UNIVERSITE DE ROUEN
Ecole Doctorale Normande Chimie-Biologie

THESE

présentée par

Ludovic Carlier

pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université de Rouen

Spécialité : Biologie Structurale et Fonctionnelle

Production de domaines recombinants PRODH en vue de l'analyse structurale

&

Caractérisation de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire

Soutenue le 10 Juillet 2006 devant le jury :

Président	Patrice LEROUGE
Rapporteur	Constantin T. CRAESCU
Rapporteur	Jean-Pierre SIMORRE
Examinateur	Bernard GILQUIN
Examinateur	Laure GUILHAUDIS
Directeur de Thèse	Daniel DAVOUST

préparée au Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de
l'Equipe de Chimie Organique et Biologie Structurale (CNRS UMR 6014, IFRMP 23)

A la mémoire de ma belle-maman,

Belle tu l'as été, quand tu m'as élevé comme ton propre fils,
Belle tu l'es restée, lorsque tu as fait face avec courage à la maladie, et
Belle, tu le seras toujours dans le cœur de tes enfants.

« Rêve de grandes choses, cela te permettra
au moins d’en faire de toutes petites »

Jules Renard (1864-1910)

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Docteur Constantin Craescu, Directeur de Recherche à l'Institut Curie de l'Université d'Orsay, et le Docteur Jean-Pierre Simorre, Directeur de Recherche à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel de l'Université de Grenoble, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail. Je voudrais également remercier le Professeur Patrice Lerouge, du Laboratoire de Structure/fonctions des glucides de l'Université de Rouen, et le Docteur Bernard Gilquin, du Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines du CEA de Saclay, de participer à ce jury.

Voici donc le moment tant attendu des remerciements… Après quatre années de thèse où se sont alternés « des hauts » et « des bas », il est temps pour moi de confirmer une rumeur de plus en plus persistante : ces quatre années de doctorat, et les deux sujets sur lesquels je me suis penché, n'ont pas eu raison de ma passion pour la recherche qui en sort bien plus ravivée. Alors, je le dis haut et fort : « la recherche, c'est formidable ! », même si (ma famille et mes proches en conviendront) cette passion demande parfois quelques sacrifices. J'ai eu la chance d'avoir été accueilli dans pas moins de 4 laboratoires durant cette thèse, et d'avoir côtoyé des chercheurs de différents horizons qui m'ont énormément appris, tant sur le plan scientifique, que sur le plan humain. A moi à présent de remercier toutes les personnes qui m'ont aidées, de près ou de loin, à obtenir les résultats présentés dans ce manuscrit. J'espère ne pas en oublier !!!

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Daniel Davoust, Directeur de l'Equipe de Chimie organique et Biologie Structurale de l'Université de Rouen, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée depuis le premier apprentissage que j'ai effectué dans votre laboratoire de RMN dans le cadre d'un stage de maîtrise de chimie, il y a déjà quelques années…

J'exprime mes profonds remerciements aux Docteurs Laure Guilhaudis et Isabelle Milazzo pour avoir encadré ce travail de thèse. Merci d'avoir partagé vos connaissances scientifiques avec un « zouave » de mon espèce. La qualité de vos rapports humains, le suivi constant de ce travail, et l'émulation scientifique dont vous avez fait part, ont largement contribué à la réussite de cette thèse : « chapeaux bas !!! ».

Que les rencontres furent nombreuses et enrichissantes au cours de ces quatre années! Des médecins aux modélistes, en passant par les généticiens, les biochimistes, et bien sûr les RMNistes, vous m'avez formé à différentes techniques dans vos laboratoires respectifs, et transmis un savoir extraordinaire à travers de nombreuses discussions, qui se sont parfois prolongées au-delà des heures réglementaires autour d'un petit verre sur une terrasse…

● Au Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'EMI 9906 (INSERM U614) :

J'adresse mes remerciements au Professeur Thierry Frébourg pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et intégré à son équipe pendant les huit premiers mois de cette thèse. Je remercie également le Docteur Dominique Campion pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Un grand merci à Hélène Jacquet-Delmulle pour m'avoir introduit dans l'univers de la proline déshydrogénase et de la schizophrénie. Ton aide et ton initiation à la biologie moléculaire m'ont été très précieux ! Merci également à Grégory Raux d'avoir construit le premier vecteur de surexpression de PRODH même si, à priori, nous n'avons pas la même vision de la recherche et des relations humaines.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Docteur Chahrazed El Hamel qui m'a prise sous son aile pendant mon séjour dans ce laboratoire. Je souhaite te témoigner toute mon admiration pour l'étendue de tes connaissances, la qualité de ton encadrement, et l'immense gentillesse qui te caractérise.

Un grand merci à Cécile, Magalie, Nathalie, Jackie, Audrey, Olivier, Anne, et Isabelle pour votre amitié et votre précieuse aide. Courage Olivier, tu vas y arriver !!!

● Au Laboratoire de Marquage des Protéines du CEA de Saclay :

Difficile d'écrire ces quelques lignes sans une certaine émotion car mon passage au LMP a été l'occasion de rencontrer des personnes plus formidables les unes que les autres. Mes remerciements s'adressent tout d'abord au Docteur Roger Genet, responsable de cette équipe, qui m'a accueilli avec sympathie et enthousiasme avant de partir vers des fonctions ministérielles.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux Docteurs Muriel Gondry et Sandrine Braud, les « deux femmes de ma thèse ». Je ne te remercierai jamais assez Muriel pour tout ce que tu as fait pour moi : ton écoute et tes encouragements m'ont redonné confiance lorsque le moral n'y était plus. Tu m'as énormément appris dans le domaine de la protéine recombinante que tu compares si joliment à de la « cuisine » ! Un grand merci également à ma p'tite mamie Braud qui m'a encadré avec tout le sérieux et la rigueur qu'on lui connaît. J'ai eu la chance de découvrir la femme formidable qui se cachait au fond de la « working girl », et ça vaut le détour !!! (comme quoi il ne faut jamais se fier aux apparences).

Mon passage au LMP n'aurait pas été si plaisant sans la présence inattendue d'un fan club de groupies présidé par Rachel Amouroux et Muriel Bahut. Merci beaucoup Rachel, alias « super boomeuse », pour ton amitié et ton soutien. Tu voulais du rêve, je t'ai offert un Mc Do, que souhaiter de mieux ??? Grâce à toi, je me souviendrais longtemps de ce chef-d'œuvre du cinéma américain intitulé « independence day »… Merci ma p'tite Muriel, alias « Mu-Mux », pour ta bonne humeur, ta joie de vivre, tes fous rires communicatifs, et ton accent du sud qui te va si bien. Je remercie Marie Courçon et Cédric Masson pour leur aide précieuse et leur sympathie de tous les instants. Je salue également Cathy, Marianne, Mireille, Carine, Jean, Christine, et Jean-Baptiste, ainsi que les vigiles de la FLS avec qui j'ai eu l'occasion de partager quelques courses-poursuites (qui a dit que la recherche n'était pas sportive ?).

● ***Au Laboratoire de Structure des Protéines du CEA de Saclay :***

J'exprime ma profonde reconnaissance aux Docteurs Bernard Gilquin, Sophie Zinn-Justin, et Joël Couprie pour m'avoir permis de travailler sur la protéine KIN17. Avoir été encadré par vous trois est pour moi une véritable chance, tant sur le plan scientifique, que sur le plan humain. Merci beaucoup Joël d'avoir élargi mon horizon à la RMN 3D et d'avoir répondu à mes nombreuses questions avec gentillesse et disponibilité. Un immense merci au Monsieur Modélisation Moléculaire du LSP, en la personne de Bernard Gilquin, pour ses longues discussions passionnées sur le programme d'attribution automatique des nOe. Quel bel outil ! Je reste assurément votre premier fan ! Merci beaucoup Sophie de m'avoir guidé dans la rédaction de ce manuscrit : tu as éclairé ma lanterne à de nombreuses reprises !

Je salue également tous les étudiants et post-docs du LSP que j'ai eu l'occasion de côtoyer en commençant par Albane le Maire qui a finie par ne plus confondre mon prénom après 12 mois de collaboration !!! Plus sérieusement, merci Albane de m'avoir accepté sur KIN17 et pour le temps que tu m'as consacré. Spéciale dédicace à Sandrine Caputo : tiens tiens, un Winged Helix peut en cacher un autre… Je te remercie chaleureusement pour ton aide spontanée, ton extrême gentillesse, et pour m'avoir offert deux nuits dans le New York parisien. Merci également à Gaëlle, Cédric, Nathalie, et Virginie avec qui j'ai partagé de belles discussions.

● ***Au Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université de Rouen***

J'en reviens finalement à mon laboratoire d'accueil qui a également été le théâtre de très jolies rencontres. J'adresse mes profonds remerciements aux Docteurs Hassan Oulyadi et Eric Condamine qui m'ont beaucoup appris dans le domaine de la RMN haute résolution, et pas seulement des macromolécules biologiques ! Merci au Docteur Gaël Coadou, le « nouveau venu », pour ses conseils frais et dynamiques.

Un grand merci à Nicole Roussel, véritable pièce maîtresse de ce labo, qui s'occupe si bien de « ses petits étudiants » avec une immense, que dis-je ? Une péninsule de gentillesse.

Je remercie également toutes les « vieilles canailles » avec qui j'ai passé de très bons moments pendant ces quatre années. Aux anciens pour commencer : Karine courchay, merci de m'avoir fait découvrir des endroits chaleureux avec de la musique ringarde remixée et des lumières de toutes les couleurs. A Michel Auvray, alias « michou », l'homme le plus extraordinaire que j'ai rencontré dans un labo ! Merci d'avoir réinventé la recherche : si le CNAM en recrute encore deux comme toi, alors il peut mettre la clef sous la porte, mais il en sortira humainement grandi !!! A Didier Rivière, alias le « créolais », merci pour les belles parties de tennis, et comme l'a souligné « michou », pour ta vision optimiste de la recherche… A Pedro Lameiras, le footballeur portugais le plus parisien, un immense merci pour avoir partagé tes connaissances de la RMN avec autant de générosité, et pour ton amitié qui m'a beaucoup touchée. A Franck Paté : qui aurait cru, lorsque nous pratiquions le tarot intensif pendant les cours de philo en terminale, que nous arriverions à ce niveau d'étude ? (surtout ne le dis à personne, ce sera notre secret). A Anne Lautrette, j'ai une révélation à te faire : je déteste ton café ! Quoi qu'il en soit, merci beaucoup pour ta sympathie même si au début ce n'était pas gagné ! A Romain Thuau, mon technicien supérieur préféré, sans aucun doute le chercheur au plus grand cœur que je connaisse. Merci ma poule pour ton amitié sans calcul. Je te souhaite tous mes vœux de bonheur avec la belle Nadège que je salue au passage.

Je tiens également à exprimer toute ma sympathie aux membres du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique pour leur gentillesse et leurs conseils judicieux : le Professeur Catherine Lange, les Docteurs Marie Hubert-Roux, Corinne Loutelier-Bourhis, et Héléne Lavanant, ainsi qu'Albert Marcual. Je salue également les joyeux étudiants de ce laboratoire : Julie Hardouin, Delphine Oursel, Thomas Vincent (félicitations pour cet heureux événement), et le non moins gigantesque Romain Dolé, alias « p'tit bouchon », qui gagne à être connu et reconnu !

Enfin, je ne pouvais terminer ces remerciements sans témoigner ma profonde reconnaissance à mes plus fidèles proches qui m'ont énormément soutenus pendant ces quatre années de thèse. Un grand merci à Sammy, Aurélie, Frédo, Greg, et mon p'tit TD pour vos nombreux encouragements et votre amitié.

MERCI A TOUS !!!

TABLE DES MATIERES

CARACTERISATION DE LA REGION 51-160 DE LA PROTEINE KIN17 HUMAINE PAR RMN ET MODELISATION MOLECULAIRE

ABREVIATIONS

1D, 2D, 3D, 4D	Expérience RMN à une, deux, trois, ou quatre dimension(s)
3PM	Programme de Production et Marquage des Protéines
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Ampi	Ampicilline
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATP	Adenosine TriPhosphate
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BER	Base Excision Repair
CAM	ChlorAMphénicol
CNS	Cristallography and NMR System
COSY	COrrelation SpectroscopY
CSD	Chemical Shift Deviation (déplacement chimique secondaire)
DC	Dichroïsme Circulaire
DNase	Désoxyribonucléase
DO	Densité Optique
DTT	1,4-DiThioTréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ESI	ElectroSpray Ionization
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
$FADH_2$	Flavine Adénine Dinucléotide réduit
FMN	Flavine MonoNucléotide
GABA	Acide gamma amino-butyrique
HCA	Hydrophobic Cluster Analysis
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence spectroscopy
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HR	Homologous Recombinaison
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfert
IPTG	IsoPropyl β-D ThioGalactopyranoside
IR	Radiations ionisantes

ITD-MS	Ion Trap Detector-Mass Spectroscopy
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
MMR	MisMatch Repair
MMS	Methyl Methane Sulfonate
NAD^+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
$NADP^+$	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non Homologous End Joining
nOe	nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PRODH	PROline DésHydrogénase
PVDF	PolyVinylidine DiFluoride
P5C	Pyrroline-5-Carboxylate
P5CDH	Pyrroline-5-Carboxylate DésHydrogénase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNase	Ribonucléase
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
TCEP	Tris((2-CarboxyEthyl)Phosphine)
TEV	Tobacco Etch Virus
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
TRIS	Tris(hydroxyméthyl) amino méthane
TSP	3-(TriméthylSilyl)[2,2,3,3-$^2H_4$] Propionate
TST	Tris Saline Tween
UV	Ultraviolet
E. coli	*Escherichia coli*

Préambule

Les protéines sont des polymères d'acides aminés qui, avec l'eau, représentent les composants principaux des organismes vivants. A l'image de l'ADN, support de l'information génétique et de l'hérédité, elles peuvent être considérées comme les molécules fondamentales de la vie. Cependant, à la différence des acides nucléiques qui sont à l'origine de leur synthèse, les protéines se caractérisent par une diversité fonctionnelle immense associée à une diversité structurale considérable. Bien que les êtres vivants n'utilisent qu'une vingtaine d'acides aminés différents pour composer les protéines, la grande diversité structurale de ces macromolécules s'explique par la variabilité de l'enchaînement des acides aminés dans la séquence primaire, qui guide véritablement la nature du repliement. Avec l'essor de la biologie structurale, il est aujourd'hui communément admis que la fonction d'une protéine est intimement liée d'une part, à sa structure tridimensionnelle, c'est-à-dire à l'organisation de ses atomes dans l'espace, et d'autre part, à sa dynamique intra-moléculaire, c'est-à-dire à l'amplitude des mouvements de ses atomes. A l'heure où la caractérisation des fonctions des protéines encodées par les génomes constitue un défi majeur de l'ère post-génomique, la détermination de la structure tridimensionnelle des protéines à l'échelle de l'atome représente donc un enjeu considérable dans l'optique d'identifier et de comprendre leur(s) fonction(s). Cette approche, appelée « étude structurale », a pour objet d'apporter des informations sur les relations structure-activité, et structure-dynamique-activité, et ainsi d'améliorer la compréhension des bases moléculaires du rôle de ces molécules. Une telle étude peut avoir deux objectifs différents :

- Dans le cas de protéines de fonction inconnue, la connaissance de la structure tridimensionnelle va permettre, par comparaison avec celles dont le repliement est proche, de proposer une ou plusieurs activités pour la biomolécule étudiée.

- Lorsque la fonction est connue, l'objectif est d'identifier les éléments de structure ou les acides aminés essentiels à l'activité dans le but de caractériser les mécanismes réactionnels spécifiques de la fonction. Ceci peut être initié, par exemple, en comparant les structures native et mutée (induisant une modification de l'activité) d'une même protéine, ou en identifiant les sites d'interaction avec des partenaires biologiques potentiels (ligand, substrat, cofacteur, partenaire protéique…).

C'est dans cette double optique que nous avons entrepris l'étude structurale de deux protéines humaines : la protéine mitochondriale proline déshydrogénase (PRODH) qui fait

l'objet de la première partie de ce manuscrit, et la protéine nucléaire KIN17 qui fait l'objet de la seconde partie.

