biosciences
INSTITUT DE RECHERCHE EN BIOSCIENCES DE L'UMONS
matériaux
INSTITUT DE RECHERCHE EN SCIENCE ET INGENIERIE DES MATERIAUX DE L'UMONS

UMONS Université de Mons

Production et caractérisation de protéines adhésives recombinantes d'étoile de mer (*Asterias rubens*)

Mathilde Lefevre[1,2]*, Patrick Flammang[3], Lionel Tafforeau[1], Ruddy Wattiez[4], Elise Hennebert[1], Philippe Leclère[2]

[1] Laboratoire de Biologie Cellulaire - Institut de recherche en Biosciences, Université de Mons (UMONS), Mons, Belgique
[2] Service de Chimie des Matériaux Nouveaux - Institut de recherche en Sciences et Ingénierie des Matériaux, Université de Mons (UMONS), Mons, Belgique
[3] Laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme - Institut de recherche en Biosciences, Université de Mons (UMONS), Mons, Belgique
[4] Laboratoire de Protéomique et Microbiologie - Institut de recherche en Biosciences, Université de Mons (UMONS), Mons, Belgique
*Contact: Mathilde.Lefevre@umons.ac.be

État de l'art

Les étoiles de mer sont capables de se fixer fermement mais temporairement sur une large variété de substrats en utilisant une multitude de petits appendices, appelés *podia* (Figure 1A). Quand le podion entre en contact avec le substrat, deux types de cellules adhésives co-sécrètent un mélange de protéines qui forment une couche adhésive entre le podion et le substrat. Après le détachement du podion, le matériel adhésif formant un réseau demeure sur la surface comme une empreinte (Fig. 1B,C) [1,2].

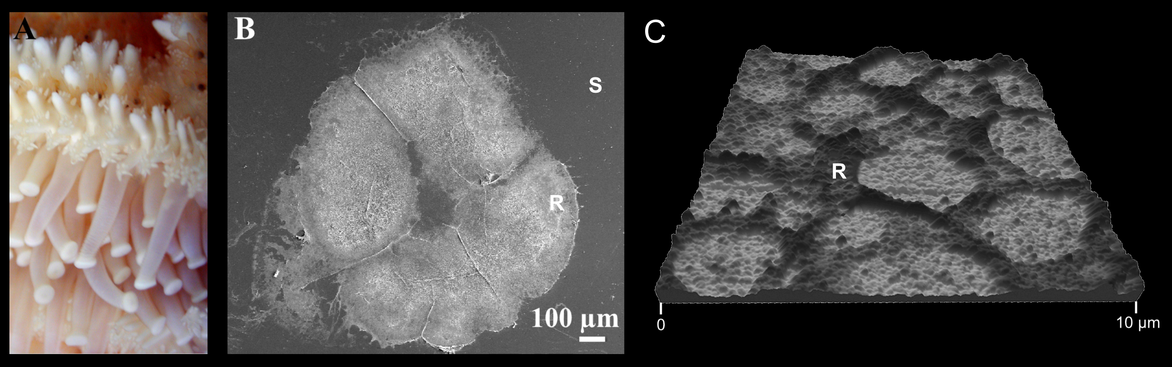

Figure 1. Podia et empreintes d'*Asterias rubens*. (A) Photo de podia, (B) Photo d'une empreinte adhésive au microscope électronique à balayage [2], (C) Image en microscopie à force atomique du matériel adhésif composant l'empreinte [2].
R Réseau, S Substrat

Récemment, une analyse en spectrométrie de masse des protéines d'empreintes, combinée au séquençage des ARN messager (ARNm) exprimés dans les podia, a permis l'obtention des séquences de l'entièreté des protéines constituant le matériel adhésif [3]. Parmi ces 35 protéines, 20 présentent des similarités avec des protéines connues, mais les 15 autres, qui sont aussi les plus abondantes, ne présentent pas d'homologues connus dans les bases de données.

L'une de ces protéines adhésives, Sfp1 (Sea star footprint protein 1), a été caractérisée [4]. Cette grande protéine de 3853 acides aminés est traduite à partir d'un seul ARNm, et ensuite clivée en 4 sous-unités reliées par des ponts disulfures. Ces sous-unités présentent des domaines de liaison aux protéines, aux carbohydrates, ainsi qu'aux métaux (Fig. 2).

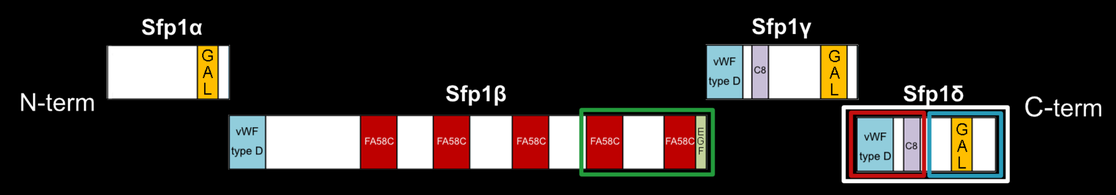

Figure 2. Sous-unités et domaines de la protéine Sfp1 [4]. Vert, domaine de type Epidermal Growth Factor (EGF) liant le calcium; Jaune, domaine de type lectine se liant au galactose; Rouge : domaine discoïdine; Bleu, domaine de type D du facteur de von Willebrand; Mauve, domaine C8. Les cadres mettent en évidence les parties de protéines produites pour cette recherche.

