymatique ont été effectuées par Line Cantin (Annexe 10). Une concentration de seulement 2,4 nM de tLRAT est utilisée pour ces mesures d'activité où la concentration en SDS est au maximum de $\sim 3,6 \mu\text{M}$ (Horchani et al., 2014). Il est important de noter qu'un autre détergent, le diheptanoyl phosphocholine (DHPC), est utilisé pour effectuer les mesures d'activité à une concentration de 6,25 mM, i.e. au-dessus de sa CMC de 1,4 mM. Le DHPC sert de premier substrat pour la tLRAT et permet de solubiliser le rétinol. Des mesures d'activité enzymatique ont donc été faites en modifiant la concentration de SDS. Les résultats montrés en Figure A10 ont permis de conclure que ce n'est pas le ratio molaire tLRAT:SDS qui est important. En effet, avec des ratios molaires aussi élevés que 1:710 000 (2,4 nM de tLRAT et 1,7 mM de SDS, Figure A10), la tLRAT est capable d'effectuer son activité enzymatique normalement. Ce rapport tLRAT:SDS est beaucoup plus élevé que celui retrouvé dans les échantillons RMN (variant entre 1:100 et 1:200). Les données montrent que c'est la formation de micelles de SDS qui a l'impact le plus important sur l'activité de la tLRAT. En effet, la Figure A10 montre que son activité enzymatique diminue en fonction de la concentration du SDS. Plus précisément, à des concentrations se rapprochant de la CMC du SDS, l'activité chute de façon importante. Il est à noter que les mesures enzymatiques sont faites à 20 °C et que la CMC du SDS à 25 °C est de 8 mM (Chen, Penfold et al. 2017). À 20 °C, la CMC du SDS serait donc vraisemblablement inférieure à 8 mM. Cela concorderait donc avec les mesures d'activité enzymatique de la tLRAT (Figure A10), où une chute importante de l'activité est observée à partir d'une concentration de 5,1 mM, une concentration à partir de laquelle les premières micelles pourraient se former. Donc, il serait possible que la tLRAT soit isolée dans ces micelles et qu'elle n'ait pas accès à ses substrats. Il faut donc conclure que la tLRAT a plus d'affinité pour les micelles de SDS que celles de DHPC et/ou que le SDS et le DHPC ne forment pas de micelles mixtes. Par contre, il ne faut pas conclure que la présence de micelles mène nécessairement à des changements de la structure 3D de la tLRAT. En effet, des mesures d'activité enzymatique ont été effectuées avec la tLRAT qui a d'abord été préparée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la RMN (ratio molaire tLRAT: SDS >1:100) mais ensuite diluée aux concentrations de tLRAT et de SDS utilisées pour effectuer les mesures enzymatiques. Ces travaux ont montré que la tLRAT retrouve alors une activité typique

maximale. On peut ainsi conclure que, même si les conditions RMN pourraient être dénaturantes ou empêcher l'accès de la tLRAT à ses substrats, elles sont parfaitement réversibles car la tLRAT retrouve toute son activité dans les conditions optimales identifiées auparavant (Horchani, Bussieres et al. 2014).

Conclusions et perspectives

Dans le cadre de ces travaux de recherche, il a été possible d'obtenir une structure tridimensionnelle de la C161S/C168S/S175R-tLRAT His₁₀ 30-196 par RMN. Cette structure est composée en majorité d'hélices- α et de pelote statistique. La mutation S175R peut être décrite comme étant responsable d'une perte complète de l'activité enzymatique en raison de son influence sur les cystéines catalytiques (C161 et C168). Par contre, l'influence de cette mutation ne peut pas être confirmée avant de comprendre le mécanisme détaillé de l'activité enzymatique de la LRAT. Plusieurs approches seront utilisées afin de caractériser ce mécanisme d'activité. Tout d'abord, il sera nécessaire de déterminer la structure 3D de la tLRAT sans mutation comme modèle de référence afin de comprendre l'effet des mutations. Il faudrait toutefois aussi déterminer la structure de tous les intermédiaires catalytiques de la tLRAT : la forme non-acylée, la forme acylée et celle liée à son deuxième substrat. Pour obtenir la tLRAT sous une forme non-acylée, idéalement sans les mutations C161S et C168S, il faudrait ajouter un excès de rétinol à l'échantillon de tLRAT qui devrait alors transférer son groupement acyle à ce composé (étape 2, Figure 8). De façon similaire, l'obtention de la forme acylée pourrait être produite en présence d'un excès du premier substrat, le DHPC (étape 1, Figure 8). L'obtention de la tLRAT liée à son deuxième substrat, le rétinol, consisterait à utiliser un inhibiteur de la LRAT, le tout-*trans* rétinyl α -bromoacétate (Trehan, Canada et al. 1990, Mata, Radu et al. 2002). À ce stade-ci, les observations faites à propos de l'influence de la mutation S175R sur la structure de la tLRAT ne sont que des hypothèses. En comparant la structure 3D des intermédiaires catalytiques de la tLRAT avec celle de la C161S/C168S/S175R, nos observations structurales pourraient être confirmées ou reformulées. La structure des formes acylée, non-acylée et liée à un inhibiteur de la LRAT permettrait de franchir un grand pas pour comprendre son mécanisme d'activité enzymatique et identifier les résidus participant à cette activité ainsi que les changements conformationnels prenant place au cours de ce processus.

La structure de la tLRAT obtenue avec les modèles de prédiction est significativement différente de la structure 3D obtenue avec la C161S/C168S/S175R-tLRAT, principalement en raison de l'absence de feuillets- β dans la structure du mutant étudié. Par contre, il est pour l'instant impossible de conclure que la LRAT correspondrait à un nouveau repliement qui ne peut

pas être prédit par des méthodes *ab initio*. En effet, même si la structure obtenue ne semble pas être similaire aux modèles de prédiction, les conditions dans lesquelles la protéine a été préparée pourraient potentiellement être responsables de ces divergences. En effet, sur la base des mesures d'activité (Figure A10 en annexe), il est possible que les concentrations beaucoup plus élevées en SDS que ce qu'on s'attendait (entre 100 et 200 mM dans l'échantillon RMN versus 1,7 mM dans les solutions utilisées pour la chromatographie), mènent à des changements dans la structure de la protéine. En effet, plusieurs études ont démontré que le SDS induit la formation d'hélices- α (Kay 1970, Jirgensons 1973, Mattice, Riser et al. 1976, Jirgensons 1978, Jirgensons 1979), ce qui pourrait diminuer ainsi les probabilités d'observer la présence de feuillets- β . De plus, nous savons que la tLRAT n'est pas active lorsqu'elle est en présence d'une aussi grande concentration de SDS (section 4.7.4 et Figure A10). Il est possible que la présence d'une aussi grande concentration de SDS mène à une modification du repliement global de la tLRAT; il s'agit toutefois d'une condition réversible car la tLRAT retrouve son activité enzymatique lorsqu'elle est diluée dans un tampon ne contenant pas de SDS. L'absence d'activité pourrait ainsi être expliquée par la présence de micelles de SDS qui ne permettent pas à la LRAT de lier ses substrats et de produire du rétinyl ester. Ces données suggèrent donc que la structure tridimensionnelle obtenue pourrait ne pas être juste en raison de la présence de micelles de SDS qui pourraient engendrer une structure différente de son état natif. La dénaturation de la structure de tLRAT est toutefois difficile à envisager en raison de l'observation d'une activité enzymatique maximale dans les conditions optimales de mesure de son activité enzymatique; il serait en effet surprenant que la dénaturation soit parfaitement réversible en permettant de retrouver 100% de l'activité originale de la tLRAT. Cette structure nous a toutefois permis d'observer la proximité des quelques résidus catalytiques avec la mutation S175R et de soulever des hypothèses pour expliquer sa perte d'activité. Par contre, une modification au moins partielle du repliement global de la tLRAT est justifiée par l'observation d'un éloignement important entre plusieurs résidus catalytiques dans la structure de cette protéine (Figure 43), ce qui est incompatible avec une activité optimale sauf si des changements conformationnels ont lieu suite à la liaison de ses substrats.

Afin d'éliminer ou, du moins, de diminuer l'effet du SDS sur la structure de la tLRAT, il faudrait trouver un ou des moyens afin de réduire l'utilisation du SDS. Au laboratoire, des

travaux ont été faits afin de diminuer la concentration en SDS lors des différentes étapes de purification, mais cela s'est avéré inefficace. On a d'abord essayé de modifier le protocole de purification. Le SDS était présent dans le tampon de chargement et d'élution mais on a enlevé le SDS dans le tampon de lavage, l'étape où le plus SDS est ajouté dans la colonne de purification. Puisque la tLRAT a tendance à retenir les molécules de SDS pour être soluble, cette méthode ne s'est pas avérée efficace, car la même quantité de SDS a été obtenue après la purification. Une seconde méthode consistait à préparer l'échantillon dans les mêmes conditions mais après l'enregistrement d'un premier spectre HSQC, un second spectre a été mesuré après avoir dilué l'échantillon de protéine par un facteur de 1/10 afin de diminuer la concentration en SDS. En comparant les deux spectres, il a été possible de noter une augmentation de l'intensité et un amincissement de certains pics en plus d'observer une différence significative dans leur déplacement chimique. Les pics présentant ces différences correspondaient principalement aux résidus du segment 96-109, un segment présumément amphiphile. Ces données suggèrent que ce segment devient plus dynamique et qu'il subirait moins l'influence des micelles de SDS, ce qui serait très avantageux pour nos mesures. Par contre, il n'est pas favorable de travailler à des concentrations aussi basses que 0,1 mM de tLRAT pour les études en RMN, mais il est possible d'enregistrer des spectres de même qualité mais pendant une beaucoup plus longue période de temps (environ 100 fois plus long).