A ce jour, il existe plusieurs techniques qui offrent la possibilité de caractériser la structure tridimensionnelle d'une protéine. Cependant, seules la cristallographie des rayons X et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en solution permettent d'atteindre une résolution de l'ordre de l'Angström qui est nécessaire pour comprendre le fonctionnement d'objets moléculaires aussi petits que les protéines. Quelle que soit la technique utilisée, la RMN ou la cristallographie, le préliminaire à une étude structurale est l'obtention d'une **quantité importante** de la protéine à étudier (~ 1 µmole dans 500 µL, c'est-à-dire ~ 15 mg pour une protéine de 15 kDa) sous forme **soluble**, **pure**, et **stable**. Ces critères constituent véritablement les exigences inhérentes à l'analyse structurale. A l'heure actuelle, trois méthodes permettent potentiellement de remplir ces conditions : la protéine peut être directement extraite de son organisme naturel, synthétisée chimiquement, ou surexprimée sous forme recombinante dans un organisme hôte. Cependant, les quantités obtenues par extraction sont souvent insuffisantes, et la synthèse chimique devient difficilement réalisable pour des polypeptides de plus de 50 acides aminés. Pour ces raisons, la surexpression dans un système recombinant est de loin la technique la plus utilisée, d'autant plus qu'elle permet de réaliser des marquages isotopiques indispensables à l'étude d'une protéine de taille élevée (> 10 kDa) par RMN.

Les organismes de surexpression les plus courants sont les bactéries, les levures, et les cellules d'insectes (baculovirus). Pour des raisons essentiellement liées à sa facilité d'utilisation, et à sa capacité à produire des quantités importantes de protéine marquée, la bactérie *Escherichia coli* est le système le plus communément utilisé. C'est pourquoi, nous avons entrepris de surexprimer des domaines protéiques de PRODH et KIN17 chez cet hôte bactérien. Cependant, bien que la protéine d'intérêt soit produite *in vivo*, il n'est pas garanti qu'elle adopte un repliement stable et biologiquement actif. En d'autres termes, le comportement d'une protéine exogène exprimée dans un organisme recombinant n'est pas prévisible, et la préparation de l'échantillon, véritable étape limitante de l'étude structurale, peut demander de longues étapes d'optimisation, qui, dans certains cas, peuvent se solder par un échec. Ainsi, dans le cadre de ce travail de thèse, de grandes difficultés ont été rencontrées pour préparer les échantillons de protéines PRODH, ce qui n'a pas été le cas avec la protéine

KIN17 où la réussite de cette première étape majeure a permis d'envisager une caractérisation structurale par RMN. Par conséquent, ce manuscrit est organisé en deux parties distinctes.

La première partie, consacrée à la proline déshydrogénase PRODH, présente conjointement les différentes stratégies que nous avons employées pour surexprimer des protéines et domaines structuraux PRODH chez *E. coli* en vue de l'analyse structurale, ainsi que les résultats de la production et de l'optimisation de l'expression de ces protéines. Le problème de la délimitation des domaines structuraux sera notamment évoqué. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'EMI 9906 de la Faculté de Médecine-Pharmacie de Rouen, et le Laboratoire de Marquage des Protéines du CEA de Saclay. Les objectifs de cette étude seront préalablement abordés après avoir présenté l'intérêt biologique suscité par la proline déshydrogénase PRODH.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, je présenterai l'étude structurale du domaine K2 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire qui a été entreprise dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Structure des Protéines du CEA de Saclay. Dans un premier chapitre, j'introduirai de manière simplifiée et succincte le contexte biologique de la protéine KIN17, puis les objectifs de ce travail seront exposés. Les premiers résultats de l'étude expérimentale, à savoir la préparation des échantillons de protéine marquée ^{15}N et ^{15}N / ^{13}C pour l'analyse par RMN, ainsi que les analyses préliminaires, seront présentés dans le second chapitre. Dans le troisième chapitre, sera détaillé l'ensemble des méthodologies de RMN et modélisation moléculaire utilisées dans cette étude. Les résultats de la caractérisation structurale proprement dite, c'est-à-dire l'attribution des raies de résonance du domaine K2, la détermination de la topologie de la protéine, le recueil des contraintes expérimentales, et le calcul de la structure par Modélisation Moléculaire, seront décrits dans le chapitre 4. Les relations structure-activité du domaine K2 de la protéine KIN17 humaine seront finalement discutées dans le chapitre 5.

PREMIERE PARTIE

Production de domaines recombinants PRODH en vue de l'analyse structurale

CHAPITRE 1

Introduction

1) Contexte biologique

1.1) Le catabolisme de la proline

Parmi les vingt acides aminés qui composent les protéines, la proline représente une classe unique d'acide aminé. L'incorporation du noyau azote du groupement amine au sein d'une structure cyclique la distingue des autres acides aminés et lui confère des propriétés particulières (Figure 1.1). Cette topologie unique contribue aux propriétés physiques et structurales de plusieurs métabolites essentiels comme le collagène, une glycoprotéine riche en résidus glycine et proline.

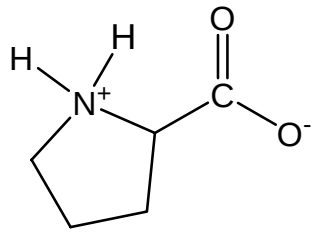


***Figure 1.1** : Structure de la proline sous forme zwitterionique.*

Au-delà de sa fonction de module élémentaire pour la biosynthèse des protéines, la proline, comme tout autre acide aminé, est également utilisée comme source d'énergie, d'azote et de carbone pour la biosynthèse d'intermédiaires métaboliques majeurs. C'est un acide aminé glucoformateur, c'est-à-dire susceptible d'être converti en glucose par le biais des cycles métaboliques de l'organisme.

Comme le montre la Figure 1.2, le catabolisme de la proline empreinte la voie de l'α-cétoglutarate du cycle de l'acide citrique, communément appelé cycle de Krebs (pour revues : Adams & Frank, 1980 ; Phang, 1985). Le point de départ de ce flux métabolique fait intervenir la proline déshydrogénase PRODH qui oxyde la proline en P5C (Pyrroline-5-Carboxylate). Cet intermédiaire cyclique se linéarise de manière spontanée en glutamate-γ-semialdéhyde, qui est ensuite dégradé en glutamate par la P5C déshydrogénase P5CDH *via* la consommation d'un dinucléotide NAD^+. Le glutamate subit une désamination oxydative par une aminotransférase conduisant à l'ion ammonium NH_4^+, qui entre alors dans le cycle de l'urée. Cette réaction est catalysée par la glutamate déshydrogénase qui forme l'α-cétoglutarate. L'entrée de ce dernier dans le cycle de l'acide citrique donne lieu à une série de

réactions, qui aboutit à un transfert de plusieurs électrons de haute énergie vers des dinucléotides de type FAD et NAD. Leur oxydation dans la chaîne respiratoire conduit à la formation d'ATP. Toutes les réactions enzymatiques du catabolisme de la proline ont lieu dans la mitochondrie chez les eucaryotes, et dans le cytosol chez les procaryotes. Il est toutefois à noter que le cycle de l'urée se termine dans le cytoplasme chez les eucaryotes.

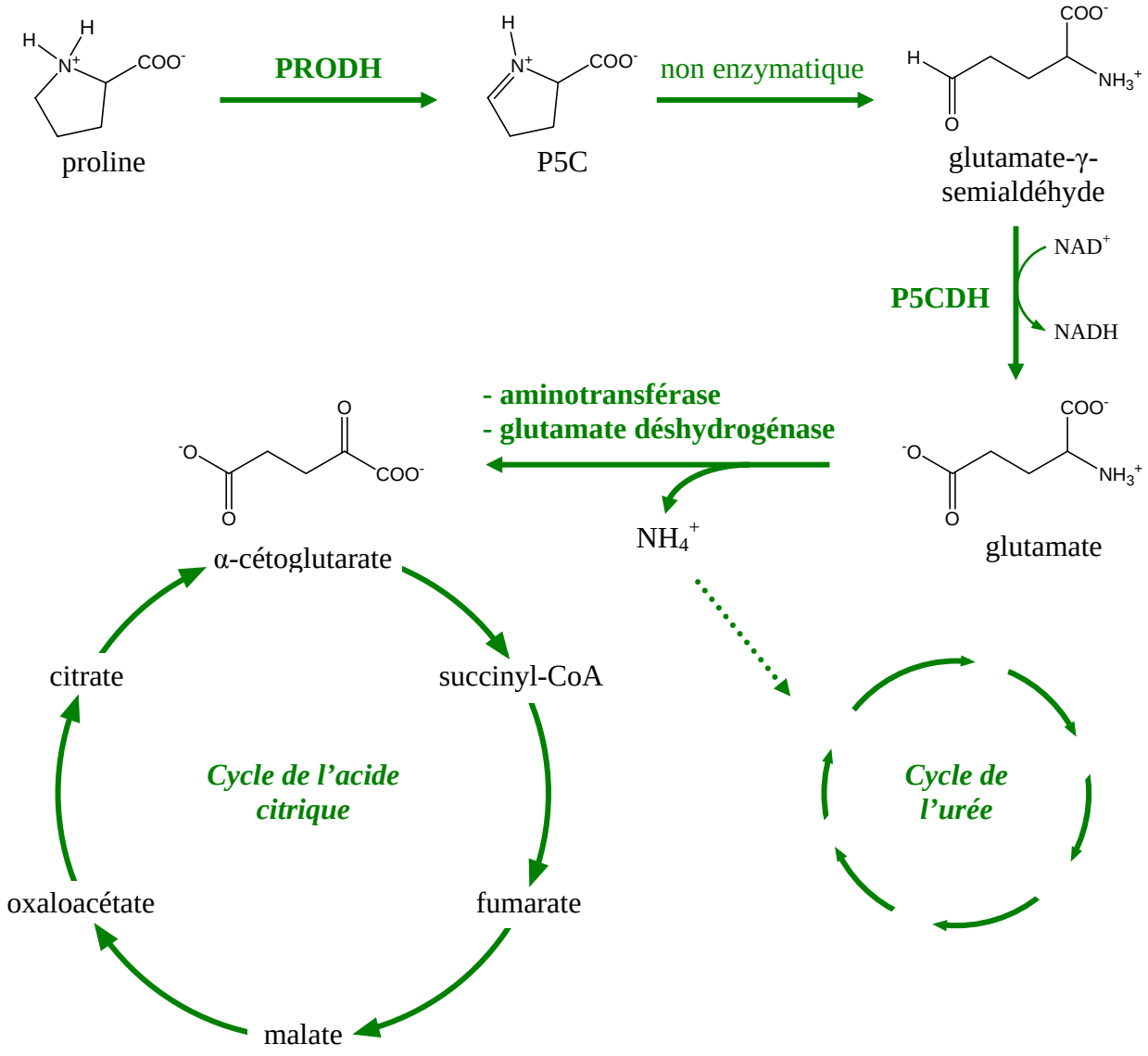


***Figure 1.2** : Vue d'ensemble du catabolisme de la proline.*

De par sa forte biodisponibilité, la proline est un des acides aminés les plus efficaces en terme de glucogenèse. Chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, l'oxydation de la proline en glutamate permet de maintenir la croissance cellulaire lorsque cet aminoacide contient la seule source d'azote disponible (Wang & Brandiss, 1986). Chez certaines plantes, la proline est la première source d'énergie utilisée après un choc osmotique (Blum & Ebercon, 1976),

ou pour la fabrication du pollen (Hong-qi et al., 1982). C'est également le cas chez certains insectes où la proline est très rapidement oxydée dans les muscles impliqués dans les mécanismes du vol (Holden, 1973).

Dans les années 1980, les travaux de Hagedorn *et* Phang ont mis en évidence la capacité de la proline à catalyser les cycles métaboliques mitochondriaux *via* un cycle de transfert de potentiel redox (Hagedorn et al., 1982 ;Hagedorn & Phang, 1983 ; Hagedorn & Phang, 1986). En effet, il existe une enzyme appelée P5C réductase qui, dans le cytoplasme, conduit à la réduction du P5C en proline *via* la consommation d'un dinucléotide NADPH (Figure 1.3). Les mécanismes de régulation de PRODH et de la P5C réductase n'étant pas liés, il est proposé que la proline et le P5C forment un couple redox utilisé pour transférer des équivalents réducteurs du cytoplasme vers la mitochondrie. Selon cette hypothèse, le dinucléotide NADPH, nécessaire à la réduction du P5C en proline, pourrait être fourni par l'oxydation du glucose dans la voie cytoplasmique du pentose phosphate. Le cycle de transfert de potentiel redox du couple proline/P5C serait donc une voie alternative de l'utilisation de la proline, et servirait à relier le cycle mitochondrial de l'acide citrique à celui du pentose phosphate cytoplasmique.

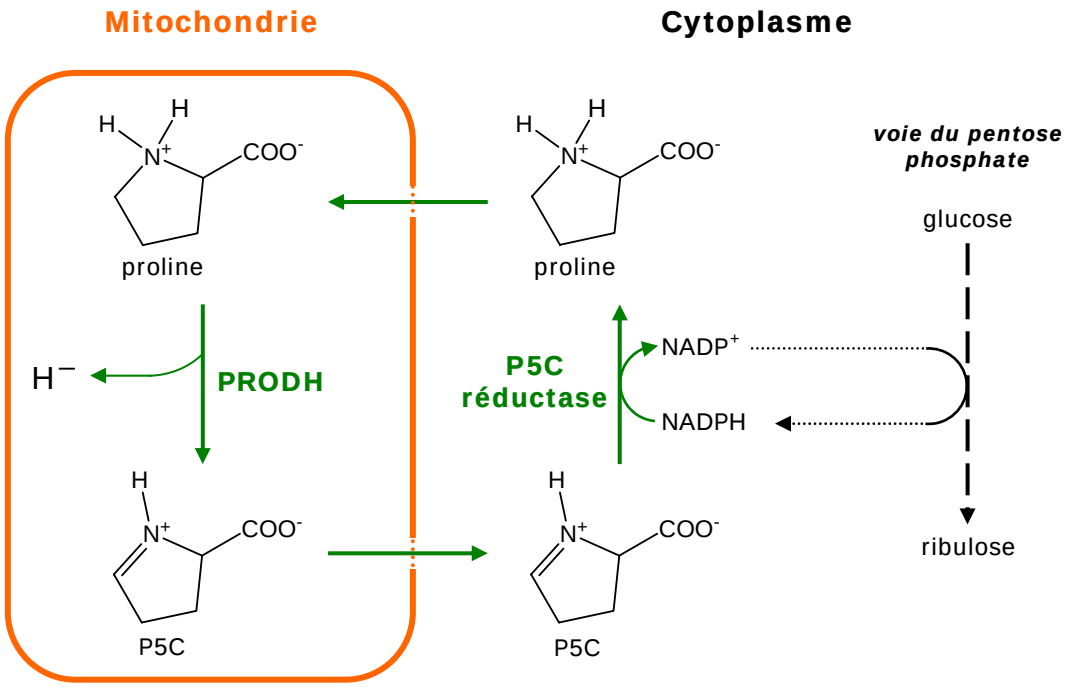


Figure 1.3 *: Mise en évidence de la capacité du couple redox proline/P5C à transférer des potentiels réducteurs du cytoplasme vers la mitochondrie.*

1.2) Hypothèses sur les partenaires biologiques de PRODH chez les organismes eucaryotes.