But

Le but de cette recherche est de produire des protéines recombinantes sur base de la séquence de Spf1. Dans un second temps, ces protéines sont caractérisées d'un point de vue physico-chimique, et plus particulièrement, au niveau de leurs caractéristiques fonctionnelles tel que l'adsorption et les propriétés adhésives.

Production des protéines biomimétiques

Différentes parties de la protéine Sfp1 ont été produites de manière recombinantes (voir encadrés Fig. 2) : la partie C-terminale de la sous-unité Beta, la sous-unité Delta, ainsi que les parties N-terminale et C-terminale de la sous-unité Delta. La présence et le degré de pureté de celles-ci ont été confirmés sur gel SDS-PAGE et par Western-blot.

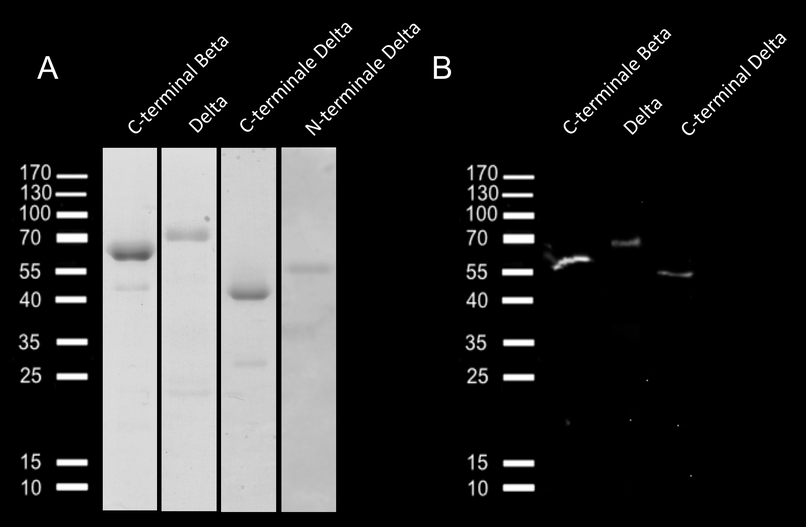

Figure 3. Production des parties de Sfp1 (A) Gel SDS-PAGE. Eluat obtenu après purification pour la partie C-terminale de Beta, Delta, N-terminale et C-terminale de la sous-unité Delta. (B) Western Blot pour trois parties de Sfp1. Les protéines recombinantes couplées à un tag histidine purifiées sont séparées sur gel SDS-PAGE et immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-his tag pour la partie C-terminale de Beta et un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide de la sous-unité Delta pour la partie C-terminale et la sous-unité Delta.

Topographie

La partie C-terminale de Beta présente plusieurs topographies. Certaines zones contiennent des hélices (Fig. 4A,B) mais des régions plus homogènes sont également observables (Fig. 4C). La sous-unité Delta montre une couche homogène et identique sur l'ensemble de l'échantillon (Fig. 4D). Le mélange des deux protéines semble montrer une organisation et la présence de fibres (Fig. 4E). Le contrôle utilisé, la BSA, consiste en une couche très fine et homogène (Fig. 4F).