Une autre perspective consisterait à changer de détergent. Quelques détergents ont déjà été essayés dont le Triton X-100, le CHAPSO, le n-dodecyl-beta-D-maltoside et le N-lauroylsarcosine (Horchani, Bussieres et al. 2014). À l'exception de ce dernier, ces détergents ne sont pas avérés efficaces pour l'extraction de la tLRAT. Le N-lauroylsarcosine n'avait pas été retenu, car la tLRAT était moins active en présence de ce détergent. L'utilisation d'autres étiquettes de purification, notamment celles permettant d'augmenter aussi la solubilité des protéines d'intérêt, dont la Maltose-binding protein (MBP) (di Guan, Li et al. 1988), la Glutathione-S-Transférase (GST) (Smith and Johnson 1988) et la TagR est prometteuse (Cantin and Salesse 2016). En effet, des travaux de Line Cantin ont montré que la tLRAT était produite sous une forme soluble en fusion avec la TagR et que son activité était équivalente à celle rapportée précédemment (Horchani et al., 2014) après son clivage avec une protéase. Une autre avenue à évaluer afin de minimiser la présence et l'effet du SDS serait d'essayer

de nouveaux systèmes de surexpression. Le système d'expression utilisé pour la tLRAT est *E. coli*, un système qui a fait ses preuves au niveau du rendement et de la rapidité. Par contre, il ne s'agit du système d'expression le plus efficace dans le cas des protéines ayant des segments hydrophobes tels que pour la LRAT. Des systèmes d'expression pour des protéines hydrophobes sont de plus en plus nombreux autant chez les bactéries (*Lactococcus lactis*, *Rhodobacter sphaeroides*), les levures (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*), les baculovirus et les cellules d'insectes (Mus-Veteau, Demange et al. 2014). Éventuellement, il serait aussi idéal d'obtenir la forme complète de la LRAT afin de l'étudier et il est possible que l'une de ces méthodes soit la solution au problème de solubilité de la LRAT.

Bibliographie

- Albalat, R. (2012). "Evolution of the genetic machinery of the visual cycle: a novelty of the vertebrate eye?" Mol Biol Evol **29**(5): 1461-1469.
- Anantharaman, V. and L. Aravind (2003). "Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes." Genome Biol **4**(2): R11.
- Andreola, F., V. Giandomenico, R. Spero and L. M. De Luca (2000). "Expression of a smaller lecithin:retinol acyl transferase transcript and reduced retinol esterification in MCF-7 cells." Biochem Biophys Res Commun **279**(3): 920-924.
- Angi, M., H. Kalirai, S. E. Coupland, B. E. Damato, F. Semeraro and M. R. Romano (2012). "Proteomic analyses of the vitreous humour." Mediators Inflamm **2012**: 148039.
- Barghorn, S., V. Nimmrich, A. Striebinger, C. Krantz, P. Keller, B. Janson, M. Bahr, M. Schmidt, R. S. Bitner, J. Harlan, E. Barlow, U. Ebert and H. Hillen (2005). "Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease." J Neurochem **95**(3): 834-847.
- Barry, R. J., F. J. Canada and R. R. Rando (1989). "Solubilization and partial purification of retinyl ester synthetase and retinoid isomerase from bovine ocular pigment epithelium." J Biol Chem **264**(16): 9231-9238.
- Berman, E. R., J. Horowitz, N. Segal, S. Fisher and L. Feeney-Burns (1980). "Enzymatic esterification of vitamin A in the pigment epithelium of bovine retina." Biochim Biophys Acta **630**(1): 36-46.
- Bok, D., A. Ruiz, O. Yaron, W. J. Jahng, A. Ray, L. Xue and R. R. Rando (2003). "Purification and characterization of a transmembrane domain-deleted form of lecithin retinol acyltransferase." Biochemistry **42**(20): 6090-6098.
- Boorjian, S., S. K. Tickoo, N. P. Mongan, H. Yu, D. Bok, R. R. Rando, D. M. Nanus, D. S. Scherr and L. J. Gudas (2004). "Reduced lecithin: retinol acyltransferase expression correlates with increased pathologic tumor stage in bladder cancer." Clin Cancer Res **10**(10): 3429-3437.
- Brown, T. A. (2011). Gene Cloning & DNA Analysis. Manchester, Wiley-Blackwell.
- Bussieres, S., T. Buffeteau, B. Desbat, R. Breton and C. Salesse (2008). "Secondary structure of a truncated form of lecithin retinol acyltransferase in solution and evidence for its binding and hydrolytic action in monolayers." Biochim Biophys Acta **1778**(5): 1324-1334.
- Bussieres, S., L. Cantin, B. Desbat and C. Salesse (2012). "Binding of a truncated form of lecithin:retinol acyltransferase and its N- and C-terminal peptides to lipid monolayers." Langmuir **28**(7): 3516-3523.
- Bussieres, S., L. Cantin and C. Salesse (2011). "Lecithin retinol acyltransferase and its S175R mutant have a similar secondary structure content and maximum insertion pressure but different enzyme activities." Exp Eye Res **93**(5): 778-781.

- Buzhynskyy, N., C. Salesse and S. Scheuring (2011). "Rhodopsin is spatially heterogeneously distributed in rod outer segment disk membranes." J Mol Recognit **24**(3): 483-489.
- Campbell, N. A. (2007). Biologie. Québec, ERPI.
- Canada, F. J., W. C. Law, R. R. Rando, T. Yamamoto, F. Derguini and K. Nakanishi (1990). "Substrate specificities and mechanism in the enzymatic processing of vitamin A into 11-cis-retinol." Biochemistry **29**(41): 9690-9697.
- Cantin, L. and C. Salesse (2016). Recoverin as a fusion protein tag to improve expression, solubility and purification of proteins. PCT/CA2016/050849. U. Patent. Canada. PCT/CA2016/050849.
- Carter-Dawson, L. D. and M. M. LaVail (1979). "Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy." J Comp Neurol **188**(2): 245-262.
- Chassine, T., B. Bocquet, V. Daien, A. Avila-Fernandez, C. Ayuso, R. W. Collin, M. Corton, J. F. Hejtmancik, L. I. van den Born, B. J. Klevering, S. A. Riazuddin, N. Sendon, A. Lacroux, I. Meunier and C. P. Hamel (2015). "Autosomal recessive retinitis pigmentosa with RP1 mutations is associated with myopia." Br J Ophthalmol **99**(10): 1360-1365.
- Chen, Y., L. Huang, X. Jiao, S. Riazuddin, S. A. Riazuddin and J. Fielding Hetmancik (2018). "A novel LRAT mutation affecting splicing in a family with early onset retinitis pigmentosa." Hum Genomics **12**(1): 35.
- Chen, Z., J. Penfold, P. Li, J. Dutch, Y. Fan and Y. Wang (2017). "Effects of length and hydrophilicity/hydrophobicity of diamines on self-assembly of diamine/SDS gemini-like surfactants." Soft Matter **13**(47): 8980-8989.
- Claridge, T. D. W. (2009). High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. UK, Elsevier.
- Collin, R. W., L. I. van den Born, B. J. Klevering, M. de Castro-Miro, K. W. Littink, K. Arimadyo, M. Azam, V. Yazar, M. N. Zonneveld, C. C. Paun, A. M. Siemiatkowska, T. M. Strom, J. Y. Hehir-Kwa, H. Y. Kroes, J. T. de Faber, M. J. van Schooneveld, J. R. Heckenlively, C. B. Hoyng, A. I. den Hollander and F. P. Cremers (2011). "High-resolution homozygosity mapping is a powerful tool to detect novel mutations causative of autosomal recessive RP in the Dutch population." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(5): 2227-2239.
- Coppieters, F., K. Van Schil, M. Bauwens, H. Verdin, A. De Jaegher, D. Syx, T. Sante, S. Lefever, N. B. Abdelmoula, F. Depasse, I. Casteels, T. de Ravel, F. Meire, B. P. Leroy and E. De Baere (2014). "Identity-by-descent-guided mutation analysis and exome sequencing in consanguineous families reveals unusual clinical and molecular findings in retinal dystrophy." Genet Med **16**(9): 671-680.
- Das, S. R., N. Bhardwaj, H. Kjeldbye and P. Gouras (1992). "Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol." Biochem J **285** (Pt 3): 907-913.
- Dev Borman, A., L. A. Ocaka, D. S. Mackay, C. Ripamonti, R. H. Henderson, P. Moradi, G. Hall, G. C. Black, A. G. Robson, G. E. Holder, A. R. Webster, F. Fitzke, A. Stockman and