Bien que toutes les enzymes intervenant dans le catabolisme de la proline aient été identifiées, la littérature fait état de très peu de données fonctionnelles concernant les modes d'action et de régulation des proline déshydrogénases eucaryotes. En effet, cette enzyme responsable de la première étape de la dégradation de la proline en glutamate a fait l'objet de peu d'études à l'échelle de la protéine chez les organismes eucaryotes. Ceci pourrait en partie être expliqué par les difficultés qui ont été rencontrées pour extraire une quantité suffisante d'enzyme PRODH soluble et biologiquement active à partir de mitochondries (Johnson & Strecker, 1962 ; Brosemer & Veerabhadrappa, 1965 ; Brunner & Neupert, 1969)

La présence de la proline oxydase (ou déshydrogénase) a été détectée pour la première fois dans des mitochondries de foie de rat (Johnson & Strecker, 1962) à partir d'un test d'activité qui repose sur la réactivité spécifique du produit P5C avec l'O-aminobenzaldéhyde (Strecker, 1960). Les méthodes d'extraction de protéines mitochondriales, réalisées avec des successions de gradient de sucrose et d'ultracentrifugation, ont révélé que cette protéine appartient à la matrice mitochondriale et qu'elle est fortement liée à la membrane interne (Brunner & Neupert, 1969). D'autre part, il a été montré que l'activité enzymatique de PRODH nécessite la présence de dioxygène et d'un accepteur d'électrons de type cytochrome c ou ubiquinone (Johnson & Strecker, 1962 ; Erecinska, 1965), qu'elle est inhibée par le KCN et l'antimycine A (Brosemer & Veerabhadrappa, 1965), et qu'elle est indépendante en dinucléotide de type NAD^+ ou $NADP^+$ (Kramar, 1967). Toutes ces caractéristiques suggèrent que la proline déshydrogénase eucaryote est une flavoenzyme (c'est-à-dire une enzyme de cofacteur flavinique FAD ou FMN) qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie *via* un accepteur d'électrons de la membrane interne. Cependant, à ce jour le cofacteur de la proline oxydase n'a jamais été clairement identifié chez un organisme eucaryote. D'autres études, menées sur des mitochondries extraites d'intestin de porc et de foie de rat, ont mis en évidence la capacité du lactate à réduire l'activité de PRODH de manière drastique (de 50 % à 95 %), et à diminuer l'affinité de l'enzyme pour son substrat proline (Kowaloff et al., 1977 ; Dillon et al., 1999). Ces observations supportent l'hypothèse que le lactate est un inhibiteur compétitif des proline déshydrogénase eucaryotes qui pourrait être impliqué dans la régulation de l'enzyme.

Contrairement aux organismes eucaryotes, les partenaires biologiques et les mécanismes de régulation de la proline déshydrogénase sont en partie connus chez la bactérie *E. coli*. La mise au point de méthodes efficaces de purification de la protéine endogène sous forme soluble et biologiquement active (Menzel & Roth, 1981 ; Brown & Wood, 1992) a permis de réaliser plusieurs études *in vitro*, et ainsi de caractériser d'un point de vue biochimique plusieurs aspects de ses mécanismes d'action. Sur la base de ces études fonctionnelles, il est possible de proposer un modèle de régulation du catabolisme de la proline chez les organismes procaryotes.

1.3) Modèle de régulation du catabolisme de la proline chez la bactérie *E. coli*

Chez les organismes procaryotes (qui ne possèdent pas d'organelles), la dégradation de la proline en glutamate a lieu à la périphérie de la membrane interne et met en jeu des intermédiaires réactionnels identiques à ceux décrits dans le paragraphe 1.1. Alors que chez les eucaryotes la proline déshydrogénase PRODH et la P5C déshydrogénase P5CDH sont encodées par deux gènes différents, chez la bactérie, les deux fonctions sont assurées par une seule protéine encodée par le gène *PutA*, dont l'évolution phylogénétique a conduit à la séparation de ce gène en deux distincts (Figure 1.4).

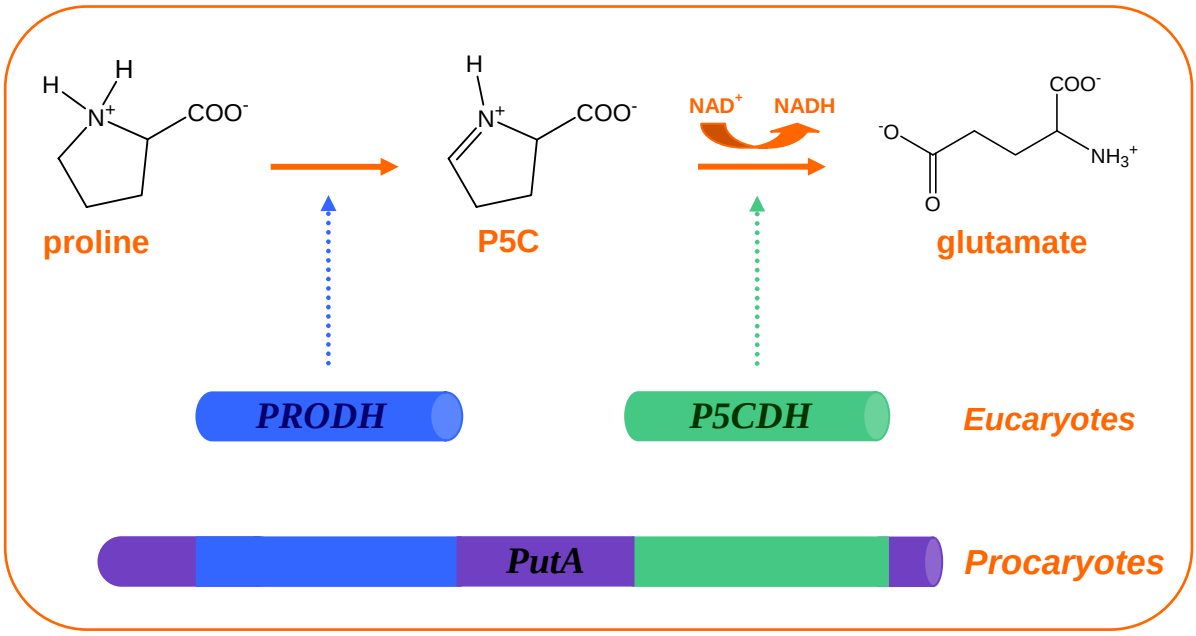


Figure 1.4 *: Evolution phylogénétique du gène encodant les enzymes proline déshydrogénase PRODH et P5C déshydrogénase P5CDH. La conversion intermédiaire spontanée et non enzymatique du P5C en glutamate-γ-semialdéhyde n'est pas représentée.*

PutA (*proline utilization*) est une flavoenzyme multifonctionnelle bactérienne qui présente quatre types d'activités pour un seul polypeptide : la fonction PRODH, la fonction P5CDH, la capacité à lier l'ADN, et la capacité à fixer la membrane interne. Chez *E. coli*, PutA est une protéine de 1320 acides aminés, qui adopte une structure quaternaire dimérique en solution, et qui contient un cofacteur FAD lié de manière non covalente à chaque monomère (Brown & Wood, 1992). Le domaine PRODH oxyde la proline en P5C et catalyse le transfert de 2 électrons du substrat proline vers son cofacteur flavine (Surber & Maloy, 1999). L'association de PutA à la membrane permet alors de transférer ces 2 électrons à un accepteur de la chaîne respiratoire, ce qui régénère la forme oxydée du FAD. Après linéarisation spontanée du P5C, le domaine P5CDH catalyse l'oxydation de glutamate-γ-semialdéhyde en glutamate par un mécanisme NAD-dépendant (Figure 1.5).

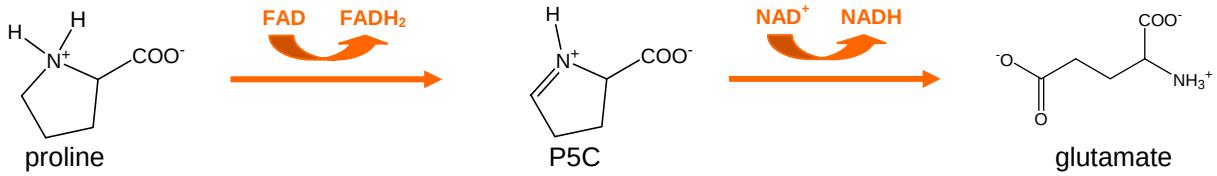


Figure 1.5 *: Mécanismes de dégradation de la proline en glutamate par la protéine PutA de la bactérie E. coli. L'étape intermédiaire non enzymatique n'est pas représentée.*

PutA est également un répresseur de transcription de la région inter-génique *put*. Cette région comporte le gène *PutA*, ainsi que le gène *PutP* qui encode une perméase dont la fonction est d'assurer l'entrée et le transport de la proline dans la cellule (Chen et al., 1985). L'expression des gènes *put* dépend de la biodisponibilité de la proline dans la cellule et de la localisation intracellulaire de PutA. En absence de proline, la protéine PutA est localisée dans le cytoplasme et inhibe la transcription des gènes *PutA* et *PutP* en fixant la région promotrice du régulon *Put* (Ostrovsky De Spicer et al., 1991). En présence de proline, PutA rejoint la membrane, ce qui lève l'inhibition de la transcription des gènes *put* et déclenche le processus d'oxydation de la proline par le domaine PRODH (Wood, 1987 ; Surber & Maloy, 1999).

La proline réduisant le cofacteur FAD, il est proposé que l'état d'oxydation du FAD soit l'élément clé qui gouverne la localisation cellulaire de PutA, et par conséquent sa fonction (répresseur de transcription ou déshydrogénase). En effet, il a été montré que la

forme réduite $FADH_2$ est primordiale pour la liaison de PutA à la membrane (Wood, 1987). Surber *et* Maloy ont confirmé cette hypothèse en démontrant que la réoxydation du cofacteur $FADH_2$ conduisait à la rupture de cette liaison (Surber & Maloy, 1999). En revanche, d'autres études ont mis en évidence que la liaison à l'ADN dépend peu de l'état d'oxydation du cofacteur (Ostrovsky & Maloy, 1995 ; Becker & Thomas, 2001). Sur la base de ces données, il apparaît donc que la localisation intracellulaire et la fonction de PutA sont intimement liées à des modifications d'affinité de liaison de PutA à la membrane. Des études de digestion chymotripsique suivie sur gel SDS-PAGE ont été réalisées dans l'optique de caractériser la nature de ces modifications. Les travaux de Brown *et* Wood montrent que la protéine PutA présente des susceptibilités aux protéases différentes selon la présence ou l'absence de proline (Brown & Wood, 1992). Ceci indique que la réduction du FAD par la proline induit une modification structurale significative de la protéine. Ces résultats ont été récemment confirmés par une étude similaire, réalisée sur un échantillon de protéine recombinante PutA purifiée, qui suggère que les changements d'état d'oxydation du FAD sont capables de provoquer des changements de conformation au-delà du domaine catalytique PRODH (Zhu & Becker, 2003). L'ensemble de ces données permet de proposer un modèle fonctionnel de la régulation du catabolisme de la proline chez les procaryotes où le cofacteur flavinique joue un rôle central (Figure 1.6).

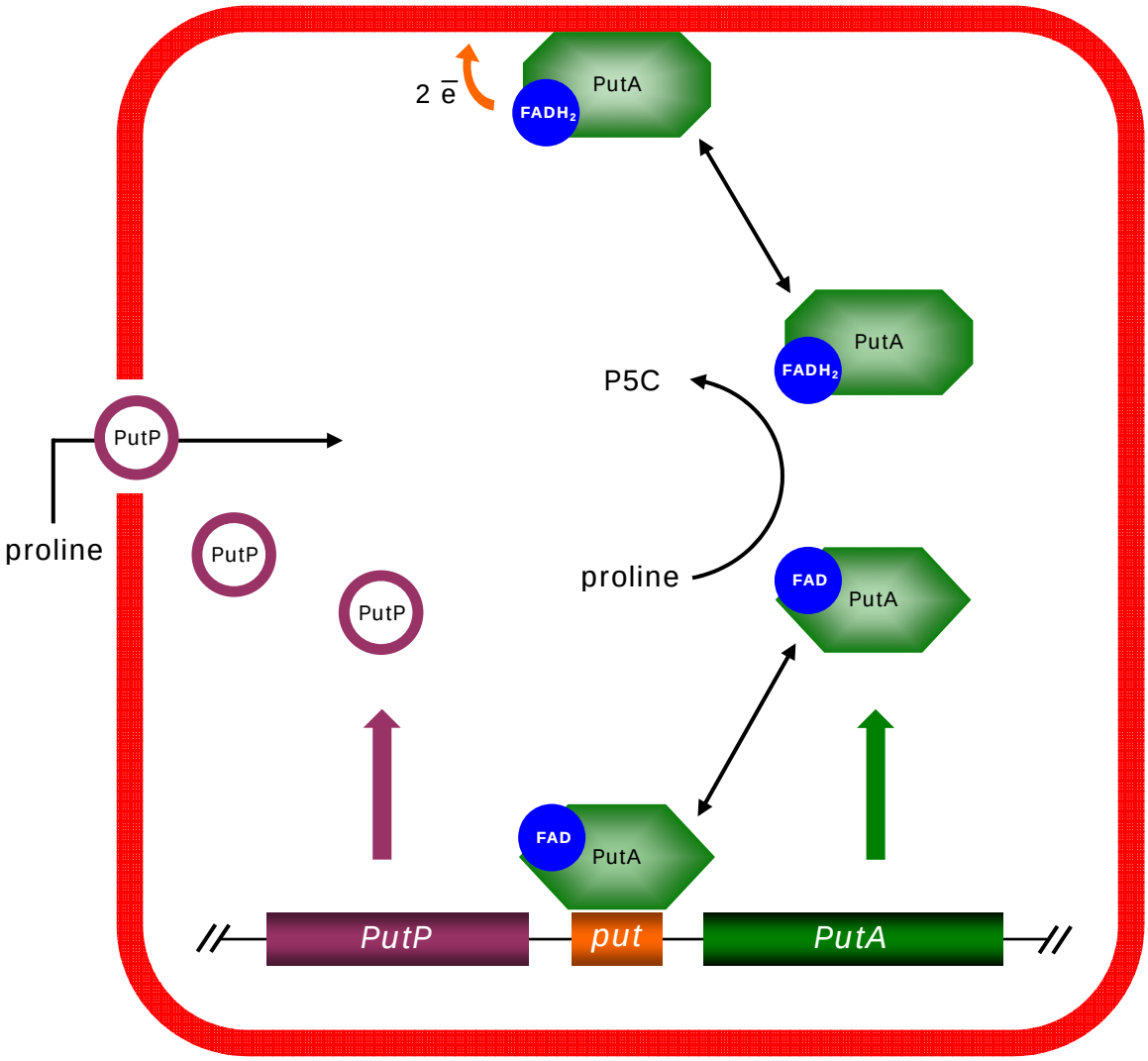


Figure 1.6 *: Modèle de régulation du catabolisme de la proline chez E. coli par la protéine PutA. La protéine de transport PutP permet l'entrée de la proline dans le cytosol de la bactérie. En absence de proline, la protéine PutA fixe le régulon put et inhibe la transcription des gènes PutP et PutA. La dégradation de la proline en P5C par PutA s'accompagne d'une réduction du cofacteur FAD en $FADH_2$. Ce changement d'état d'oxydation du cofacteur induit une modification structurale de PutA qui conduit d'une part, à un repliement plus favorable à la liaison de PutA à la membrane interne, et d'autre part, à la rupture de la liaison au régulon put. Cette rupture lève l'inhibition de la transcription des gènes PutP et PutA. Les 2 électrons provenant de l'oxydation de la proline sont transférés à un accepteur de la chaîne respiratoire après fixation de PutA à la membrane.*

La caractérisation du cofacteur flavinique chez *E. coli* supporte l'hypothèse de l'existence d'un cofacteur FAD ou FMN chez les organismes eucaryotes. Cependant, le modèle de régulation du catabolisme de la proline par PutA ne peut être transposé chez les eucaryotes où la présence de PRODH dans la matrice mitochondriale ne permet pas une régulation de son propre gène situé dans le noyau.

1.4) Les troubles de l'activité de PRODH chez les eucaryotes supérieurs

Au cours de ces 15 dernières années, la séquence primaire de la protéine PRODH a été identifiée chez tous les organismes eucaryotes les plus communément étudiés. En parallèle, un certain nombre d'études médicales, réalisées chez des eucaryotes supérieurs, ont récemment permis de caractériser les bases moléculaires cliniques des troubles de l'activité de la proline déshydrogénase.

1.4.1) L'hyperprolinémie de type I

La première séquence primaire de proline oxydase (baptisée PUT1) a été découverte en 1986 chez la levure *Sacchamoryces Cerevisiae* (Wang & Brandriss, 1986). La séquence de cette protéine a ensuite été identifiée chez la mouche *Drosophila Melanogaster* (Hayward et al., 1993), puis chez la plante *Arabidopsis Thaliana* (Verbruggen et al., 1996) sur la base d'une homologie de séquence avec la protéine PUT1. Ce n'est qu'en 1997 que le gène *PRODH* humain a été localisé au niveau de la région q11 du chromosome 22 (Campbell et al., 1997). Ce gène est principalement exprimé au niveau du foie, des reins, et du cerveau (Maynard et al., 2003).