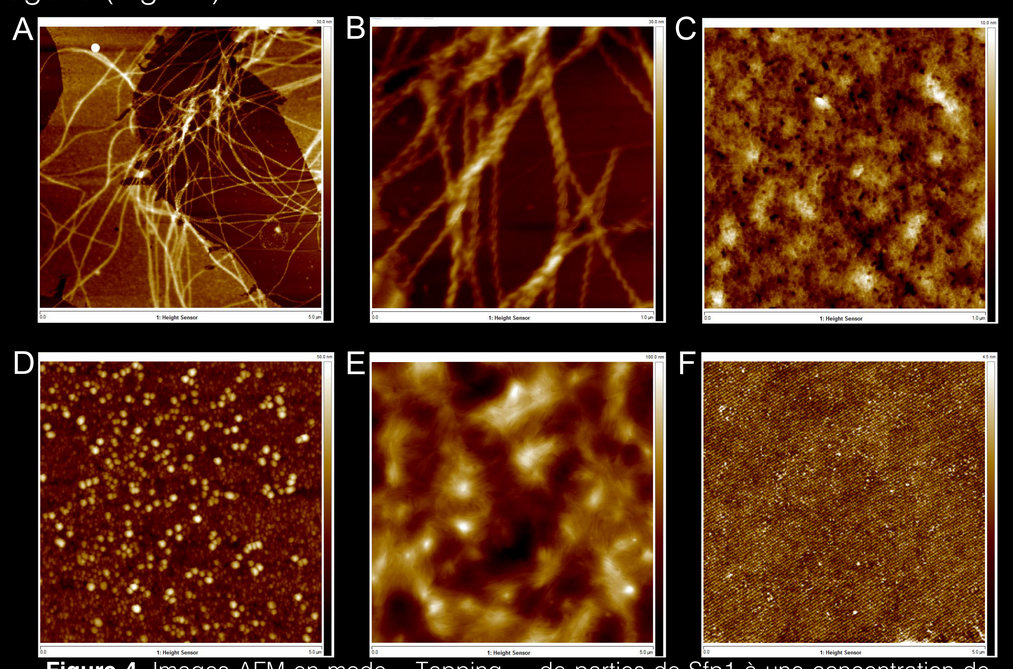

Figure 4. Images AFM en mode « Tapping » de parties de Sfp1 à une concentration de 20 ng/µL (A,B,C,D) Beta C-terminale (E) Delta (F) BSA (Bovine Serum Albumine)

Propriétés mécaniques

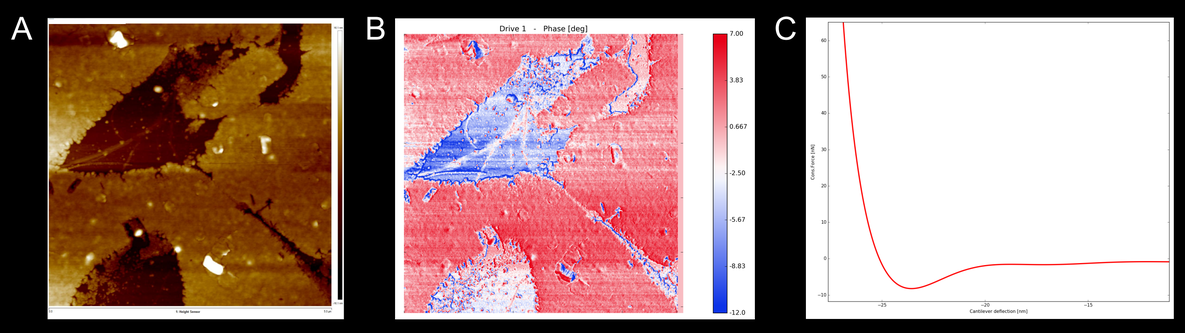

Figure 5. Images en Intermodulation AFM (ImAFM), Model Fit DMT. (A) Topographie de Beta C-terminale (B) Phase de Beta C-terminale (C) Courbe de force de la couche de protéines Beta C-terminale

La partie C-terminale de Beta a été analysée en Intermodulation AFM [5] (Fig 5 A, B). Cette méthode permet d'obtenir une courbe de force pour chaque pixel de l'image. La courbe de force (Fig. 5C) montre une force d'adhérence d'une valeur de ~8 nN. L'ensemble de pixels de l'échantillon présentent des courbes similaires.

Les futures expérimentations consisteront à l'optimisation du modèle pour établir la cartographie des propriétés mécaniques tels que le module de Young E, la déformation, l'adhérence, etc…

Perspectives

Pour étudier les interactions des protéines recombinantes entre elles (par exemple, entre deux domaines fonctionnels différents), ou avec d'autres biopolymères, la microscopie à force chimique (CFM) sera utilisée. Une protéine recombinante sera greffée à la pointe de la sonde qui sera ensuite utilisée pour mesurer les forces d'interaction locales avec une autre partie de la protéine ou un biopolymère tel que le galactose déposé sur lame de verre.

Cette recherche est supportée par le projet ARC Protest (Actions de Recherche Concertées). P.L. et P.F. sont, respectivement, maître de recherches et directeur de recherches pour le Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS de Belgique (F.R.S.-FNRS). L'action COST CA15216 est également remerciée ainsi que le F.R.M.H. (Fonds pour la Recherche Médicale dans les Hainaut) pour leur soutien lors de cette recherche.

Références : [1] Flammang, P.; Michel, A.; Van Cauwenberge, A.; Alexandre, H.; Jangoux, M. *Journal of Experimental Biology* **1998**, *201*, 2383., [2] Hennebert, E.; Viville, P.; Lazzaroni, R.; Flammang, P. *Journal of Structural Biology* **2008**, *164*, 108., [3] Hennebert, E.; Leroy, B.; Wattiez, R.; Ladurner, P. *Journal of Proteomics* **2015**, *128*, 83., [4] Hennebert, E.; Wattiez, R.; Demeuldre, M.; Ladurner, P.; Hwang, D.S.; Waite, J.H.; Flammang, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 6317, [5] Platz, D.; Tholen, E. A.; Pesen, D.; Haviland D. B. *Applied Physics Letters* **2008**, *92*, 153106.