- A. T. Moore (2012). "Early onset retinal dystrophy due to mutations in LRAT: molecular analysis and detailed phenotypic study." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(7): 3927-3938.
- di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein." Gene **67**(1): 21-30.
- Dominguez, K. and W. S. Ward (2009). "A novel nuclease activity that is activated by Ca(2+) chelated to EGTA." Syst Biol Reprod Med **55**(5-6): 193-199.
- Fan, T. W. and A. N. Lane (2016). "Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry." Prog Nucl Magn Reson Spectrosc **92-93**: 18-53.
- Futterman, S. and J. S. Andrews (1964). "Metabolism of the Retina. Iv. The Composition of Vitamin a Ester Synthesized by the Retina." J Biol Chem **239**: 81-84.
- Gauthier, M-E, S. Roy, L. Cantin and C. Salesse (2018). "Is the mouse a proper animal model to study human lecithin retinol acyltransferase?" Experimental Eye Research (Soumis)
- Golczak, M. and K. Palczewski (2010). "An acyl-covalent enzyme intermediate of lecithin:retinol acyltransferase." J Biol Chem **285**(38): 29217-29222.
- Golczak, M., A. E. Sears, P. D. Kiser and K. Palczewski (2015). "LRAT-specific domain facilitates vitamin A metabolism by domain swapping in HRASLS3." Nat Chem Biol **11**(1): 26-32.
- Gonzalez-Fernandez, F., D. Kurz, Y. Bao, S. Newman, B. P. Conway, J. E. Young, D. P. Han and S. C. Khani (1999). "11-cis retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus." Mol Vis **5**: 41.
- Gulcan, H. G., R. A. Alvarez, M. B. Maude and R. E. Anderson (1993). "Lipids of human retina, retinal pigment epithelium, and Bruch's membrane/choroid: comparison of macular and peripheral regions." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(11): 3187-3193.
- Günther, H. (2013). NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry. Germany, Wiley.
- Guo, X., B. S. Knudsen, D. M. Peehl, A. Ruiz, D. Bok, R. R. Rando, J. S. Rhim, D. M. Nanus and L. J. Gudas (2002). "Retinol metabolism and lecithin:retinol acyltransferase levels are reduced in cultured human prostate cancer cells and tissue specimens." Cancer Res **62**(6): 1654-1661.
- Hajnal, A., R. Klemenz and R. Schafer (1994). "Subtraction cloning of H-rev107, a gene specifically expressed in H-ras resistant fibroblasts." Oncogene **9**(2): 479-490.
- Horchani, H., S. Bussieres, L. Cantin, M. Lhor, J. S. Laliberte-Gemme, R. Breton and C. Salesse (2014). "Enzymatic activity of Lecithin:retinol acyltransferase: a thermostable and highly active enzyme with a likely mode of interfacial activation." Biochim Biophys Acta **1844**(6): 1128-1136.
- Jahng, W. J., E. Cheung and R. R. Rando (2002). "Lecithin retinol acyltransferase forms functional homodimers." Biochemistry **41**(20): 6311-6319.
- Jahng, W. J., L. Xue and R. R. Rando (2003). "Lecithin retinol acyltransferase is a founder member of a novel family of enzymes." Biochemistry **42**(44): 12805-12812.

- Jeon, C. J., E. Strettoi and R. H. Masland (1998). "The major cell populations of the mouse retina." J Neurosci **18**(21): 8936-8946.
- Jin, M., S. Li, W. N. Moghrabi, H. Sun and G. H. Travis (2005). "Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium." Cell **122**(3): 449-459.
- Jin, X. H., Y. Okamoto, J. Morishita, K. Tsuboi, T. Tonai and N. Ueda (2007). "Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners." J Biol Chem **282**(6): 3614-3623.
- Jirgensons, B. (1973). "The sensitivity of some nonhelical proteins to structural modification by sodium dodecyl sulfate and its homologues. Circular dichroism studies on Bence-Jones protein, concanavalin A, soybean trypsin inhibitor and trypsin." Biochim Biophys Acta **328**(2): 314-322.
- Jirgensons, B. (1978). "Circular dichroism studies on the effects of sodium dodecyl sulfate on the conformation of some phytohemagglutinins." Biochim Biophys Acta **536**(1): 205-211.
- Jirgensons, B. (1979). "Circular dichroism and conformational transitions of leucoagglutinin." Biochim Biophys Acta **577**(2): 307-313.
- Kay, C. M. (1970). "The presence of beta-structure in concanavalin A." FEBS Lett **9**(2): 78-80.
- Kaylor, J. J., Q. Yuan, J. Cook, S. Sarfare, J. Makshanoff, A. Miu, A. Kim, P. Kim, S. Habib, C. N. Roybal, T. Xu, S. Nusinowitz and G. H. Travis (2013). "Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Muller glial cells of the retina." Nat Chem Biol **9**(1): 30-36.
- Keeler, J. (2002). Understanding NMR Spectroscopy. University of Cambridge.
- Kefalov, V. J. (2012). "Rod and cone visual pigments and phototransduction through pharmacological, genetic, and physiological approaches." J Biol Chem **287**(3): 1635-1641.
- Khan, J. M., S. K. Chaturvedi, S. K. Rahman, M. Ishtikhar, A. Qadeer, E. Ahmad and R. H. Khan (2014). "Protonation favors aggregation of lysozyme with SDS." Soft Matter **10**(15): 2591-2599.
- Khan, J. M., A. Qadeer, S. K. Chaturvedi, E. Ahmad, S. A. Rehman, S. Gourinath and R. H. Khan (2012). "SDS can be utilized as an amyloid inducer: a case study on diverse proteins." PLoS One **7**(1): e29694.
- Kiser, P. D., M. Golczak, A. Maeda and K. Palczewski (2012). "Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina." Biochim Biophys Acta **1821**(1): 137-151.
- Koenekoop, R. K., M. Loyer, C. K. Hand, H. Al Mahdi, O. Dembinska, R. Beneish, J. Racine and G. A. Rouleau (2003). "Novel RPGR mutations with distinct retinitis pigmentosa phenotypes in French-Canadian families." Am J Ophthalmol **136**(4): 678-687.
- Kuhn, H. (1980). "Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes." Nature **283**(5747): 587-589.
- Lamb, T. D. and E. N. Pugh, Jr. (2004). "Dark adaptation and the retinoid cycle of vision." Prog Retin Eye Res **23**(3): 307-380.

- Levin, L. A. (2011). Adler's Physiology of the Eye. London.
- Lhor, M. and C. Salesse (2014). "Retinol dehydrogenases: membrane-bound enzymes for the visual function." Biochem Cell Biol **92**(6): 510-523.
- Lian, L.-Y. (2011). Protein NMR Spectroscopy: Practical Techniques and Applications, John Wiley & Sons Ltm.
- Littink, K. W., M. M. van Genderen, M. J. van Schooneveld, L. Visser, F. C. Riemsdag, J. E. Keunen, B. Bakker, M. N. Zonneveld, A. I. den Hollander, F. P. Cremers and L. I. van den Born (2012). "A homozygous frameshift mutation in LRAT causes retinitis punctata albescens." Ophthalmology **119**(9): 1899-1906.
- Liu, L. and L. J. Gudas (2005). "Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency." J Biol Chem **280**(48): 40226-40234.
- Luo, D. G., T. Xue and K. W. Yau (2008). "How vision begins: an odyssey." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 9855-9862.
- MacDonald, P. N. and D. E. Ong (1988). "Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine." J Biol Chem **263**(25): 12478-12482.
- Manning, M. and W. Colon (2004). "Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure." Biochemistry **43**(35): 11248-11254.
- Marieb, E. N. (2005). Anatomie et physiologie humaine. Québec, Éditions du nouveau pédagogique inc.
- Mata, N. L., R. A. Radu, R. C. Clemmons and G. H. Travis (2002). "Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight." Neuron **36**(1): 69-80.
- Mata, N. L., A. T. Tsin and J. P. Chambers (1992). "Hydrolysis of 11-cis- and all-trans-retinyl palmitate by retinal pigment epithelium microsomes." J Biol Chem **267**(14): 9794-9799.
- Mattice, W. L., J. M. Riser and D. S. Clark (1976). "Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate." Biochemistry **15**(19): 4264-4272.
- Moise, A. R., M. Golczak, Y. Imanishi and K. Palczewski (2007). "Topology and membrane association of lecithin: retinol acyltransferase." J Biol Chem **282**(3): 2081-2090.
- Mondal, M. S., A. Ruiz, D. Bok and R. R. Rando (2000). "Lecithin retinol acyltransferase contains cysteine residues essential for catalysis." Biochemistry **39**(17): 5215-5220.
- Moriyama, Y., E. Watanabe, K. Kobayashi, H. Harano, E. Inui and K. Takeda (2008). "Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 degrees C and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change." J Phys Chem B **112**(51): 16585-16589.
- Mus-Veteau, I., P. Demange and F. Zito (2014). Membrane Protein Production for Structural Analysis. Membrane Proteins Production for Structural Analysis. I. Mus-Veteau. New York, Springer.