Une perte d'activité de la proline oxydase se caractérise sur le plan biochimique par une hyperprolinémie de type I, c'est-à-dire un taux anormalement élevé de proline dans l'organisme (Efron, 1965). Chez les patients hétérozygotes, cette maladie rare autosomale récessive est dite « silencieuse » et conduit généralement à une hyperprolinémie bénigne associée à des désordres mineurs. Cependant, des manifestations neurologiques sévères (retard mental et épilepsie) ont récemment été rapportées chez plusieurs sujets atteints d'hyperprolinémie de type I (Humbertclaude et al., 2001), et notamment chez deux enfants porteurs d'une délétion homozygote du gène *PRODH*, ou de la mutation rare L441P à l'état homozygote (Jacquet et al., 2003 ; Jacquet et al., 2002). Ces deux enfants souffraient d'une forme sévère d'hyperprolinémie de type I associée à des retards psychomoteurs (Jacquet et al., 2003). Les souris Pro/Re et les mouches slgA représentent des modèles animaliers intéressants pour étudier les bases moléculaires de l'hyperprolinémie de type I. La lignée de souris Pro/Re comporte une mutation faux sens homozygote du gène *PRODH* qui entraîne une terminaison précoce de la traduction de la région C-terminale de la protéine (Gogos et al., 1999). Ces souris sont spontanément hyperprolinémiques avec un niveau de proline 7 fois

supérieur à la normale. L'activité de PRODH s'avère déficiente au niveau du foie, des reins, et notamment du cerveau. Les souris Pro/Re présentent des anomalies d'apprentissage et de la réaction de sursaut associées à une diminution des taux de glutamate, de GABA, et d'aspartate dans le cortex frontal. De manière intéressante, ces types de trouble sont également observés chez les souris hyperprolinémiques slgA, qui comportent plusieurs mutations du gène *PRODH*, et qui présentent un comportement psychomoteur léthargique (Hayward et al., 1993). Le glutamate étant un neurotransmetteur de jonctions musculaires dans le cerveau, il est proposé que les troubles neurologiques constatés chez l'homme, la souris, et la mouche, soient dus à une diminution du taux de glutamate dans le cerveau, induite par une réduction d'activité de la proline oxydase (Gogos et al., 1999 ; Hayward et al., 1993). Selon cette hypothèse, le catabolisme de la proline serait une des principales voies métaboliques conduisant à la formation de glutamate dans le cerveau.

1.4.2) PRODH et schizophrénie

L'hypothèse de l'implication du gène *PRODH* dans le déterminisme génétique de la schizophrénie a relancé l'intérêt suscité par cette enzyme mitochondriale. La schizophrénie est une maladie qui affecte les fonctions supérieures du cerveau et qui est caractérisée par la présence d'hallucinations, de délires, et d'une dissociation mentale, symptômes se traduisant par un comportement atypique ou inadapté du sujet atteint (pour revue : Murphy, 2002). Cette pathologie constitue une préoccupation majeure de santé publique en raison de sa prévalence (environ 1 % de la population), de son âge de début précoce (dans 50 % des cas avant 23 ans), et des troubles du comportement qu'elle implique (prévalence élevée des suicides, de la toxicomanie, et de comportements agressifs). Des études de jumeaux, qui consistent à comparer le taux de concordance de la maladie au sein de paires de jumeaux monozygotes par rapport à celui retrouvé au sein de paires de jumeaux dizygotes, montrent que les facteurs génétiques sont pour la plus grande part à l'origine de la schizophrénie (McGuffin et al., 1994). Toutefois, aucun gène de susceptibilité n'est actuellement identifié avec certitude.

L'implication de la région chromosomique 22q11 (qui comporte le gène *PRODH*) dans le déterminisme génétique de la schizophrénie a été suggéré par la fréquence élevée de traits schizophrènes retrouvée chez les patients atteints du syndrome de Digeorge (incidence environ 20 fois supérieure à celle observée dans la population générale) (Murphy et al., 1999). Ce syndrome se caractérise chez 95 % des sujets atteints par une microdélétion hétérozygote

de la région q11 du chromosome 22 qui affecte le gène *PRODH* (Hoffmann & Vadstrup, 2000). De manière intéressante, certains troubles associés à l'hyperprolinémie de type I, comme la diminution de l'inhibition de la réaction de sursaut chez la souris Pro/Re, sont également présents dans la schizophrénie (Chakravarti, 2002). Sur la base de ces observations, le gène *PRODH* a été défini comme candidat dans l'étiologie de la schizophrénie. Dans l'optique d'établir le lien entre l'hyperprolinémie de type I et la schizophrénie, des études de recherche de variations nucléotidiques du gène *PRODH* ont été réalisées chez des patients schizophrènes et chez des sujets témoins. Certaines d'entre elles ont mis en évidence une augmentation de la prévalence de mutations conduisant à l'hyperprolinémie de type I dans des échantillons de patients schizophrènes (Liu et al., 2002 ; Jacquet et al., 2002). En revanche, d'autres études uniquement basées sur des statistiques de variations nucléotidiques n'ont révélé aucun lien entre le gène *PRODH* et la schizophrénie (Williams et al., 2003 ; Fan et al., 2003). L'association entre la proline déshydrogénase et la schizophrénie est donc une hypothèse qui, à ce jour, reste très controversée.

1.5) Conclusions

Jusqu'en 1995, les proline déshydrogénases eucaryotes étaient peu étudiées que ce soit à l'échelle du gène ou de la protéine. Les quelques données biochimiques disponibles dans la littérature permettent d'émettre des hypothèses sur la nature du cofacteur et de l'inhibiteur compétitif naturel de cette enzyme mitochondriale. Cependant, les mécanismes d'action et de régulation de PRODH restent à ce jour inconnus chez les organismes eucaryotes, bien qu'ils soient en partie connus chez la bactérie *E. coli*. Sur le plan médical, plusieurs études récemment menées montrent que certaines mutations du gène *PRODH* peuvent induire des troubles de l'activité enzymatique qui, dans certains cas, sont associés à des manifestations neurologiques sévères. Il est également proposé que ces mutations puissent être des facteurs de risque de la schizophrénie. Aucune donnée structurale n'étant publiée au moment où nous entreprenions cette étude, il apparaissait que la résolution de la structure tridimensionnelle de la proline déshydrogénase humaine serait d'un grand intérêt. La caractérisation structurale de cette enzyme constituerait une amorce essentielle vers la compréhension de son mode de fonctionnement. A terme, elle permettrait d'étayer les hypothèses émises sur la nature de ces partenaires, et de caractériser d'un point de vue structural les bases moléculaires de l'hyperprolinémie de type I en déterminant les conséquences des mutations sur la structure de

PRODH. C'est pourquoi, nous avons entrepris l'étude de la proline déshydrogénase humaine par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), qui est une des deux techniques permettant de résoudre la structure d'une protéine à l'échelle de l'atome.

2) Stratégie d'étude structurale de PRODH humaine par RMN

La RMN est une méthode de choix pour étudier une protéine en solution et caractériser son interaction avec ses partenaires biologiques. Cependant, c'est une technique qui possède une limitation majeure : la masse moléculaire de la biomolécule étudiée. Bien que le record de détermination de structure tridimensionnelle ait été enregistré sur un monomère de 48 kDa (Williams et al., 2005), la taille limite actuelle pour une étude de routine se situe aux alentours de 20 kDa, soit environ 180 résidus. Dans le cas de la protéine PRODH humaine, dont le poids moléculaire est de 70 kDa pour 600 résidus, il n'est donc pas concevable d'envisager une étude structurale par RMN. Toutefois, les protéines de masse moléculaire élevée sont généralement composées de plusieurs domaines de repliement autonome qui sont plus ou moins indépendants les uns des autres. L'organisation de la structure tertiaire des protéines de grande taille en domaines structuraux offre ainsi la possibilité de caractériser la structure de ces macromolécules domaine par domaine. Toute la difficulté de cette approche repose sur l'identification de ces domaines de repliement autonome. La stratégie communément utilisée consiste à recourir à des outils bio-informatiques afin de prédire leur délimitation.

2.1) Analyse bio-informatique préliminaire

Nous avons réalisé dans un premier temps un alignement de 9 séquences de PRODH connues d'origine eucaryote et procaryote avec le logiciel *clustalw* (Figure 1.7).

```
Human       1-MALRRALPALRPCIPRFVQLSTAPASR----------EQPAAGPAAVPGGGSA----------------------TAVR
Drosophila    MALLRSLSAQRTAISLVYGRNSSKSSNSVAVAACRSFHQRGNGSTSIAGEGAASESTRGVNGARFLHSGDRPLQASTLVQ
CAEEL         ---------------------------------------------------------------------------MK
Arabidopsis   ---------------------------------------------------------------------------M
Oryza         ---------------------------------------------------------------------------M
POMBE         ----------------------------------------------------------------------------
Emericella    ----------------------------------------------------------------------------
Cerevisiae    ----------------------------------------------------------------------------
PutA          ------MGTTTMGVKLDDATRERIKSAATRIDRTPHWLIKQAIFSYLEQLENS----------------------DTL
```

```
Human      48-PPVP----------------------------AVDFGNAQEAYRSRRTWELARSLLVLRLCAWPALLARHEQLLY-VS
Drosophila    PEVVSSETVKRSMKQESSQEKNPSPAGSPQRDPLDVSFNDPIAAFKSKTTGELIRAYLVYMICSSENLVEHNMTLMK-WS
CAEEL         IPVA-----------------------------LVLTIIIEFFQSKSNTELVRALVVLRLCGIQTLVNQNQIILN-TM
Arabidopsis   ATRLL----------------------------R-TNFIRRSYRLPAFSPVGPPTVTASTAVVPEILSFGQQAPEPPL
Oryza         AIASR----------------------------I-QKRVLASFAAAAAAKLPEAAVAAAGGAAEAVEEVASSVQE---
POMBE         ---------------------------------------MRAFRLAS-GVLRNRKVILGIGAGSLITAGNIKIRN---
Emericella    ------------------------------------------MKAATPRPSVRALSSGRSYRTARFVSRTSNARSSLA
Cerevisiae    ---------------------------------------MIASKSSLLVTKSRIPSLCFPLIKRSYVSKTPTHSN---
PutA          PELPALLSG---------------------AANESDEAPTPAEEPHQPFLDFAEQILPQSVSRAAITAAYRRPETEAV

Human      97-RKLLGQRLFNKLMKMTFYGHFVAGEDQESIQPLLRHYRAFGVSAILDYGVEEDLSPEEAEHKEMES----------CTSA
Drosophila    KNVLGQRLFTLLMKATFYGHFVAGEDQIKIIPTLERLRSFGVKPILDYSVEEDITQEEAEKREVESS---------VSSA
CAEEL         RRVLGKNLFKKTLKNTFFGHFVAGETEEEVRHVVEKLRNYGVKSILDYSVEADITSQEATDKTVKGTSVATVKPAAMTPV
Arabidopsis   HHPKPTEQSHDGLDLSDQARLFSSIPTSDLLRSTAVLHAAPIGPMVDLGTWVMSSKLMDASVTRGMV-----LGLVKSTF
Oryza         ---QVQAQGAQVLEFGDTERLFAGERSTSLVRTLAVLQALSVGPLVDVATAALRSPAVAGSAA-G-------RAAARATA
POMBE         ---DSK--FDAFFAKGFPDELQHR-SLFSVLRSAFVYEICSRAWLVKLSLGAMSLCDVFHLSFLYN-------PFCRYTF
Emericella    ADTNSLLQQAPPSPKKQLASPLAKLPLSSVLRSLLILSVSSSSILLKPCIYTLSALAHPKTALLDVAKNPLLNLLVKHTI
Cerevisiae    --TAANLMVETPAANANGNSVMAPPNSINFLQTLPKKELFQLGFIGIATLNSFFLNTIIKLFPYIP------IPVIKFFV
PutA          SMLLEQARLPQPVAEQAHKLAYQLADKLRNQKNASGRAGMVQGLLQEFSLSSQEGVALMCLAEALLR--IPDKATRDALI

Human     167-AERDGSGTNKRDKQYQAHRAFGD-RRNGVISARTYFYANEAKCDSHMETFLRCIEAS-GRVSDD-GFIAIKLTALGRPQF
Drosophila    GDKKEEGSMP---QYHVDKSFAD-RRYKVSSARTYFYLNEATCERNMEIFIKCLEAVSGATFGT-GITAIKLTALGRPQL
CAEEL         VDAKTLETTR--ERYTVHEEFGD-RRQGVSSARTYFYEGEEQCDKNRDIFKDSINAVASATKNE-GFVAVKITALGRPQL
Arabidopsis   YDHFCAGEDADAAAERVRSVYEATGLKGMLVYGVEHADDAVSCDDNMQQFIRTIEAAKSLPTSHFSSVVVKITAICPISL
Oryza         YQHFCAGETAEEAAAAVRRLWRG-GMGGILDYGIEDAEDGPACDRNAAGFLAAIDVAAALPPGS-ASVCIKITALCPVAL
POMBE         YKHFCGGETPQAVMATMDTLQAAGITSCLNYSREVDLDGDMDVNKIASQGVVPPQVPVPSEKNQKVLRQIADKAFESNMH
Emericella    YKQFNAGENKLEVQRSINAIKELGYRGVLLGYAREVLVGESKTD----------------PRDEQASRQEIQTWLDGTLQ
Cerevisiae    SSLYCGGENFKEVIECGKRLQKRGISNMMLSLTIENSEGTKSLSS------TPVDQIVKETISS--VHNILLPNIIGQLE
PutA          RDKISNGNWQSHIGRSPSLFVNAATWGLLFTGKLVSTHNEASLSRSLNRIIGKSGEPLIRKGVDMAMRLMGEQFVTGETI

Human     244-LLQFSEVLAKWRCFFHQMAVEQGQAGLAAMDTKLEVAVLQESVAKLGIASR-AEIEDWFTAETLGVSGTMDLLDWSSLID
Drosophila    LLQLSEVIMRTRKYMEDMVGGQG----NVLTHHKTIKDLEKYYATLGDNK---DVKEFLNNVTSDKEGILHLFPWSGIVD
CAEEL         LLKLSEAIVQTQNFFKALTGGMS-----LQEGRLTSQEFYKRLGELGVKTDTESVKKFFDEVDFDSDGIVDLHGWNHILD
Arabidopsis   LKRVSDLLR-------------------WEYKSPNFKLSWKLKSFPVFS----------------------------
Oryza         LEKASDLLR-------------------WQQKHPATKLPWKVHGFPVLC----------------------------
POMBE         IIDMATYKP-------------------GTVCAVKLTPFINPLVLQRYN--------------------------SILN
Emericella    TVDMAQEGD-------------------------FVALK----FTGMG----------------------------
Cerevisiae    SKPINDIAP-------------------G-YIALKPSALVDNPHEVLYN----------------------------
PutA          AEALANARKLEEKGFRYSYDMLGEAALTAADAQAYMVSYQQAIHAIGKAS--------------------------NGRG

Human     323-SRTKLSKHLVVPNAQTGQLEPLLSRFTEEEELQMTRMLQRMDVLAKKATEMGVRLMV---DAEQTYFQP-AISRLTLEMQ
Drosophila    EDSQLSDTFRVPDPQTGQMRRLISQIPPKEEEMFRNMIRRLNTIVKAAADLDVRIMV---DAEQTYFQP-AISRITLEMM
CAEEL         DHVKLGQLFQVLNIKTGSLEPLIQNLSNEEEQEFRNMVRRTLDVAEYAIEKGVRIMV---DAEQTYLQP-AISKITIEMM
Arabidopsis   ----ESSPLYHTNSEP-------EPLTAEEERELEAAHGRIQEICRKCQESNVPLLI---DAEDTILQP-AIDYMAYSSA
Oryza         ----VSSPLYLTAAEP-------PALEAEEERELEMAHGRLLAIGERCAEYDIPLLV---DAEYATVQP-AIDYFTFAGA
POMBE         QYPVESACNYLEHLKS-------PELSTYEVSELKKFWEYADKLCQFAKEKQIPLFI---DAEQTYFQD-CMHAVTVDLM
Emericella    ----IQALEYLQNQAP-------P---------SPFMDEAIKQVCDLAISRNVRLLV---DAEEQAVQP-GIEEWATMYQ
Cerevisiae    ----FSNPAYKAQRDQ---------LIENCSKITKEIFELNQSLLKKYPERKAPFMVSTIDAEKYDLQENGVYELQRILF
PutA          IYEGPGISIKLSALHP-------RYSRAQYDRVMEELYPRLKSLTLLARQYDIGINI---DAEEADRLEISLDLLEKLCF

Human     399-RKFNVE---KPLIFNTYQCYLKDAYDNVTLDVELARREGWCFGAKLVRGAYLAQE-------RARAAEIGYEDPINPTYE
Drosophila    RKYNKD---KAIVFNTYQCYLRETFREVNTDLEQAKRQNFYFGAKLVRGAYMDQE-------RDRAKSLGYPDPVNPTFE
CAEEL         KKYNKG---RGNIFNTYQAYLKGTLQNMEADMQVARREGWHFGAKLVRGAYMEQE-------RARAKAIGYEDPINDNFE
Arabidopsis   IMFNADKD-RPIVYNTIQAYLRDAGERLHLAVQNAEKENVPMGFKLVRGAYMSSE-------ASLADSVGCKSPVHDTIQ
Oryza         LAFNGG-G-RPIVHGTVQAYLRDARDRLEAMARAAQGERVCLALKLVRGAYLARE-------ARLAASLGVPSPVHRSIQ
POMBE         RKYNKE---VAIVHNTYQLYLKKSRKIMDDHIKKCVAEGWLMGAKLVRGAYLNSEPRFLIHDTKAETDKDFDSAVEAIIA
Emericella    KYCNSRTPGRAIFYNTYQAYLCSTPATLARHLEISRKEGYTLGVKLVRGAYLKTEPRHLIWAKKEQTDECYDGIVEALLT
Cerevisiae    QKFNPTSSKLISCVGTWQLYLRDSGDHILHELKLAQENGYKLGLKLVRGAYIHSE------KNRNQIIFGDKTGTDENYD
PutA          EPELAG---WNGIGFVIQAYQKRCPLVIDYLIDLATRSRRRLMIRLVKGAYWDSEIKR----AQMDGLEGYPVYTRKVYT
```