- Nielsen, A. D., K. Borch and P. Westh (2007). "Thermal stability of Humicola insolens cutinase in aqueous SDS." J Phys Chem B **111**(11): 2941-2947.
- O'Byrne, S. M., N. Wongsiriroj, J. Libien, S. Vogel, I. J. Goldberg, W. Baehr, K. Palczewski and W. S. Blaner (2005). "Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT)." J Biol Chem **280**(42): 35647-35657.
- Otzen, D. E., P. Sehgal and P. Westh (2009). "Alpha-Lactalbumin is unfolded by all classes of surfactants but by different mechanisms." J Colloid Interface Sci **329**(2): 273-283.
- Parker, R. O. and R. K. Crouch (2010). "Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle." Exp Eye Res **91**(6): 788-792.
- Porto, F. B. O., E. M. Jones, J. Branch, Z. T. Soens, I. M. Maia, I. F. G. Sena, S. A. M. Sampaio, R. T. Simoes and R. Chen (2017). "Molecular Screening of 43 Brazilian Families Diagnosed with Leber Congenital Amaurosis or Early-Onset Severe Retinal Dystrophy." Genes (Basel) **8**(12).
- Preising, M. N., K. Paunescu, C. Friedburg and B. Lorenz (2007). "[Genetic and clinical heterogeneity in LCA patients. The end of uniformity]." Ophthalmologie **104**(6): 490-498.
- Rando, R. R. (2002). "Membrane-bound lecithin-retinol acyltransferase." Biochem Biophys Res Commun **292**(5): 1243-1250.
- Rattner, A., P. M. Smallwood and J. Nathans (2000). "Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol." J Biol Chem **275**(15): 11034-11043.
- Reid, D. G. (1997). Introduction to the NMR of Proteins. Methods in Molecular Biology. H. P. Inc. Totowa, NJ. **60**.
- Rodieck, R. W. (2003). La vision. Paris, De Boeck Université.
- Ross, A. C. (2003). "Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation." J Nutr **133**(1): 291S-296S.
- Ruiz, A. and D. Bok (2000). "Molecular characterization of lecithin-retinol acyltransferase." Methods Enzymol **316**: 400-413.
- Ruiz, A., M. H. Kuehn, J. L. Andorf, E. Stone, G. S. Hageman and D. Bok (2001). "Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(1): 31-37.
- Ruiz, A., A. Winston, Y. H. Lim, B. A. Gilbert, R. R. Rando and D. Bok (1999). "Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase." J Biol Chem **274**(6): 3834-3841.
- Saari, J. C. (2000). "Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(2): 337-348.
- Saari, J. C. (2012). "Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles." Annu Rev Nutr **32**: 125-145.
- Saari, J. C. and D. L. Bredberg (1989). "Lecithin:retinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes." J Biol Chem **264**(15): 8636-8640.

- Salesse, C. (2017). "[Physiology of the visual retinal signal: From phototransduction to the visual cycle]." J Fr Ophthalmol **40**(3): 239-250.
- Schmitt, M. C. and D. E. Ong (1993). "Expression of cellular retinol-binding protein and lecithin-retinol acyltransferase in developing rat testis." Biol Reprod **49**(5): 972-979.
- Schnapf, J. L., B. J. Nunn, M. Meister and D. A. Baylor (1990). "Visual transduction in cones of the monkey *Macaca fascicularis*." J Physiol **427**: 681-713.
- Scholl, H. P., A. T. Moore, R. K. Koenekoop, Y. Wen, G. A. Fishman, L. I. van den Born, A. Bittner, K. Bowles, E. C. Fletcher, F. T. Collison, G. Dagnelie, S. Degli Eposti, M. Michaelides, D. A. Saperstein, R. A. Schuchard, C. Barnes, W. Zein, D. Zobor, D. G. Birch, J. D. Mendola, E. Zrenner and R. I. S. Group (2015). "Safety and Proof-of-Concept Study of Oral QLT091001 in Retinitis Pigmentosa Due to Inherited Deficiencies of Retinal Pigment Epithelial 65 Protein (RPE65) or Lecithin:Retinol Acyltransferase (LRAT)." PLoS One **10**(12): e0143846.
- Senechal, A., G. Humbert, M. O. Surget, C. Bazalgette, C. Bazalgette, B. Arnaud, C. Arndt, E. Laurent, P. Brabet and C. P. Hamel (2006). "Screening genes of the retinoid metabolism: novel LRAT mutation in leber congenital amaurosis." Am J Ophthalmol **142**(4): 702-704.
- Seo, A., J. L. Jackson, J. V. Schuster and D. Vardar-Ulu (2013). "Using UV-absorbance of intrinsic dithiothreitol (DTT) during RP-HPLC as a measure of experimental redox potential in vitro." Anal Bioanal Chem **405**(19): 6379-6384.
- Sers, C., U. Emmenegger, K. Husmann, K. Bucher, A. C. Andres and R. Schafer (1997). "Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene *H-rev107* in tumor cell lines and experimental tumors." J Cell Biol **136**(4): 935-944.
- Shen, Y. and A. Bax (2013). "Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks." J Biomol NMR **56**(3): 227-241.
- Sheren-Manoff, M., S. J. Shin, D. Su, D. Bok, R. R. Rando and L. J. Gudas (2006). "Reduced lecithin:retinol acyltransferase expression in human breast cancer." Int J Oncol **29**(5): 1193-1199.
- Shi, Y. Q., S. Furuyoshi, I. Hubacek and R. R. Rando (1993). "Affinity labeling of lecithin retinol acyltransferase." Biochemistry **32**(12): 3077-3080.
- Simmons, D. P., F. Andreola and L. M. De Luca (2002). "Human melanomas of fibroblast and epithelial morphology differ widely in their ability to synthesize retinyl esters." Carcinogenesis **23**(11): 1821-1830.
- Simon, A., U. Hellman, C. Wernstedt and U. Eriksson (1995). "The retinal pigment epithelial-specific 11-cis retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases." J Biol Chem **270**(3): 1107-1112.
- Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." Gene **67**(1): 31-40.
- Stone, E. M. (2007). "Leber congenital amaurosis - a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture." Am J Ophthalmol **144**(6): 791-811.

- Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." Protein Expr Purif **41**(1): 207-234.
- Thompson, D. A., Y. Li, C. L. McHenry, T. J. Carlson, X. Ding, P. A. Sieving, E. Apfelstedt-Sylla and A. Gal (2001). "Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy." Nat Genet **28**(2): 123-124.
- Tortora, G. J. (2000). Principes d'anatomie et de physiologie. Québec, Éditions du renouveau pedagogique inc.
- Trehan, A., F. J. Canada and R. R. Rando (1990). "Inhibitors of retinyl ester formation also prevent the biosynthesis of 11-cis-retinol." Biochemistry **29**(2): 309-312.
- Uematsu, M., Y. H. Mohamed, N. Onizuka, R. Ueki, D. Inoue, A. Fujikawa and T. Kitaoka (2015). "A novel in vivo corneal trans-epithelial electrical resistance measurement device." J Pharmacol Toxicol Methods **76**: 65-71.
- Uyama, T., X. H. Jin, K. Tsuboi, T. Tonai and N. Ueda (2009). "Characterization of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes." Biochim Biophys Acta **1791**(12): 1114-1124.
- Varland, S., C. Osberg and T. Arnesen (2015). "N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects." Proteomics **15**(14): 2385-2401.
- Wang, X., H. Wang, V. Sun, H. F. Tuan, V. Keser, K. Wang, H. Ren, I. Lopez, J. E. Zaneveld, S. Siddiqui, S. Bowles, A. Khan, J. Salvo, S. G. Jacobson, A. Iannaccone, F. Wang, D. Birch, J. R. Heckenlively, G. A. Fishman, E. I. Traboulsi, Y. Li, D. Wheaton, R. K. Koenekoop and R. Chen (2013). "Comprehensive molecular diagnosis of 179 Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa patients by targeted next generation sequencing." J Med Genet **50**(10): 674-688.
- Watson, J. (2009). Biologie Moléculaire du Gène. Paris, Pearson Education France.
- Weljie, A. M., J. Newton, P. Mercier, E. Carlson and C. M. Slupsky (2006). "Targeted profiling: quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data." Anal Chem **78**(13): 4430-4442.
- Williamson, M. P., T. F. Havel and K. Wuthrich (1985). "Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry." J Mol Biol **182**(2): 295-315.
- Xue, L. and R. R. Rando (2004). "Roles of cysteine 161 and tyrosine 154 in the lecithin-retinol acyltransferase mechanism." Biochemistry **43**(20): 6120-6126.
- Zhang, Y. (2007). "Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7." Proteins **69 Suppl 8**: 108-117.
- Zhang, Y., I. Thiele, D. Weekes, Z. Li, L. Jaroszewski, K. Ginalski, A. M. Deacon, J. Wooley, S. A. Lesley, I. A. Wilson, B. Palsson, A. Osterman and A. Godzik (2009). "Three-dimensional structural view of the central metabolic network of *Thermotoga maritima*." Science **325**(5947): 1544-1549.

Annexes

Figure A1 : Alignement des séquences de la LRAT et de la HRASLS3

```

1
LRAT      MKNPMLLEVVSLLLEKLLLLISNFTLFSSGAAGEDKGRNSFYETSSFHARGDV
HRASLS3  -----MRAPIPEPKPGDL
                                         . : **:

51
LRAT      LEVPRTHLTHYGIYLGDNRVAHMMPDILLALTDDMGRT----QKVVSNKR
HRASLS3  IEIFRPFYRHWAIVYVGDGYVVHLAPPSEVAGAGAASVMSALTDKAIVKKE
          *: * . *:.**:**. *.*: *   :* :. .   :*.: :*.

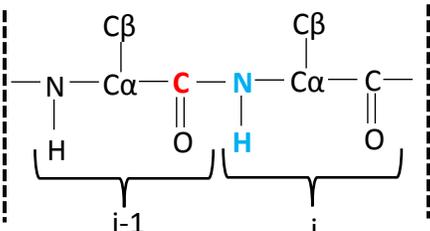
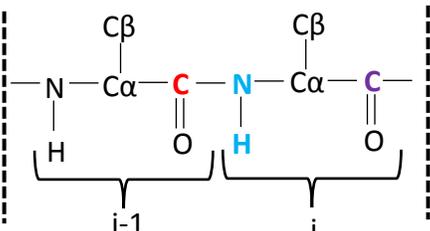
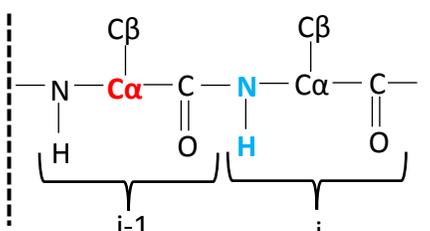
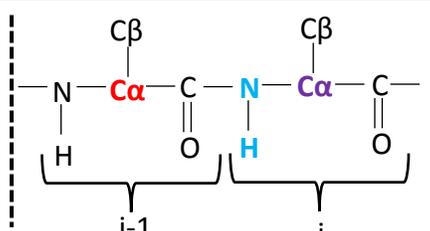
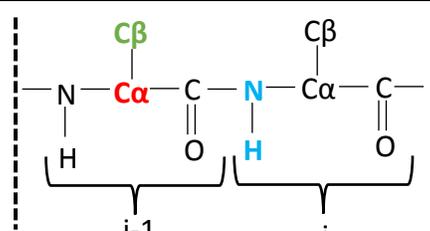
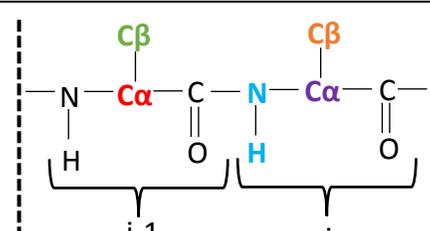
101
LRAT      LILGVIVKVASIRVDTVEDFAYGANILVNHLDESLQKKALLNEEVARRAE
HRASLS3  LLY-----DVAGSDKYQVNNKHD-DKYSPLPCSKIIQRAE
          *:                               *.* . :   **: .: . *   .: :***

151
LRAT      KLLGF-TPYLLWNNCEHFVITYCRYGTPISPQSDKFCETVKIIIRDQRSV
HRASLS3  ELVGQEVLYKLTSENCEHFVNELRYGVARSDQVRDVIIAAS-----
          :*: * . *.* :*****. ***. * *   .. :..

201
LRAT      LASAVLGLASIVCTGLVSYTTLPAIFIPFFLWMAG
HRASLS3  --VAGMGLAAMSLIGVMFSRNKRQKQ-----
          * :***::   *:: .

235
```

Figure A2: Corrélations des atomes observés dans les différents spectres

Type de spectre	Corrélations observées
HNCO	${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{CO}_{i-1}$ 
HN(CA)CO	${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{CO}_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{CO}_i$ 
HN(CO)CA	${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\alpha_{i-1}$ 
HNCA	${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\alpha_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\alpha_i$ 
CBCA(CO)NH	${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\alpha_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\beta_{i-1}$ 
HNCACB	${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\alpha_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\alpha_i$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\beta_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i}\text{-}{}^{15}\text{N}_i\text{-}{}^{13}\text{C}\beta_i$ 

CCONH	${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{C}\alpha_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{C}\beta_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{C}\gamma_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{C}\delta_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{C}\epsilon_{i-1}$
HCONH	${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{H}\alpha_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{H}\beta_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{H}\gamma_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{H}\delta_{i-1}$ ${}^1\text{H}^{\text{N}_i} - {}^{15}\text{N}_i - {}^{13}\text{H}\epsilon_{i-1}$

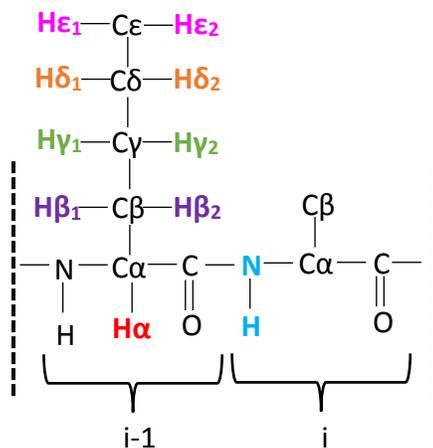
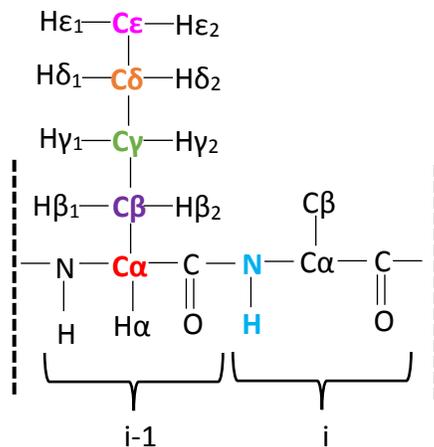


Figure A3 : Alignement des séquences de LRAT humaine (hLRAT) et murine (mLRAT)

```

1                                     50
hLRAT MKNPMLLEVVSLLLEKLLLLISNFTLFSSGAAGEDKGRNSFYETSSFHREGDV
mLRAT MKNPMLEAASLLLEKLLLLISNFKLFSVSVPGGGTGKNRPYEISSFVRGDV
***** . . ***** . *** . . * . * : * ** *** *****

51                                     100
hLRAT LEVPRTHLTHYGIYLGDNRVAHMMPDILLALTDDMGRTQKVVSNKRLILG
mLRAT LEVSRTHFIHYGIYLGDNRVAHMMPDILLALTNDKERTQKVVSNKRLLLG
*** *** : ***** : ***** : ***** : * ***** : **

101                                    150
hLRAT VIVKVASIRVDTVEDFAYGANILVNHLDLQKKALLNEEVARRAEKLLG
mLRAT VICKVASIRVDTVEDFAYGADILVNHLDGTLKKKSLNNEEVARRAEQQLG
** ***** : ***** : * : * : ***** : **

151                                    200
hLRAT FTPYSLLWNNCEHFVITYCRYGTPISPQSDKFCETVKIIIRDQRSVLASAV
mLRAT LTPYSLLWNNCEHFVITYCRYGSRISPQAEKFDYDTVKIIIRDQRSSLASAV
: ***** : ***** : * : * : ***** *****

201                                    231
hLRAT LGLASIVCTGLVSYTTLPAIFIPFFLWMAG-
mLRAT LGLASIVYTGLASYMTLPAICIPFCLWMMSG
***** *** . ** ***** *** *** .