Figure 1.7 *: Alignement de 9 séquences de proline déshydrogénase réalisé avec l'aide du logiciel clustalw. Les séquences alignées sont relatives aux espèces eucaryotes, humaine (Human, 600 résidus), Drosophila Melanogaster (Drosophila, 669 résidus), Caenorhabditis elegans (CAEEL, 564 résidus), Arabidopsis thaliana (Arabidopsis, 499 résidus), Oryza sativa (Oryza, 475 résidus), Schizosaccharomyces pombe (POMBE, 492 résidus), Emericella nidulans (Emericella, 478 résidus), Saccharomyces cerevisiae (Cerevisiae, 476 résidus), et à l'espèce procaryote PutA (607 résidus N-terminaux). Les résidus sont colorés en rouge lorsqu'ils sont conservés (sigle *), en vert lorsqu'il sont fortement similaires (sigle :), et en bleu lorsqu'ils sont faiblement similaires (sigle .). La numérotation est relative à la séquence humaine.*

D'une manière générale, la proline déshydrogénase est une protéine très peu conservée de la bactérie jusqu'à l'homme (3 % d'identité, et 4 % de similarité). Comme le montre la Figure 1.7, les 9 séquences ne s'alignent que dans la moitié C-terminale de PRODH humaine qui s'étend des résidus 340 à 600. Dans cette région, les pourcentages d'identité et de similarité atteignent respectivement 8 % et 10 %. Sur la base de cet alignement, il apparaît donc que la fonction proline oxydase, commune à toutes ces protéines, est assurée par un domaine catalytique situé entre les résidus 340 et 600 dans la séquence humaine.

Nous avons soumis la séquence de PRODH humaine aux logiciels *SMART* (Simple Modular Architecture Research Tool) (Schultz et al., 1998) et *Pfam* (Finn et al., 2006) qui permettent de détecter des domaines de repliement connu. Aucune prédiction n'a été proposée avec un degré de confiance suffisant par ces 2 programmes, ce qui était attendu dans la région C-terminale dans la mesure où il n'existait aucune structure connue de proline oxydase lorsque nous avons abordé cette étude. Une étude de prédiction de structure secondaire a également été réalisée et suggère une structuration de la protéine PRODH humaine en hélice α

et feuillet β. Devant le peu d'informations apportées par ces logiciels, il nous est apparu déraisonnable d'envisager de sélectionner des domaines à partir d'un alignement de séquence et d'une prédiction de structure secondaire. C'est pourquoi, nous avons opté pour une stratégie différente qui consiste à isoler des domaines structurés, et dont la taille soit compatible avec une analyse par RMN, par protéolyse ménagée à partir de la protéine PRODH humaine sauvage.

2.2) Démarche entreprise

La première étape de cette stratégie a pour objectif de surexprimer la proline déshydrogénase humaine sauvage sous forme soluble et repliée dans un système recombinant. Dans l'optique d'une étude par RMN, nous avons choisi d'utiliser la bactérie *E. coli* qui présente l'avantage d'être bien caractérisée, d'avoir une croissance rapide, et de pouvoir produire des quantités importantes de protéines marquées en isotopes ^{15}N, ^{13}C, ou ^{2}H. Une fois purifiée par chromatographie d'affinité, la protéine repliée sera soumise à une digestion enzymatique ménagée en conditions non dénaturantes par des endoprotéases clivant spécifiquement les chaînes polypeptidiques après certains acides aminés. Les fragments protéiques seront séparés sur colonne HPLC, puis leur séquence sera déduite de leur analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. En optimisant les conditions de digestion, il sera possible de limiter la protéolyse aux sites exposés et non enfouis reconnus par les différentes endoprotéases, et ainsi d'identifier potentiellement les domaines structuraux globulaires de la protéine PRODH. Les domaines dont le poids moléculaire sera compatible avec une analyse par RMN seront ensuite clonés, puis surexprimés chez *E. coli*, dans l'optique de résoudre leur structure par Résonance Magnétique Nucléaire et Modélisation Moléculaire.

CHAPITRE 2

Expression des protéines PRODH sauvage et mature chez *E. coli*

L'expression des protéines PRODH sauvage et mature a été réalisée au Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'EMI 9906 dirigé par le Professeur Thierry Frebourg, et en étroite collaboration avec les chercheurs du Groupe d'Etude des Bases Moléculaires de la Schizophrénie. Le détail des protocoles expérimentaux relatifs au clonage, à la production, et à l'analyse de ces protéines figure à la fin de ce chapitre dans la partie Matériels et Méthodes.

1) Production de PRODH sauvage

Comme nous l'avons définie dans le chapitre précédent, la première étape de la stratégie d'étude structurale de PRODH consiste à surexprimer la totalité de la protéine sauvage (1-600) chez la bactérie *E. coli*. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le plasmide d'expression pQE-31 de la société Qiagen qui permet de produire des protéines recombinantes fusionnées à une étiquette 6xHis en N-terminal (succession de 6 résidus histidine). Ce vecteur comporte dans sa région promotrice un promoteur fort de type T5 à induction directe à l'IPTG, suivi de 2 sites opéron lactose qui permettent sa régulation par la protéine LacI. Après clonage du plasmide par l'ADNc de *PRODH* sauvage, des souches bactériennes BL21 contenant le vecteur pREP-4 (Qiagen) ont été transformées par le plasmide pQE-31 cloné. Le vecteur pREP-4 comporte le gène qui encode la protéine de régulation LacI.

1.1) Caractérisation de l'expression et de la solubilité de la protéine hétérologue

Les premiers tests de surexpression ont été entrepris dans le but de caractériser l'expression et la solubilité de la protéine recombinante. La production de PRODH a été induite en erlenmeyer de 300 mL contenant 30 mL de milieu de culture LB par ajout de 1 mM d'IPTG à une densité optique (DO) de 0.5. Des prélèvements de 1 mL ont été réalisés à intervalles de temps réguliers afin de suivre l'évolution de l'expression. Pour chaque prélèvement, les cellules bactériennes ont été lysées dans un tampon phosphate à pH neutre et les fractions contenant les protéines solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation. Le culot contenant le matériel insoluble a été repris avec un tampon phosphate contenant de l'urée 8 M à pH neutre, puis incubé à 4°C sous agitation pendant 6 heures. Après une seconde étape de centrifugation, les agrégats du culot final ont été finalement solubilisés avec du SDS, un détergent ionique dénaturant. Toutes les fractions prélevées ont été analysées par SDS-

PAGE et Western-blot (Figure 2.1). L'analyse Western-blot a été réalisée avec un anticorps anti-6xHis qui permet de révéler les protéines qui présentent un amas de 6 résidus histidine en surface.

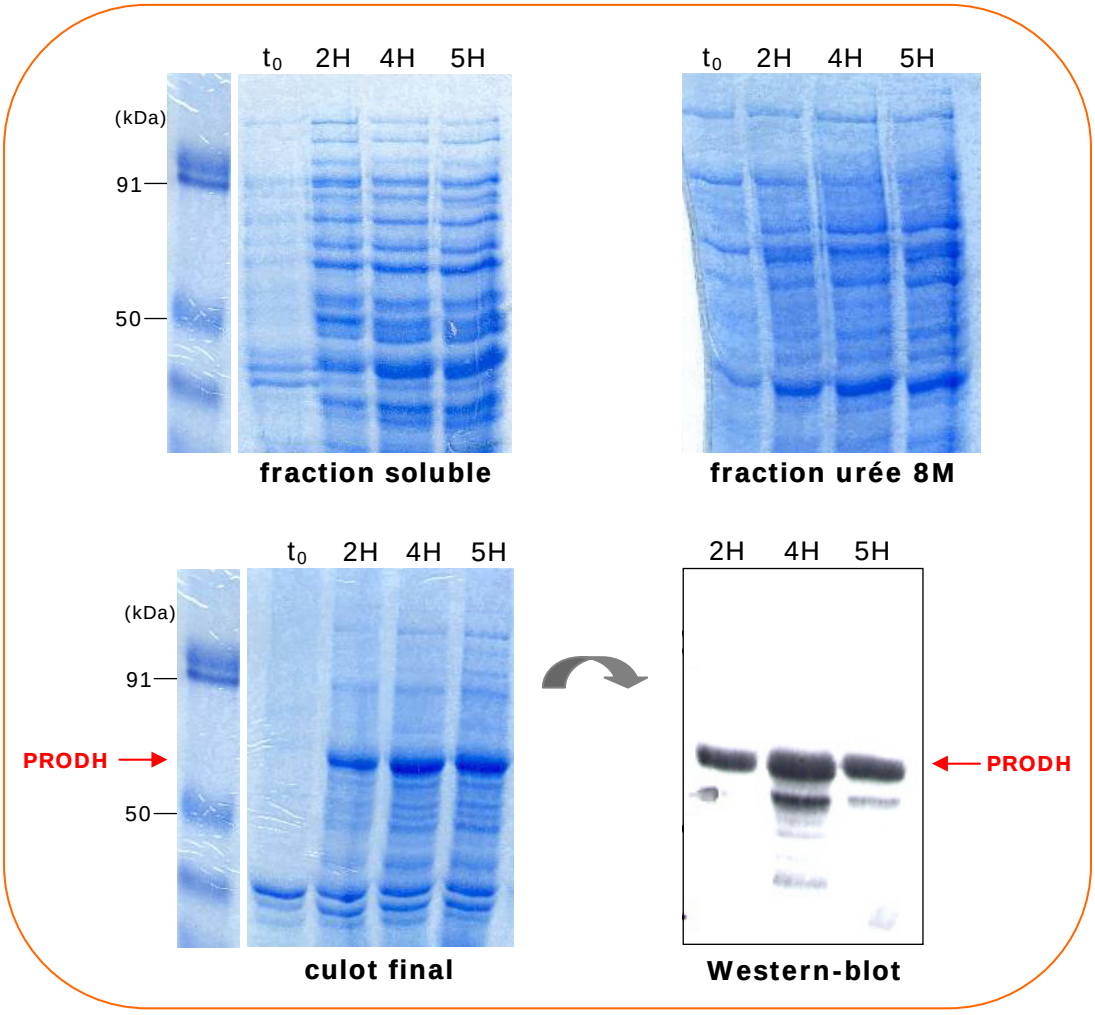


***Figure 2.1** : Expression de PRODH sauvage chez E. coli. Analyses SDS-PAGE des fractions contenant les protéines solubles, les protéines insolubles solubilisées dans l'urée et le culot final repris avec du SDS, après 2 heures (2H), 4 heures (4H), et 5 heures d'induction (5H), et avant induction (t_0). Les résultats de l'analyse Western-blot du culot final sont également présentés.*

L'analyse SDS-PAGE du culot final fait apparaître une bande de surexpression à une masse apparente de 70 kDa à partir de 2 heures d'induction. L'intensité de cette bande, qui correspond à la masse attendue de PRODH sauvage, est maximale lorsque le temps d'induction atteint 4 heures. La révélation de cette bande protéique par un anticorps anti-6xHis confirme la présence de PRODH sauvage dans le culot final (Figure 2.1). En ce qui concerne les fractions contenant les protéines solubles et les protéines insolubles reprises dans l'urée, aucune bande de surexpression correspondant à cette masse apparente n'est clairement

discernable sur le gel SDS-PAGE. De plus, l'analyse Western-blot par l'anticorps anti-6xHis, qui est plus sensible qu'une coloration au bleu de Coomassie, ne révèle aucune bande d'expression de manière significative dans ces fractions (non présenté). L'ensemble de ces résultats indique clairement que la protéine PRODH sauvage est exprimée sous forme insoluble chez *E. coli* dans ces conditions d'expression.

1.2) Optimisation de paramètres d'expression et d'extraction

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les données de la littérature indiquent que PRODH humaine est une enzyme mitochondriale localisée dans la matrice et fixée à la membrane interne. Par conséquent, la structure tertiaire de la forme native de cette protéine pourrait présenter des surfaces hydrophobes exposées qui lui permettrait de fixer les phospholipides de la membrane interne. Lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli*, ces surfaces hydrophobes pourraient accrocher les membranes bactériennes, et ainsi retenir la protéine hétérologue dans les fractions contenant les protéines insolubles. Nous avons essayé de recueillir la protéine recombinante PRODH dans la fraction soluble en introduisant différents détergents non dénaturants dans le tampon de lyse. Ces types de détergents amphiphiles, qui dégradent les membranes bactériennes, interagissent également avec les surfaces hydrophobes exposées des protéines, et favorisent ainsi leur solubilisation en présentant une extrémité polaire au solvant aqueux. Trois détergents différents ont été testés dans des gammes de concentration s'échelonnant de 1 % à 5 % (v/v). Il s'agit du Triton X-100, du NP 40, et du Tween 20. Dans tous les cas, nous ne sommes jamais parvenus à détecter PRODH sauvage dans la fraction soluble. Les profils d'expression obtenus étant tout à fait identiques à celui obtenu en absence de détergent, nous en avons conclu que la protéine recombinante PRODH humaine est produite sous forme de corps d'inclusion chez *E. coli*.

Les corps d'inclusion sont des agrégats insolubles composés principalement de protéine recombinante mal repliée et biologiquement inactive. Leur formation est en partie liée au taux d'expression du gène hétérologue dans la bactérie. Ainsi, un taux d'expression trop élevé favorise les interactions hydrophobes intermoléculaires par rapport aux interactions internes, et empêche le repliement correct de la protéine au profit de la formation d'agrégats (Georgiou & Valax, 1999). L'urée est un chaotrope puissant qui permet de dénaturer et solubiliser ces corps d'inclusion. Dans certains cas, des concentrations modérées d'urée de l'ordre de 2 à 3 M sont suffisantes pour resolubiliser des protéines agrégées dont le repliement

n'est pas trop éloigné du repliement natif (Clark, 2001). Dans le cas de PRODH la reprise de la fraction insoluble par de l'urée 8 M pendant 6 heures n'a pas été suffisante pour dénaturer les corps d'inclusion contenant la protéine recombinante ne serait-ce que partiellement. Ceci laisse supposer que plusieurs segments hydrophobes de PRODH sont exposés en surface et établissent de fortes interactions intermoléculaires au sein des agrégats. Dans l'optique de limiter ce type d'interaction, nous avons essayé de réduire les taux d'expression de PRODH, d'une part en ralentissant le métabolisme bactérien par une diminution de température de 37°C à 29°C, et d'autre part en diminuant la quantité d'inducteur IPTG de 1 mM à 0.1 mM. En parallèle, nous avons également réalisé une optimisation de la DO d'induction en testant les valeurs suivantes : 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, et 0.8. Dans tous les cas de figure testés, aucune amélioration de solubilité de la protéine recombinante n'a été constatée.

2) Prédiction du peptide signal de la séquence PRODH humaine

Nous avons montré que la production de la protéine PRODH humaine chez *E. coli* conduit à l'unique formation de corps d'inclusion. La stratégie d'étude structurale de PRODH qui a été initialement définie repose sur une recherche de domaines structurés à partir de la protéine entière repliée. Cette protéine de 70 kDa n'étant pas exprimée sous forme soluble chez *E. coli*, nous avons été contraint de modifier notre stratégie de départ. Nous avons ainsi entrepris d'identifier et de produire la forme mature de cette protéine humaine mitochondriale.

2.1) Les messages d'adressage mitochondrial

La proline déshydrogénase humaine est une protéine mitochondriale encodée par un gène porté par de l'ADN nucléaire. Comme toutes les protéines mitochondriales synthétisées au niveau du ribosome du cytoplasme, elle possède dans sa séquence primaire l'information qui lui permet de rejoindre et d'intégrer la mitochondrie (pour revue : Pfanner & Neupert, 1990). Cette information, appelée message d'adressage ou peptide signal, est toujours localisée dans l'extrémité N-terminale de la séquence. Ces motifs sont au nombre de 1 ou 2 dans la séquence primaire en fonction de la localisation précise de la protéine dans la mitochondrie. Ils n'intègrent pas la forme mature de la protéine et sont clivés après leur entrée dans la mitochondrie. D'un point de vue structural, les peptides signaux sont des hélices amphipatiques de longueur variable qui comportent, une région N-terminale chargée positivement, une région centrale très hydrophobe, et une région C-terminale plutôt neutre

(Nielsen et al., 1997). Ils se caractérisent également par la présence dans leur extrémité C-terminale d'un résidu neutre de type alanine en position -3 et -1 du site de clivage. La présence de tels motifs à caractère hydrophobe dans une région qui n'appartient pas à la protéine mature peut favoriser la formation de corps d'inclusion dans le cas d'une surexpression chez *E. coli*. L'identification de ces peptides signaux s'avère donc utile dans l'optique d'améliorer les profils d'expression de PRODH recombinante.

2.2) Résultats de la prédiction

Plusieurs programmes bio-informatiques disponibles sur le web ont été récemment développés avec pour objectif la prédiction de peptides signaux à partir d'une séquence primaire. A ce jour, il n'existe pas de séquence consensus de peptide signal d'adressage mitochondrial. Aussi, ces programmes utilisent les caractéristiques topologiques de ces motifs (citées ci-dessus) pour prédire leur présence dans une séquence. Nous avons soumis la séquence de PRODH humaine à plusieurs de ces programmes. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant :

Programme		Longueur du peptide signal N-terminal
Predotar	*(Small et al., 2004)*	non détecté
iPSORT	*(Bannai et al., 2002)*	30
MitoProt II 1.0	*(Claros & Vincens, 1996)*	49
PSORT II	*(Nakai & Horton, 1999)*	57
TargetP V1.0	*(Emanuelsson et al., 2000)*	114
SignalP V1.0	*(Nielsen et al., 1997)*	35 et 24

***Tableau 2.1** : Bilan de l'analyse de la séquence primaire de PRODH humaine par 6 logiciels de prédiction de peptide signal d'adressage mitochondrial.*

De manière inattendue, les prédictions obtenues sont très différentes d'un programme à l'autre. Ainsi, la présence d'un message d'adressage mitochondrial est bien prédite chez PRODH par la majorité des logiciels, mais la longueur du peptide signal varie de manière significative selon le programme de 30 à 114 résidus. La figure 2.2 présente le diagramme de prédiction obtenu avec le logiciel SignalP qui est présenté comme l'algorithme le plus fiable d'après une récente étude comparative (Emanuelsson et al., 2001). Ce diagramme suggère la présence de 2 peptides signaux dans la région N-terminale de PRODH, qui pourraient peut-être expliquer la divergence des résultats obtenus avec les autres programmes. Le premier est prédit au niveau des 35 premiers résidus et le second serait situé entre les résidus 65 et 88.

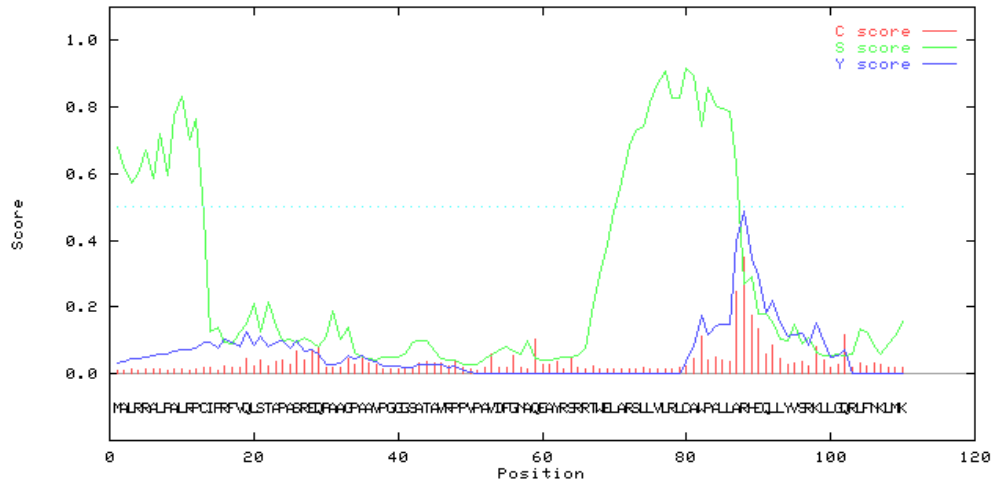


***Figure 2.2** : Diagramme de prédiction de peptide signal de PRODH par le logiciel SignalP.*

La prédiction de l'existence de 2 peptides signaux dans l'extrémité N-terminale de PRODH humaine est surprenante dans la mesure où les protéines mitochondriales destinées à intégrer la matrice ne contiennent qu'un seul de ces motifs (Pfanner & Neupert, 1990). Nous avons soumis la séquence primaire de PRODH humaine au logiciel HMMTOP (Tusnady & Simon, 1998) qui permet de prédire les hélices transmembranaires. De manière intéressante, l'algorithme HMMTOP suggère la présence d'une hélice transmembranaire unique entre les résidus 70 et 87, c'est-à-dire au niveau du second peptide signal potentiel. Dans leur étude comparative, Emanuelsson *et al.*, ont mis en évidence la grande difficulté des programmes de prédiction de peptide signal à distinguer les motifs transmembranaires des hélices d'adressage mitochondrial (Emanuelsson et al., 2001). La prédiction d'un second peptide signal potentiel n'est donc pas surprenante et correspond plus vraisemblablement à un segment hydrophobe. Au final, nous avons utilisé une partie des résultats de SignalP pour estimer la longueur du peptide signal N-terminal de PRODH à 35 résidus. La longueur moyenne d'un signal d'adressage mitochondrial étant de 23 résidus, cette prédiction semble tout à fait réaliste.

L'analyse de la séquence de PRODH humaine par des outils bio-informatiques a donc permis de prédire la présence d'un peptide d'adressage mitochondrial dans l'extrémité N-terminale 1-35 de la protéine. Ce motif à caractère hydrophobe n'incluant pas la forme mature de la protéine, nous avons par conséquent entrepris de réaliser une nouvelle construction PRODH délestée de ce peptide signal. Cette forme mature est nommée PRO564 et correspond à la région 37-600 de PRODH humaine (66 kDa).

3) Production de la protéine mature PRO564

Le vecteur d'expression pQE-31 encodant la protéine PRO564 a été obtenu à partir du plasmide pQE-31 contenant le gène *PRODH* par délétion. Après vérification de sa séquence, ce nouveau vecteur a été intégré dans des souches BL21 thermocompétentes préalablement transformées par le plasmide pREP-4.

Les protocoles d'expression et d'extraction que nous avons appliqués pour tester la solubilité de la nouvelle construction sont tout à fait identiques à ceux utilisés pour produire PRODH sauvage. Les cultures d'expression de 30 mL de PRO564 ont été induites à une DO mesurée à 600 nm de 0.5 par ajout de 1 mM d'IPTG, puis incubées à 37°C pendant 3 heures. Après lyse des bactéries, les protéines cytosolubles ont été extraites par centrifugation, et le matériel insoluble a été repris avec de l'urée 8 M. Après une seconde étape de centrifugation, les agrégats du culot final ont été solubilisés avec du SDS.

A l'instar de PRODH sauvage, nous avons également réalisé une optimisation de plusieurs paramètres comme la quantité d'inducteur IPTG (0.1 mM, 0.5 mM, et 1 mM), la température d'expression (29°C et 37°C), et la nature du détergent utilisé dans le tampon de lyse (Triton X-100, NP 40, et Tween 20). Les meilleurs taux d'expression pour l'ensemble des fractions ont été obtenus avec une concentration d'IPTG de 0.1 mM, une température de 29°C, et en utilisant du Triton X-100 à 2 %. L'analyse SDS-PAGE de l'expression de PRO564 dans ces conditions est présentée dans la Figure 2.3.

Comme le montre la Figure 2.3, une bande de surexpression dont la masse apparente correspond à la masse attendue (66 kDa) est observable dans les fractions contenant le culot final et les protéines insolubles reprises dans l'urée. Toutefois, cette bande d'expression n'apparaît pas dans le surnageant de lyse contenant les protéines solubles. D'autre part, nous avons constaté que l'optimisation des conditions expérimentales citées ci-dessus n'a eu aucune influence sur la solubilité de la protéine recombinante. Par conséquent, à l'image de la protéine hétérologue PRODH sauvage, la surexpression de PRO564 chez *E. coli* conduit à l'unique formation de corps d'inclusion. Nous avons toutefois noté une différence significative entre le profil d'expression de la forme mature et celui de la forme sauvage. Lorsque nous avons produit PRODH humaine, la reprise du matériel insoluble par de l'urée

8 M pendant 6 heures n'a pas été suffisante pour dénaturer ne serait-ce qu'une partie de protéine insoluble PRODH. Dans le cas de PRO564, plus d'un tiers de protéine insoluble a été dénaturée par l'urée dans les mêmes conditions. Par conséquent, ceci laisse supposer la part de responsabilité du peptide signal dans l'agrégation de PRODH recombinante.

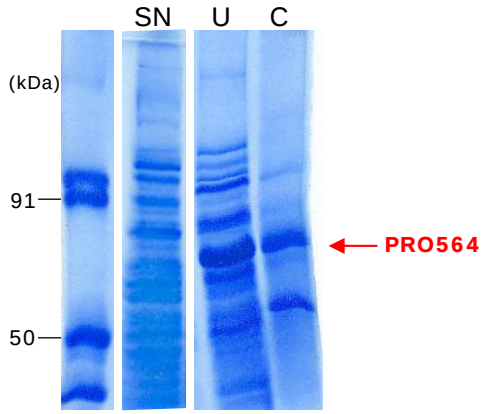


***Figure 2.3** : Expression de la protéine PRO564 chez E. coli. Analyse SDS-PAGE des fractions contenant, les protéines solubles (SN), les protéines insolubles resolubilisées dans l'urée 8 M (U), et le culot final repris dans du SDS (C).*

4) Conclusions

Dans le travail qui a été présenté, nous avons abordé la première étape de l'étude structurale de PRODH humaine en la surexprimant chez la bactérie *E. coli*. Nous avons montré que la production des protéines PRODH sauvage et mature dans cet organisme conduit à l'unique formation de corps d'inclusion, et ceci malgré une optimisation de quelques paramètres d'expression et d'extraction.

Lorsque l'expression d'une protéine sous forme soluble n'est pas possible chez *E. coli*, une des stratégies alternatives d'obtention de la forme repliée communément utilisée consiste à renaturer la protéine *in vitro* à partir de corps d'inclusion purifiés. Cette technique, qui repose sur la renaturation de la protéine par dialyse de l'agent dénaturant, présente cependant un caractère tout autant incertain. Elle nécessite ainsi de contrôler que le repliement final de la protéine soit natif et biologiquement actif à l'issu de la renaturation. Lorsque nous avons entrepris de produire PRODH chez *E. coli*, il n'existait aucune donnée structurale connue de proline déshydrogénase d'une espèce eucaryote suffisamment proche qui permette de vérifier

l'efficacité d'une éventuelle renaturation *in vitro*. Les données de la littérature font état de 2 tests d'activité de PRODH *in vitro*, dont l'un repose sur le dosage du produit de dégradation de la proline par l'O-aminobenzaldehyde (Johnson & Strecker, 1962). Ces tests d'activité, qui n'étaient pas mis en place au Laboratoire de Génétique de Rouen, nécessitent généralement une mise au point qui d'une part, peut être coûteuse en temps et d'autre part, demande une certaine expérience en la matière. Par conséquent, ne disposant d'aucun moyen de vérification de l'efficacité d'une éventuelle renaturation, nous n'avons pas envisagé d'obtenir la forme repliée de PRODH par renaturation *in vitro* des corps d'inclusion.

A ce stade du projet, il apparaissait donc que seule l'expression de PRODH sous forme soluble nous permette d'accéder à l'étape supérieure de l'étude structurale. Deux choix stratégiques différents étaient alors possibles : changer d'organisme de production, ou intégrer une structure qui permette un criblage à haut ou moyen débit de plusieurs conditions d'expression chez *E. coli*. Nous avons opté pour la deuxième stratégie en initiant une collaboration avec le Laboratoire de Marquage des Protéines (LMP) du Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines (DIEP, Direction Docteur André Menez) du CEA de Saclay. Dans le cadre de cette collaboration, j'ai été accueilli au sein du LMP afin de bénéficier des infrastructures d'une plate-forme de production à moyen débit de protéines recombinantes chez *E. coli*.

Outre la possibilité de tester un grand nombre de conditions expérimentales, le programme de production du LMP permet également de surexprimer en parallèle plusieurs protéines ou domaines dans un délai raisonnable. C'est pourquoi, nous avons entrepris de produire la forme mature de PRODH humaine, ainsi que 3 autres domaines de cette protéine, dans le cadre de cette plate-forme. En effet, de nouvelles données sont apparues dans la littérature lorsque nous produisions PRO564. La publication récente de la première structure du domaine catalytique de proline déshydrogénase de *E. coli* (Lee et al., 2003) nous a permis de modifier notre stratégie d'étude structurale de PRODH. Sur la base de cette structure, nous avons mené une analyse bio-informatique afin de sélectionner 3 domaines potentiels de PRODH. La description de cette étude fait l'objet du prochain chapitre.

5) Matériels et Méthodes

5.1) Création des plasmides d'expression

5.1.1) Clonage de *PRODH* sauvage dans le vecteur d'expression pQE-31

L'ADNc de *PRODH* sauvage a été obtenu au laboratoire par RT-PCR à partir d'ARNm extraits de cellules humaines, puis cloné dans un plasmide eucaryote pcDNA3 (Invitrogen). Le clonage des 1800 nucléotides de la région codante de *PRODH* dans le vecteur d'expression procaryote pQE-31 (Qiagen) se déroule en plusieurs étapes. Des souches *E. coli* DH5α transformées par le plasmide pcDNA3 sont mises en culture et sont utilisées pour réaliser une minipréparation d'ADN plasmidique. L'ADNc de *PRODH* sauvage, encadré par les sites de restriction reconnus par les enzymes *Bam*HI et *Kpn*I, est linéarisé par digestion avec ces 2 enzymes à 37°C pendant 2 heures. En parallèle, le vecteur pQE-31, qui contient ces 2 sites de restriction au niveau de son site de clonage multiple, est également digéré par *Bam*HI et *Kpn*I dans les mêmes conditions. Les produits de digestion sont séparés et purifiés sur gel d'agarose à 0.9 % en découpant les bandes correspondantes avec le kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Après estimation de la concentration finale des produits par mesure des absorbances à 260 et 280 nm, la ligation entre l'insert *PRODH* sauvage et le plasmide pQE-31 linéarisé est réalisée avec la *T4 DNA ligase* (New England Biolabs) à 16°C pendant 24 heures. Le produit de ligation est transformé dans des souches chimiocompétentes *E. coli* BL21 par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Le vecteur pQE-31 possédant un gène de résistance à l'ampicilline, le produit de transformation est étalé sur boîte LB/agar contenant de l'ampicilline à 50 µg/mL, puis incubé à 37°C pendant toute une nuit. Le lendemain, plusieurs colonies isolées sont mises en culture en milieu LB et une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée pour chacune de ces cultures. Les produits de ces minipréparations sont séquencés sur séquenceur automatique *Applied Biosystem 373A* afin de sélectionner les colonies qui possèdent le vecteur pQE-31 correctement cloné par *PRODH* sauvage. La dernière étape consiste à transformer des souches BL21 contenant le vecteur pREP-4, qui encode la protéine de régulation LacI, par le vecteur pQE-31 cloné. Le plasmide pREP-4 contenant un gène de résistance à la kanamycine, les bactéries qui possèdent les vecteurs pQE-31 et pREP-4 sont sélectionnées par ajout de 50 µg/mL d'ampicilline et de 30 µg/mL de kanamycine dans les milieux de culture. Ces cultures sont finalement mélangées à 25 % de glycérol puis stockées à -80°C.