```

Figure A4 : Scripte pour les calculs avec *CYANA*

```
peaks      := noesy_peak_list_20_unfolded.xpk # names of peak list(s)
format     := C13NOESY HC H C
prot       := attribution_meg.prot           # names of proton list(s)
tolerance:= 0.030,0.030,0.8                # shift tolerances: H, H', C/N', C/N
#calibration_constant := 6.7E5,8.2E5,8.0E4 # calibration constants,
automatic if empty
#dref      := 4.2 # distance limit median for automatic calibration
seed       := 5671 # random number generator seed

if (master) then

    # ---- check consistency of peak and chemical shift lists----

    peakcheck peaks=$peaks prot=$prot format="$format"

    # ---- calibration ----

    # calibration prot=$prot peaks=$peaks format="$format" dref=$dref
    calibration prot=$prot peaks=$peaks format="$format"
    peaks calibrate "***" simple
    write upl demo.upl
    distance modify
    write upl demo.upl

end if
synchronize

# ---- structure calculation ----

initialize
read upl demo.upl # read upper distance limits
read aco talos.aco # read angle restraints
seed=5671 # random number generator seed
calc_all structures=100 command=anneal steps=25000 # calculate con-
formers
overview test-25.ovw structures=20 pdb # write overview file and
coordinates
```

Figure A5 : Statistiques structurales à la suite des calculs avec *CYANA*

Contraintes de distance

Total de contraintes NOE	2 242
Intrarésidu $ i-j $	1 729
Séquentiel $ i-j = 1$	396
Courte distance $ i-j \leq 1$	2 125
Moyenne distance $1 < i-j < 5$	23
Longue distance $ i-j > 5$	94

Contraintes des angles dièdres

Nombre d'angles dièdres (<i>TALOS-N</i>)	222
--------------------------------------------	-----

Violations

Distance	6
Angle dièdre	14
Interaction van der Walls	16

RMSD (20 structures)

Atomes du squelette	$14,8 \pm 2,0 \text{ \AA}$
Atomes lourds	$15,2 \pm 1,9 \text{ \AA}$

Figure A6 : Superposition des 20 structures 3D de la C161S/C168S/S175R-tLRAT calculées par CYANA