5.1.2) Construction du vecteur pQE-31 contenant *PRO564*

La protéine PRO564 correspond à la protéine PRODH sauvage délestée de 36 acides aminés à son extrémité N-terminale. De ce fait, nous avons choisi de réaliser le vecteur de surexpression de PRO564 à partir du vecteur pQE-31 cloné par *PRODH* sauvage par une technique apparentée à la mutagenèse dirigée. La stratégie consiste à amplifier par PCR la totalité du vecteur pQE-31 cloné à l'exception de la région qui correspond à l'extrémité 1-36 de PRODH. Pour cela, nous avons utilisé le kit de mutagenèse *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* de la société Stratagene.

Une minipréparation d'ADN plasmidique est préalablement réalisée à partir de cultures de BL21 uniquement transformées par le plasmide pQE-31 cloné par *PRODH*. Ce vecteur est amplifié par PCR à l'aide d'amorces sens et anti-sens complémentaires des extrémités des régions d'ADN à dupliquer. Les amorces utilisées sont del-PRODH-40-For (5'-GTGCCAGGAGGTGGGTCGGCCAC-3') et del-PRODH-Rev (5'-ATGGTGATGGTGA TGGTGAGATCCTCTCATAG-3'). Le mélange réactionnel de PCR est composé de 2.5 unités d'enzyme *Pfu Turbo* (Stratagene), de 5 µL de tampon *Pfu* 10x, de 125 ng de chaque amorce, de 0.2 mM de mélange nucléotidique dNTP, et de 30 ng de vecteur pQE-31. Le volume final est complété à 50 µL avec de l'eau MilliQ stérile. Les conditions d'amplification par la polymérase haute fidélité *Pfu Turbo* sont résumées dans la figure suivante :

***Figure 2.4** : Description du protocole d'amplification PCR utilisé pour réaliser la construction PRO564.*

Une fois les 30 cycles de PCR terminés, les amplicons sont vérifiés sur gel d'agarose 1%, puis digérés avec l'enzyme de restriction *Dpn*I à 37°C pendant 1 heure 30. L'action de *Dpn*I permet de linéariser de manière spécifique le plasmide circulaire parental pQE-31, et ainsi de le neutraliser avant transformation dans *E. coli*. Les produits de PCR sont purifiés sur gel d'agarose à 0.9% avec le kit *QIAquick Gel Extraction* en découpant les bandes qui migrent aux tailles attendues. Après estimation de la quantité de matériel, la ligation des extrémités de l'insert par « bout franc » est entreprise en mélangeant 50 ng d'amplicon avec 3

unités de T4 DNA ligase pendant 30 heures à 16°C. Plusieurs colonies BL21 chimiocompétentes contenant le plasmide pREP-4 sont transformées avec le produit de ligation par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes, puis étalées sur boîte LB/agar contenant 50 µg/mL d'ampicilline et 30 µg/mL de kanamycine à 37°C pendant toute une nuit. Le lendemain, plusieurs colonies isolées sont mises en culture avec les mêmes concentrations d'antibiotiques et une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée pour chacune d'entre elles. La construction du nouveau vecteur pQE-31 encodant la protéine PRO564 est contrôlée par digestion avec les enzymes *Bgl*I et *Eco*RV. L'amplification d'un fragment par PCR pouvant engendrer des erreurs inhérentes à l'utilisation des polymérases, la séquence des clones sélectionnés a été minutieusement vérifiée avec le séquenceur automatique *Applied Biosystem 373A*. Finalement, les cultures bactériennes qui contiennent la construction attendue sont mélangées à 25 % de glycérol puis stockées à -80°C.

5.2) Production, extraction, et analyse de PRODH et PRO564

5.2.1) Surexpression des protéines recombinantes

Les différents tests de surexpression des protéines PRODH sauvage et PRO564 ont été réalisés en utilisant le protocole décrit ci-après. Certains paramètres ont fait l'objet d'une optimisation et sont discutés dans les paragraphes 1.2 et 3.

Pour chaque production, l'ensemencement initial des boîtes de pétri est effectué à partir des stocks glycérol de bactéries conservés à -80°C. Plusieurs colonies BL21 transformées par le vecteur pREP-4 et un plasmide pQE-31 contenant un des gènes d'intérêt sont étalées sur boite LB/agar contenant 50 µg/mL d'ampicilline et 30 µg/mL de kanamycine. Après une nuit d'incubation à 37°C, une colonie isolée est mise en préculture dans un *falcon* de 12 mL contenant 5 mL de milieu LB, 100 µg/mL d'ampicilline, et 30 µg/mL de kanamycine. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 3 heures sous une agitation de 250 rpm. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la DO à 600 nm. Une culture de 30 mL de milieu LB contenant la même concentration d'antibiotiques est introduite dans un erlenmeyer de 300 mL, puis ensemencée avec un volume de préculture de manière à obtenir une DO initiale égale à 0.05. Cette culture est ensuite placée à 37°C sous une agitation de 250 rpm. L'expression des protéines recombinantes est induite par ajout de 1mM d'IPTG dans les milieux de culture lorsque la DO mesurée à 600 nm atteint 0.5. La culture est alors poursuivie

pendant 3 heures à 37°C sous une agitation de 250 rpm. A l'issu de ce délai, la croissance bactérienne est stoppée en introduisant les erlenmeyers dans la glace.

5.2.2) Extraction des protéines hétérogènes

La lyse des cellules bactériennes et l'extraction des protéines sont réalisées de la manière suivante. Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 6000xg pendant 20 minutes à 4°C. Après élimination des surnageants, les culots bactériens sont resuspendus dans 3 mL d'un tampon contenant, 50 mM de phosphate (pH=7.1), 500 mM de NaCl, et 2 mM d'EDTA. La rupture des membranes bactériennes est initiée en introduisant du lysozyme à une concentration finale de 100 µg/mL. Le mélange est laissé sur glace pendant 15 minutes puis porté à 37°C pendant 10 minutes. 5 mM de $MgCl_2$, 10 µg/mL de DNase I, et 50 µg/mL de RNase sont ensuite introduits dans le but de dégrader l'ADN et l'ARN libérés dans le lysat. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 10 minutes avant d'être soumis à 2 cycles de sonication afin de compléter la lyse des membranes. Les fractions soluble et insoluble sont séparées par centrifugation à 14000xg pendant 45 minutes à 4°C. Il est à noter que l'utilisation de DNase I, qui digère l'ADN endogène visqueux de *E. coli*, permet d'éviter d'entraîner des protéines solubles qui accrocheraient cet ADN dans la fraction des protéines insolubles. Le culot contenant le matériel insoluble est resuspendu avec 3 mL de tampon dénaturant composé de 50 mM de phosphate (pH=7.1), 500 mM de NaCl, et 8 M d'urée. L'urée est un puissant chaotrope qui permet de dénaturer et solubiliser les corps d'inclusion. L'ensemble est mis sous agitation à 4°C pendant 6 heures, puis de nouveau centrifugé à 14000xg pendant 45 minutes à 4°C. La fraction soluble de cette seconde centrifugation contenant les corps d'inclusion dénaturés est appelée « fraction urée 8M ». Le culot final est finalement repris avec 3 mL de SDS 2%, un détergent anionique dénaturant très puissant.

5.2.3) Analyse de l'expression des protéines recombinantes

Une fois la totalité des fractions de centrifugation collectées, les surnageants des fractions soluble et « urée 8M » sont aliquotés, congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C. La préparation des échantillons pour l'analyse par électrophorèse SDS-PAGE se déroule de la manière suivante. 30 µL de chaque aliquot sont prélevés, puis mélangés avec 30 µL de « bleu de charge » (0.2 mM de Tris-HCl, 40 % de glycérol, 2.6 % de SDS, 2.6 % de β-mercaptoéthanol, et 0.05 % de bleu de Coomassie G-250). Les échantillons ainsi préparés sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes, puis centrifugés 1 minute à 6000xg. Environ 15 µL

de ce mélange sont finalement prélevés et déposés sur gels de polyacrylamide pour l'analyse SDS-PAGE.

Les échantillons analysés par *Western-blot* sont préparés de la même manière et sont dans un premier temps soumis à une analyse SDS-PAGE. Une fois séparées sur gel de polyacrylamide, les bandes protéiques sont transférées sur membrane de PVDF avec un appareil de transfert semi sec. La membrane est ensuite incubée à 37°C pendant une heure avec une solution saline contenant l'anticorps anti-6xHis greffé à la phosphatase alcaline (Sigma). La révélation des protéines qui possèdent une étiquette 6xHis est finalement menée en déposant la membrane dans une solution contenant le substrat BCIP/NBT. Ce substrat interagit de manière directe avec la phosphatase alcaline, ce qui induit une coloration des bandes protéiques fixées par l'anticorps anti-6xHis.

CHAPITRE 3

Etude bio-informatique : sélection de 3 domaines PRODH

Lorsque nous avons débuté l'étude structurale de PRODH, il n'existait aucune structure connue de proline déshydrogénase d'un quelconque organisme. La publication en février 2003 de la première structure d'un domaine PRODH chez *E. coli* (PutA669) nous a permis d'aborder une stratégie structurale alternative qui consiste à sélectionner des domaines PRODH humains à partir de cette structure et de prédictions bio-informatiques.

La démarche consiste dans un premier temps à prédire la délimitation du domaine catalytique humain en reportant les éléments de structure secondaire de PutA669 sur l'alignement de séquences qui a été présenté dans le chapitre 1. Ceci permet de caractériser l'organisation des domaines de la protéine humaine de manière prédictive, et ainsi de restreindre notre champ d'investigation à un ou plusieurs domaines supposés structuralement indépendants. Un certain nombre d'outils bio-informatiques de prédiction de structure secondaire, et de visualisation des résidus hydrophobes, sont alors utilisés afin de délimiter de manière précise les domaines structuraux sélectionnés. Avant de présenter les résultats de cette étude bio-informatique, qui a été menée en étroite collaboration avec le Dr. Sophie Zinn-Justin du DIEP, la structure du domaine proline déshydrogénase de *E. coli* sera brièvement décrite.

1) Description de la structure du domaine PRODH de *E. coli*

Comme je l'ai évoqué dans le premier chapitre, la protéine de liaison à l'ADN PutA est l'orthologue procaryote de PRODH humaine chez *E. coli*. La structure des 669 résidus N-terminaux de cette protéine (PutA669), qui correspondent au domaine proline déshydrogénase de *E. coli*, a été résolue par cristallographie des rayons X (Lee et al., 2003). Dans cette structure, PutA669 est un homodimère composé de 3 domaines : un domaine N-terminal de dimérisation (87-139), un second domaine N-terminal de fonction inconnue (140-260), et un domaine catalytique C-terminal de près de 350 résidus qui assure la fonction proline oxydase (261-612).

Le domaine de dimérisation est constitué d'un bras de 3 hélices α qui embrasse les 3 hélices homologues de l'autre sous-unité. Le second domaine N-terminal comporte 6 hélices α qui n'établissent aucun contact significatif avec le domaine catalytique ou la seconde sous-unité. Lee *et al.,* ont dans un premier temps suggéré que ce domaine, dont le repliement est

proche des motifs caractéristiques de liaison à l'ADN « hélice-coude-hélice », puisse être responsable de la fixation aux acides nucléiques. Plus récemment, Gu *et al.*, ont montré que le domaine de liaison à l'ADN est en réalité localisé dans l'extrémité N-terminale 1-90 de PutA qui est déstructurée dans la structure cristalline de PutA669 (Gu et al., 2004). Au vu de l'alignement de séquences initial qui a été réalisé dans le chapitre 1, il apparaît que les 2 domaines N-terminaux de PutA669 ne sont présents ni chez l'Homme, ni chez aucune espèce eucaryote. En effet, la longueur des séquences PRODH est très différente d'une espèce à l'autre (de 475 résidus chez la plante *Oryza* à 669 résidus chez la mouche) et elles ne s'alignent que dans la moitié C-terminale des séquences eucaryotes qui correspond au domaine catalytique. De plus, contrairement à PutA qui est capable de réguler la transcription de son gène dans le cytoplasme, il n'a jamais été montré qu'une proline oxydase eucaryote, localisée dans la mitochondrie, soit capable de lier l'ADN.

La superstructure du domaine catalytique de PutA669 est un tonnelet de type α8β8 dans lequel 8 feuillets β forment un cœur hydrophobe autour d'un cofacteur FAD et d'un inhibiteur lactate (Figure 3.1). Cette poche hydrophobe est protégée du solvant par 10 hélices α situées en périphérie du domaine. Les molécules de FAD et de lactate sont fortement liées à ce domaine catalytique par de nombreuses interactions non covalentes avec l'hélice C-terminale α8 et les extrémités C-terminales des feuillets β.

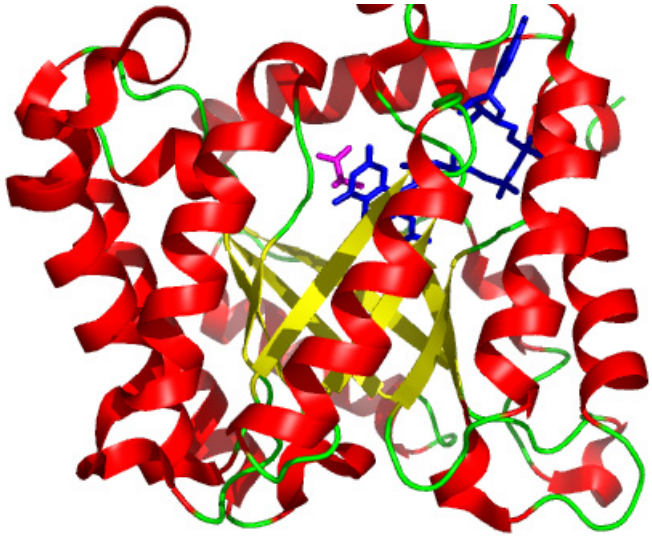


***Figure 3.1** : Structure du tonnelet α8β8 du domaine catalytique de PutA669. Les hélices apparaissent en rouge, les feuillets en jaune, et les boucles en vert. Le cofacteur FAD est coloré en bleu, et l'inhibiteur lactate en violet.*

La comparaison de séquence de la région C-terminale conservée de PRODH humaine (340-600) avec PutA669 met en évidence une faible identité de séquence d'à peine 15 %. De manière intéressante, ce pourcentage atteint 47 % lorsqu'on restreint la comparaison aux résidus situés à moins de 5 Å du cofacteur FAD ou de l'inhibiteur lactate. Ainsi, sur les 40 résidus à proximité de ces 2 molécules, 19 sont rigoureusement identiques et 6 sont similaires. Sur la base de cette forte conservation au niveau de ces résidus critiques, il apparaît que PutA669 et PRODH humaine comportent le même site actif et par conséquent, un domaine catalytique qui pourrait être de repliement similaire. La présence d'une molécule de lactate dans le cœur hydrophobe de PutA669 conforte cette hypothèse. En effet, le lactate est connu pour sa capacité à inhiber l'activité de la proline déshydrogénase chez les organismes eucaryotes (Kowaloff et al., 1977), ce qui n'avait jamais été constaté chez les PRODH procaryotes.