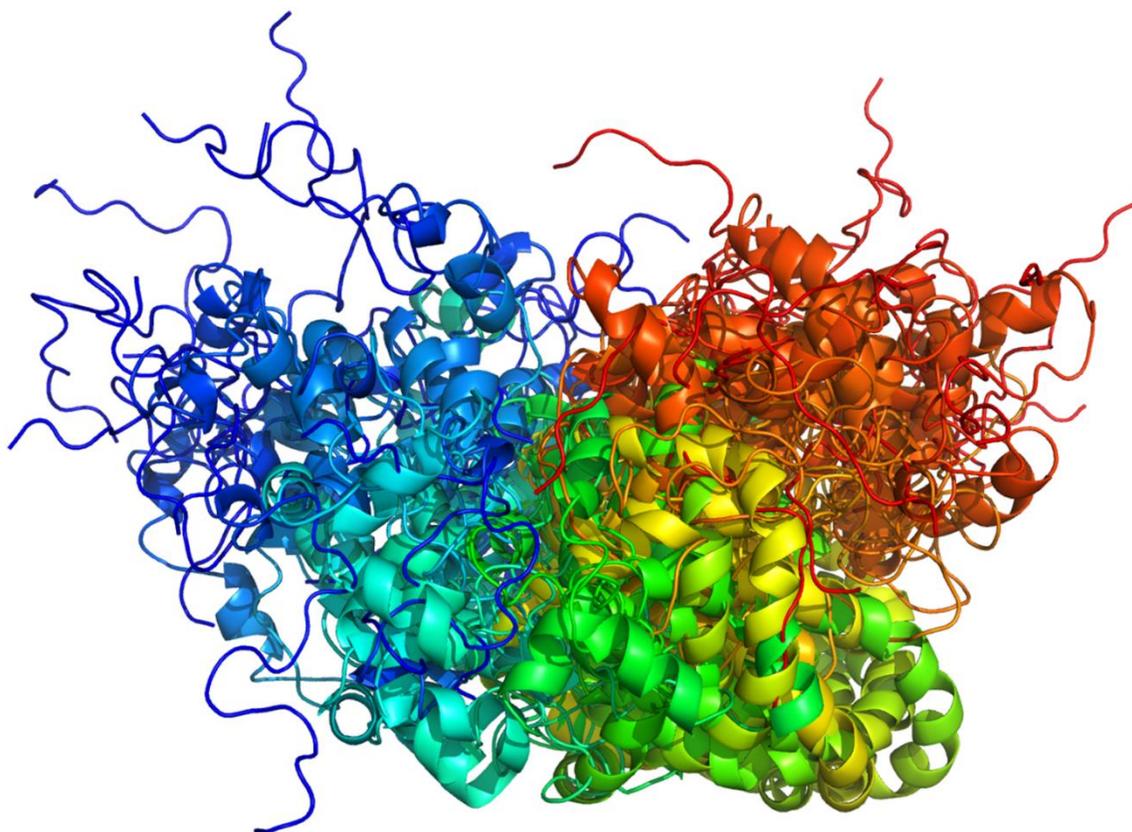
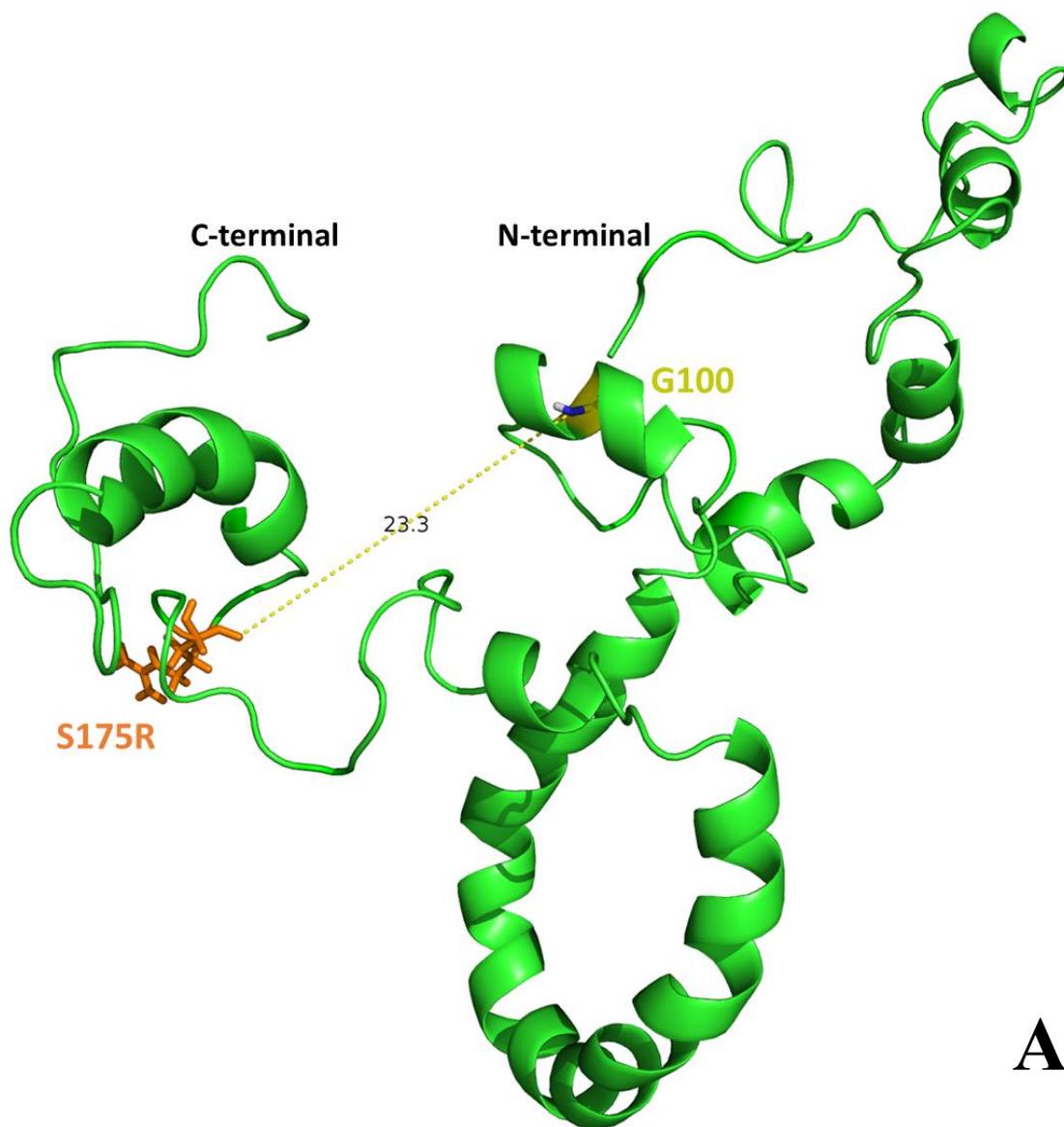
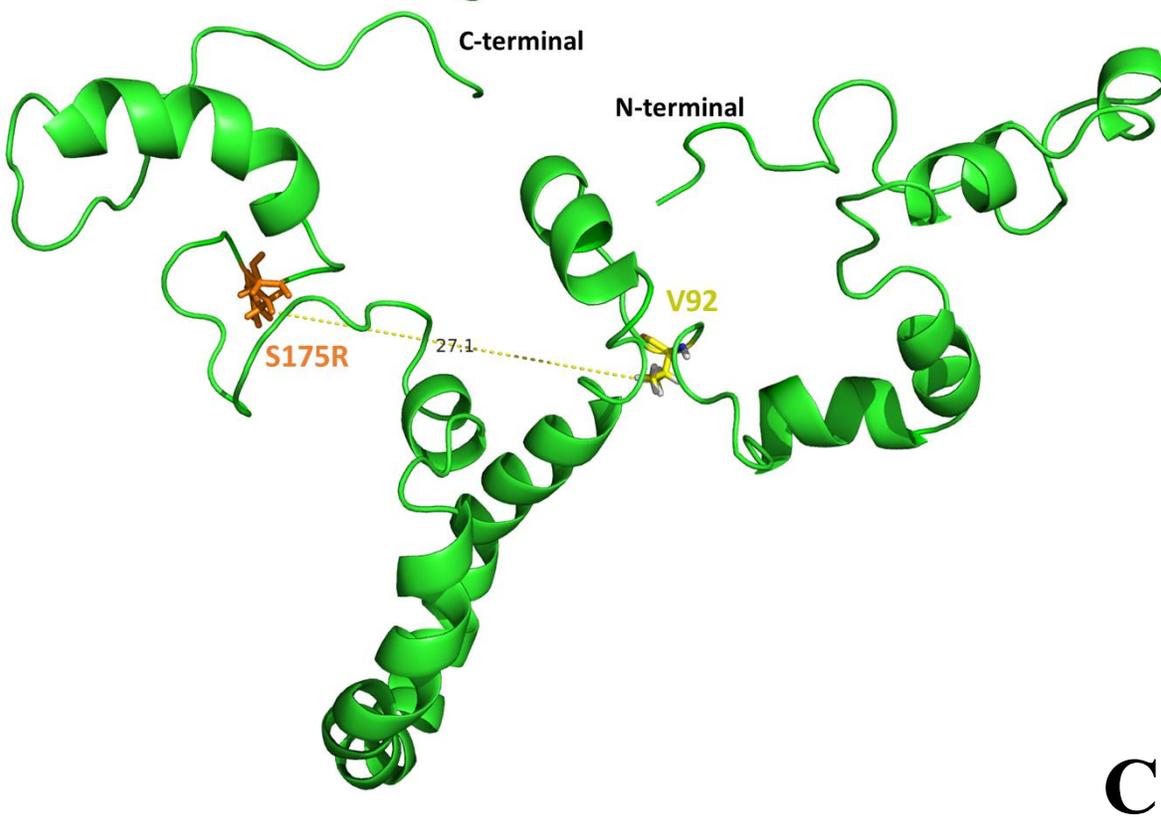
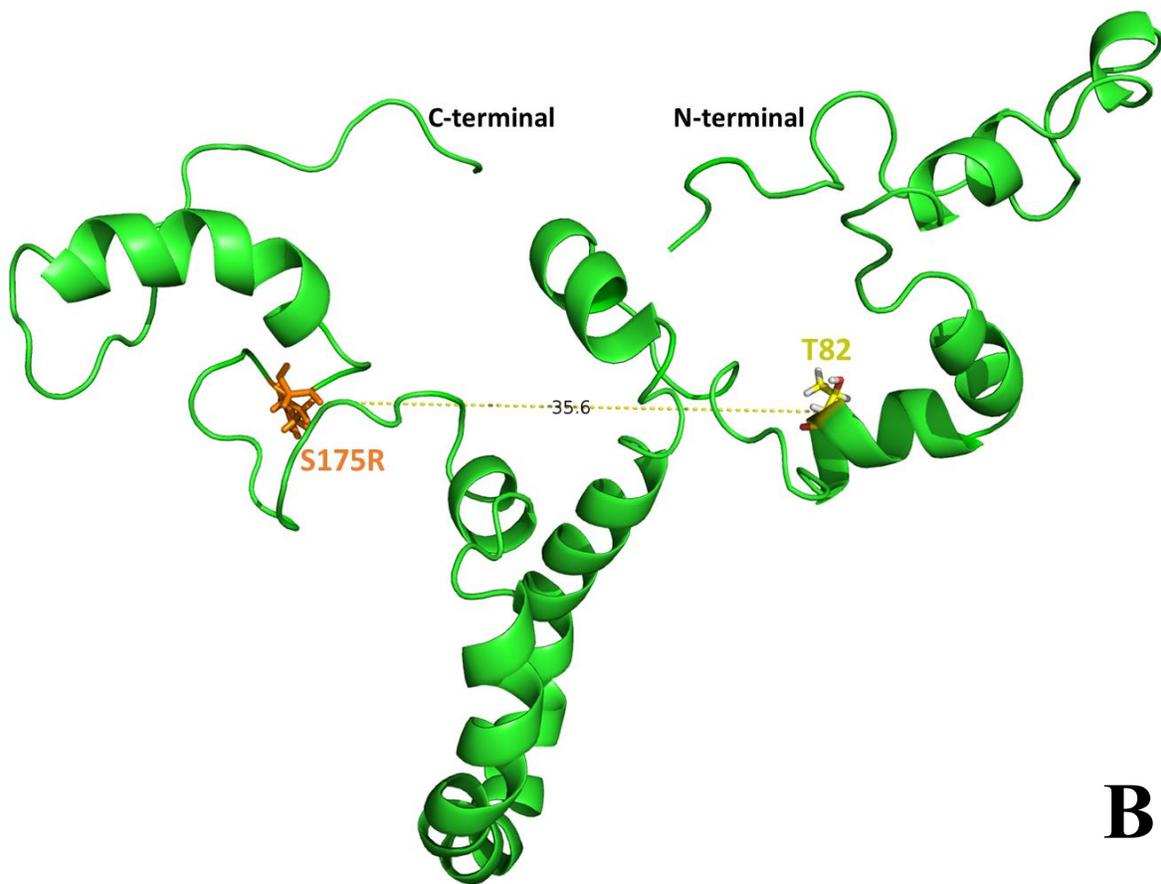
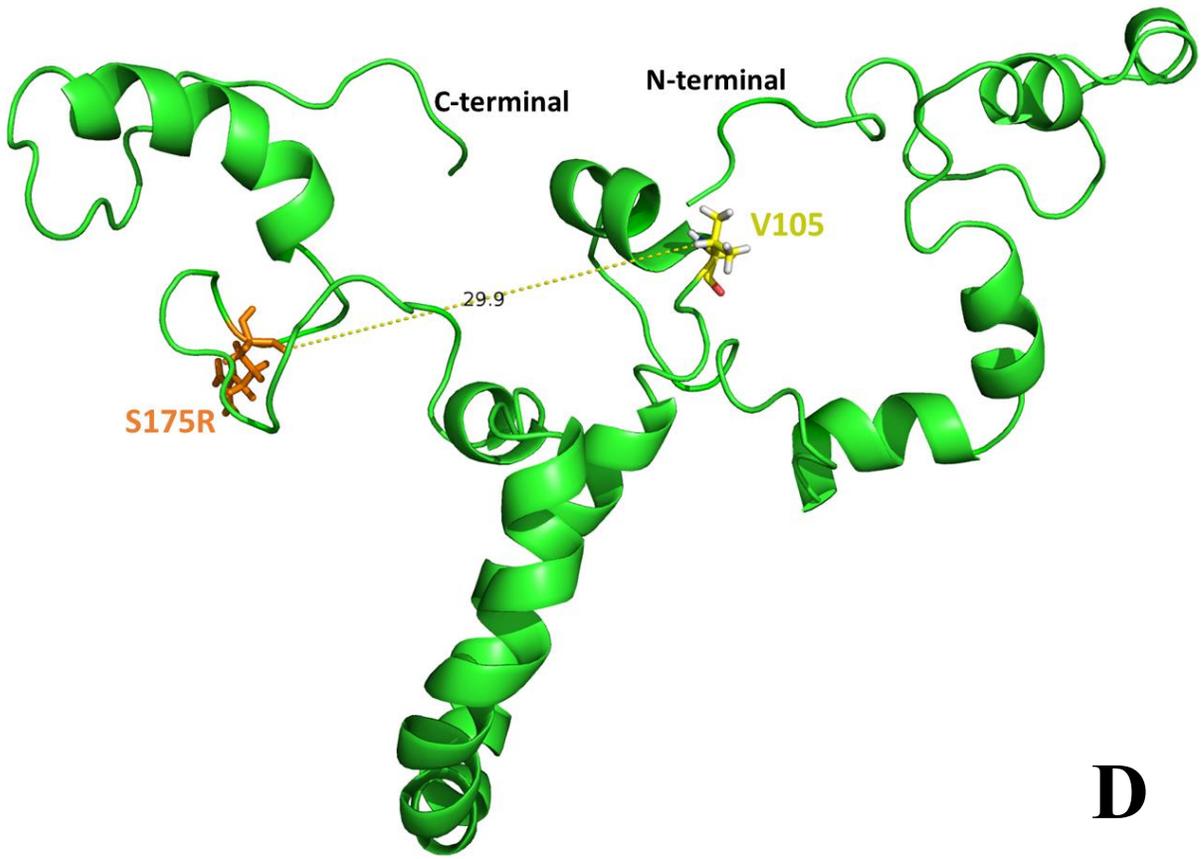


Figure A7 : Distances entre la S175R et les résidus T82, V92, G100 et V105

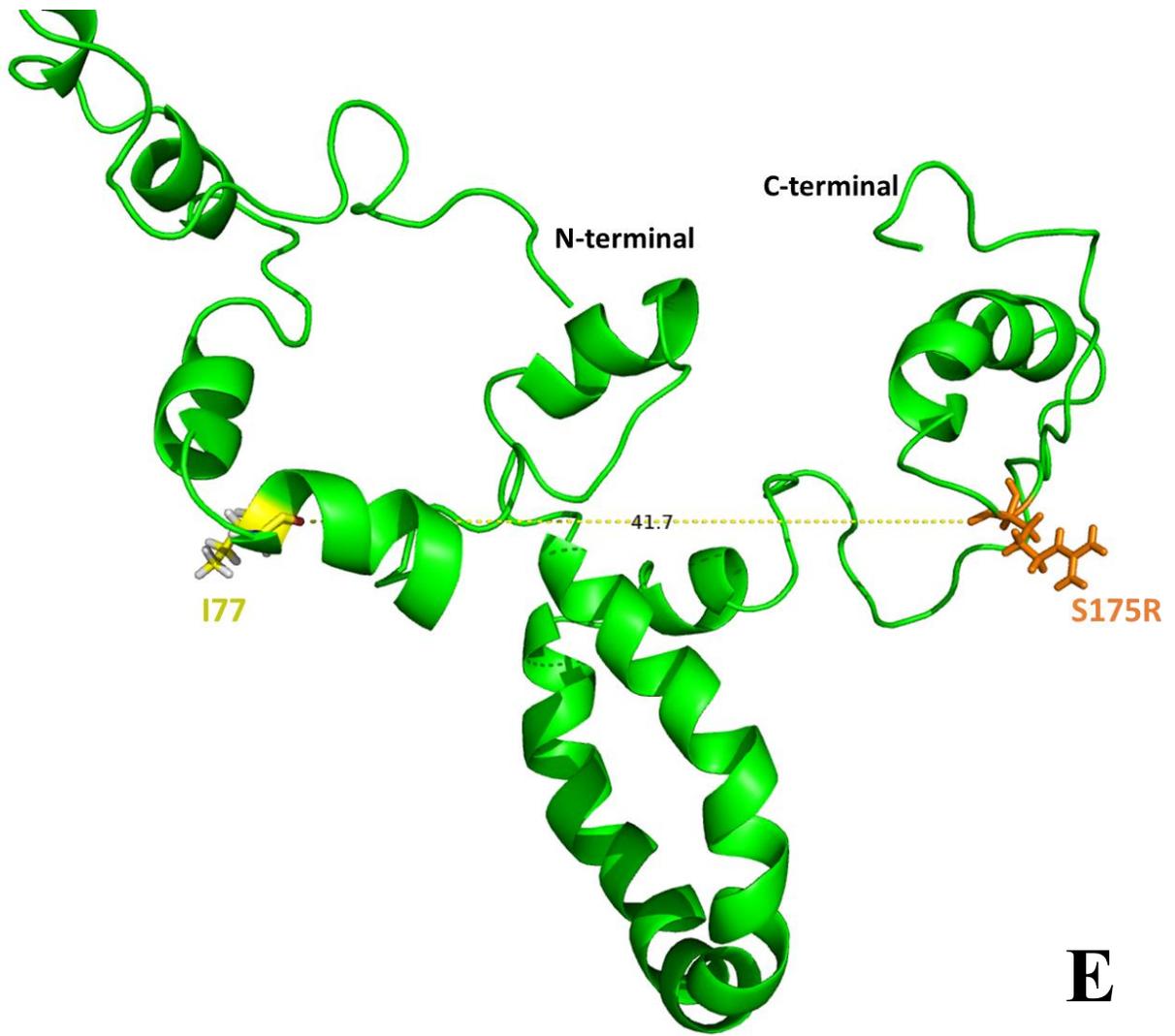


A





D



E

Figure A8 : Alignement des structures secondaires de la C161S/C168S/S175R-tLRAT 30-196 (RMN), de la prédiction I-TASSER de la LRAT et de la structure de la HSRASL3/LRAT

```

1                                     50
RMN -----ccccccccccccccccccccHH
I-TASSER cccHHHHHHHHHHHHHHHHHHHccccccccccccccccccccccccccccccccS
HRASLS3/LRAT -----cccccccSSSS

51                                     100
RMN HcccHHHHHHHcccccccHHHHHHHHcHHHHHHHHHccccccccccccccccHHHH
I-TASSER SSSSccccSSSSSSScCCSSSSccccccccccccccccccccccccccccHHHC
HRASLS3/LRAT SccccSSSSSSSSccSSSSSSSSSSSSSSSSSccccHHHcccccccSSSSSS

101                                    150
RMN HHHHccccHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHc
I-TASSER cccccSSSSSSHHHHccccSSSSScccccccccccccccccccccccccHHHHHHHHHHc
HRASLS3/LRAT SSSSSSSSSHHHHHccccSSScccccccccccccccccccccccccHHHHHHHHHHcCCSSS

151                                    200
RMN cccHHHHHcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
I-TASSER ccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
HRASLS3/LRAT SSSSHHHHHHHHHHHHHHHccccccccccSSc-----

201                                    230
RMN ccccc-----
I-TASSER HHHHHHHHHHHHHHHHHcHHHHHSSSSScCC
HRASLS3/LRAT -----

```

Figure A9 : Courbe standard du SDS à 37 °C pour la détermination de la CMC et la concentration de SDS dans les échantillons RMN.

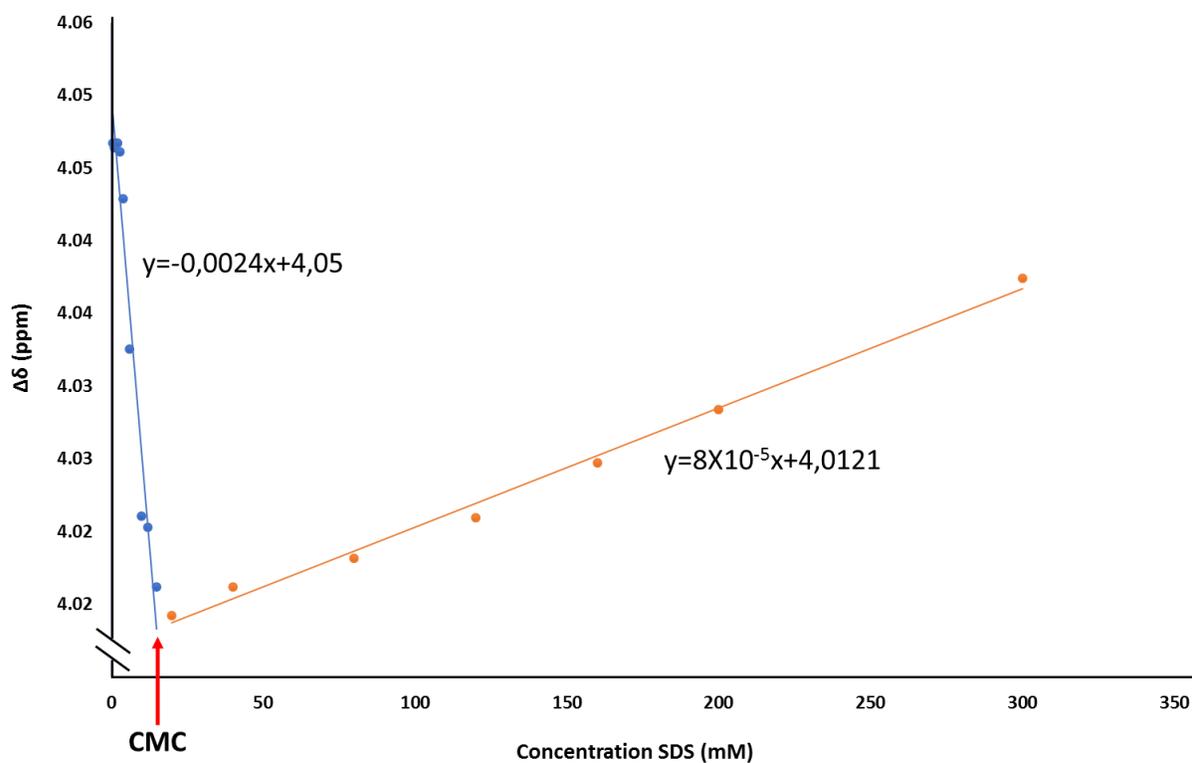


Figure A10 : Effet de la concentration de SDS dans le tampon carbonate sur l'activité de la tLRAT 30-196