2) Caractérisation de l'organisation de PRODH humaine

2.1) Report de la structure secondaire de PutA669 sur l'alignement initial

La délimitation du domaine catalytique humain peut être prédite en reportant les éléments de structure secondaire de PutA669 sur l'alignement initial (cf. chapitre 1) mené avec 9 séquences eucaryotes et la séquence de PutA. Sur la base de ce report de structure secondaire, il apparaît que le domaine catalytique humain est situé entre les résidus 270 et 600 (non montré). Cette délimitation est en accord avec les prédictions réalisées par les programmes de *threading* de type 3D-PSSM, qui confirment l'alignement initial en construisant un modèle par pseudo homologie du domaine catalytique humain qui s'étend des résidus 267 à 570.

2.2) Organisation de PRODH humaine

Dans l'optique de caractériser l'organisation des domaines de PRODH humaine, nous avons voulu tester la véracité de l'alignement initial en vérifiant l'état de conservation des résidus impliqués dans l'interaction avec le cofacteur ou l'inhibiteur qui sont supposés être fortement conservés. De fortes identités sont effectivement observables au niveau de l'ensemble des feuillets β du tonnelet à l'exception des 2 brins N-terminaux β1 et β2 qui apparaissent non conservés. Ce résultat semble surprenant dans la mesure où 2 résidus du brin

β2 établissent des contacts avec le cofacteur FAD dans la structure de PutA669. Nous avons soumis les séquences correspondant aux brins β1 et β2 de PutA669 au programme PSI-BLAST afin de déterminer les homologues séquentiels de ces régions. De manière intéressante, les résultats de cette recherche montrent des homologies significatives avec des segments de la région 110-240 de PRODH humaine qui ne sont pas alignés avec la séquence de PutA sur l'alignement initial (cf. chapitre 1). Le programme PSI-BLAST met également en évidence des homologies avec des fragments N-terminaux de plusieurs séquences de proline déshydrogénase eucaryote qui sont également non alignés avec PutA sur l'alignement initial.

Sur la base de cette analyse, nous avons corrigé l'alignement de séquences qui s'avérait inexact dans la région N-terminale du domaine catalytique. La totalité de ce nouvel alignement de 10 séquences eucaryotes avec PutA669 qui s'étend sur près de 850 résidus est présenté dans la figure 3.2. Cet alignement corrigé fait apparaître 2 insertions au sein du domaine catalytique chez les eucaryotes supérieurs comme le ver *Caenorhabditis elegans*, la mouche *Drosophila Melanogaster*, et l'Homme. La première de ces insertions, composée d'une cinquantaine de résidus, est située entre le feuillet β1 et l'hélice α1 du tonnelet α8β8. La seconde, d'une taille deux fois plus importante, est localisée entre le feuillet β2 et l'hélice α2.

Figure 3.2 *:*
*Alignement corrigé de 10 séquences de proline déshydrogénase réalisé avec l'aide du logiciel clustalw. Les éléments de structure secondaire reportés sont relatifs à la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de PutA669, résolue par diffraction des rayons X (Lee et al., 2003). Les feuillets β sont en vert, et les hélices α en rouge. Les 2 insertions dans la région N-terminale du domaine catalytique sont mises en évidence. Les résidus sont colorés en rouge lorsqu'ils sont conservés (sigle *), en vert lorsqu'il sont fortement similaires (sigle :), et en bleu lorsqu'ils sont faiblement similaires (sigle .).*

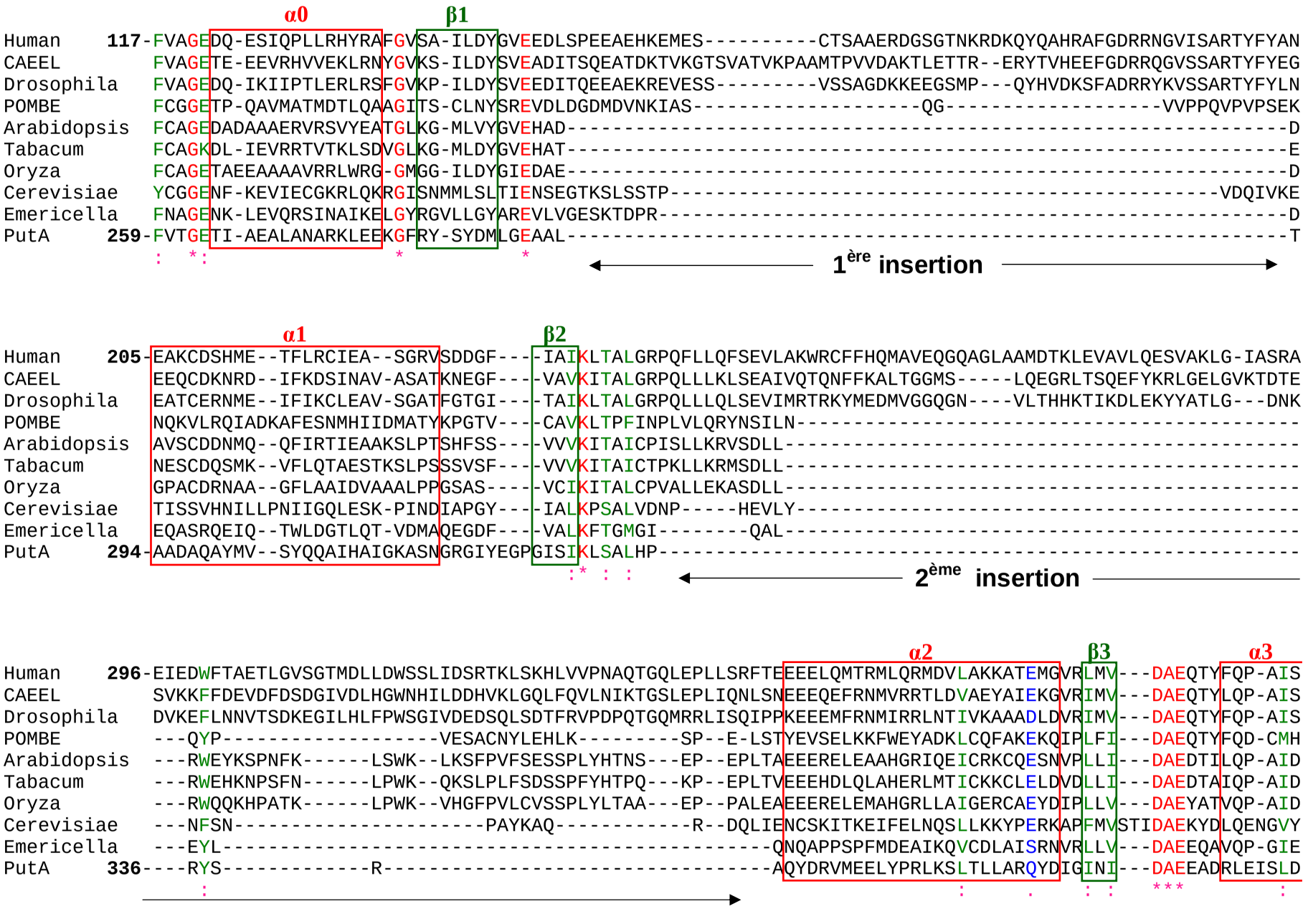
Les 10 séquences alignées correspondent aux espèces suivantes :

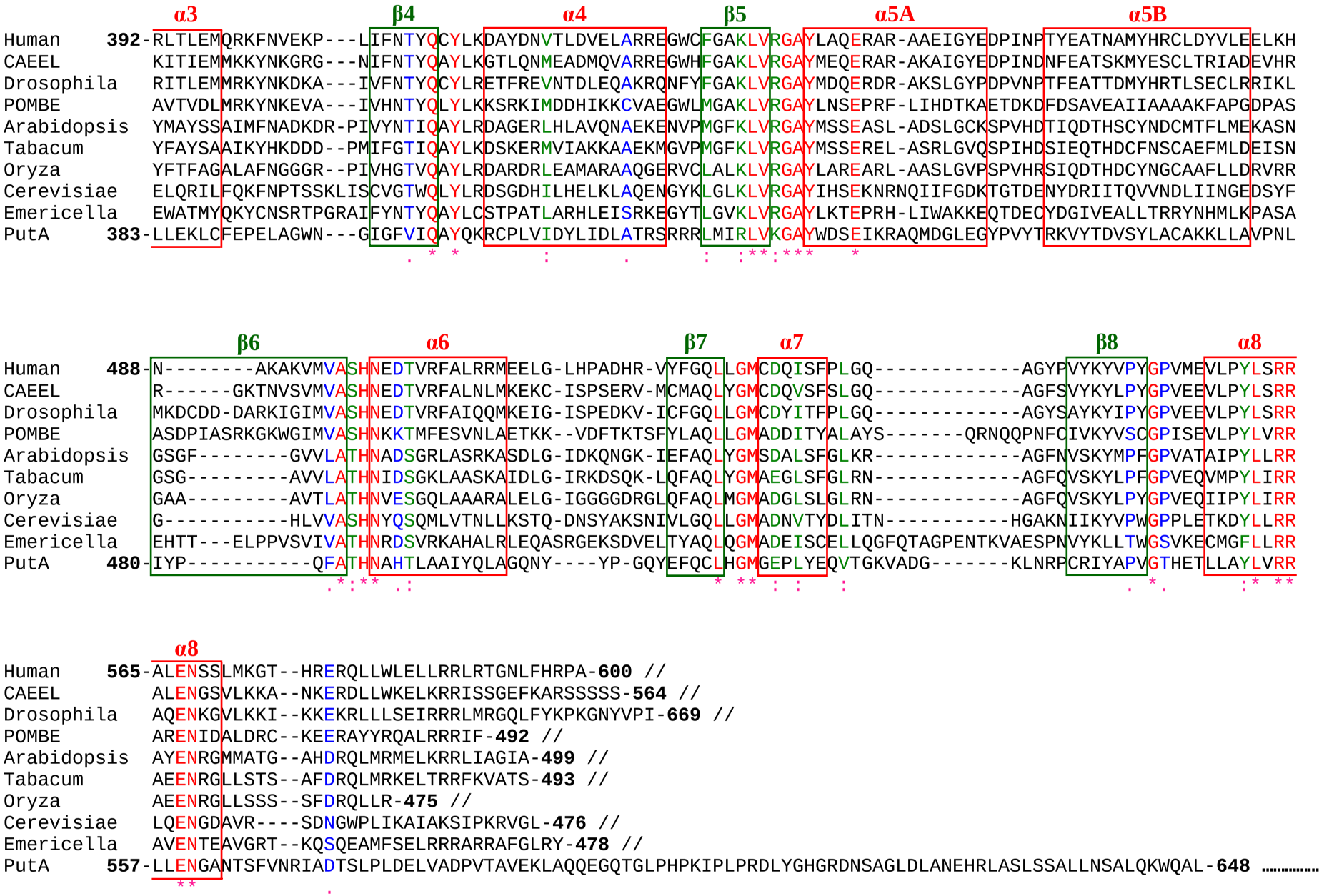
Human	:	proline oxydase humaine (600 résidus)
CAEEL	:	proline oxydase de *Caenorhabditis elegans* (564 résidus)
Drosophila	:	proline oxydase de *Drosophila Melanogaster* (669 résidus)
POMBE	:	proline oxydase de *Schizosaccharomyces pombe* (492 résidus)
Arabidopsis	:	proline oxydase de *Arabidopsis thaliana* (499 résidus)
Tabacum	:	proline oxydase de *Nicotiana tabacum* (493 résidus)
Oryza	:	proline oxydase de *Oryza sativa* (475 résidus)
Cerevisiae	:	proline oxydase de *Saccharomyces cerevisiae* (476 résidus)
Emericella	:	proline oxydase de *Emericella nidulans* (478 résidus)
PutA	:	proline dehydrogenase de *E.coli* (648 premiers résidus)

```
Human                                                1-----------------MALRRALPALRPCIPRFVQLSTAPASR----------EQPAAG
CAEEL                                                1-------------------------MKIPVALVL-----------------------
Drosophila                                           1-----------------MALLRSLSAQRTAISLVYGRNSSKSSNSVAVAACRSFHQRGNG
POMBE                                                1----------------MRAFRLASGVLRNRKVILGIGAGSLITAG---------NIKIRN
Arabidopsis                                          1----------------MATRLLRTNFIRRSYRLPAFSPVGPPTVTAS-------TAVVPE
Tabacum                                              1----------------MANKVVCPKAFRDLRSFVRCLNTAPTVPPMN-------FTGAYD
Oryza                                                1-------------------MAIASRIQKRVLASFAAAAAAKLPEAA--------VAAAGG
Cerevisiae                                           1----------------MIASKSSLLVTKSRIPSLCFPLIKRSYVSKT-------PTHSNT
Emericella                                           1--------------MKAATPRPSVRALSSGRSYRTARFVSRTSNAR--------SSLAAD
PutA                                                 1-MGTTTMGVKLDDATRERIKSAATRIDRTPHWLIKQAIFSYLEQLENSDTLPELPALLSG

Human      34-PAAVPGGGSAT------------A--------------------VRP----------PVPA---------VD-FGNAQ--------------------
CAEEL         -T-------------------------------------------III-------------------------E-F-----------------------
Drosophila    STSIAGEGAASESTRGVNGARFLHSGDRPLQASTLVQPEVVSSETVKRSMKQESSQEKNPSPAGSPQRDPLDVS-FNDPI--------------------
POMBE         DSKFDAFFAKG-------------------------------------------------------------FPD---------------------
Arabidopsis   ILSFGQQAPEPP---------------------------------LHHP---------KPTEQSHDG-----LD-LSDQA--------------------
Tabacum       ATTVTTPALIP----------------------------------TD----------QVITADKKV-----IN-FEDVK--------------------
Oryza         AAEAVEEVASS----------------------------------VQEQ----------VQAQG----AQVLE-FGDTE--------------------
Cerevisiae    AANLMVETPAAN-------------------------------------------------------------ANGN--------------------
Emericella    TNSLLQQAPPS--------------------------------------------------------------P-KKQLA--------------------
PutA       60-AANESDEAPTPAEEPHQPFLDFAEQILPQSVSRAAITAAYRRPETEAVSMLLEQARLPQPVAEQAHKLAYQLADKLRNQKNASGRAGMVQGLLQEFSLSS

Human      60--------------EAYRSRRTWELAR--------------SLLVLRLCAWPALLARHEQLLY--V-----SRKLLGQRLFNKLMK------MTFYGH
CAEEL         ---------------FQSKSNTELVR--------------ALVVLRLCGIQTLVNQNQIILN--T-----MRRVLGKNLFKKTLK------NTFFGH
Drosophila    --------------AAFKSKTTGELIR--------------AYLVYMICSSENLVEHNMTLMK--W-----SKNVLGQRLFTLLMK------ATFYGH
POMBE         --------------ELQHRSLFSVLR--------------SAFVYEICSRAWLVKLSLGAMS--L-----CDVFHLSFLYNPFCR------YTFYKH
Arabidopsis   --------------RLFSSIPTSDLLR--------------STAVLHAAAIGPMVDLGTWVMSSKL-----MDASVTRGMVLGLVK------STFYDH
Tabacum       --------------ELFTGVSTLKLIR--------------STLTLQMAATEPMVDVGIWVMNSKL-----MHMPIVKEVILGFVK------GTFYEH
Oryza         --------------RLFAGERSTSLVR--------------TLAVLQALSVGPLVDVATAALR--------SPAVAGSAAGRAAAR------ATAYQH
Cerevisiae    --------------SVMAPPNSINFLQT-------------LPKKELFQLGFIGIATLNSFFLN--------TIIKLFPYIPIPVIK------FFVSSL
Emericella    --------------SPLAKLPLSSVLR--------------SLLILSVSSSSILLKPCIYTLSALAHPKTALLDVAKNPLLNLLVK------HTIYKQ
PutA      160-QEGVALMCLAEALLRIPDKATRDALIRDKISNGNWQSHIGRSPSLFVNAATWGLLFTGKLVSTHNEASLSRSLNRIIGKSGEPLIRKGVDMAMRLMGEQ
                                          . :             .          :                              :
```


α0
β1
Human 117-FVAGEDQ-ESIQPLLRHYRAFGVSA-ILDYGVEEDLSPEEAEHKEMES----------CTSAAERDGSGTNKRDKQYQAHRAFGDRRNGVISARTYFYAN
CAEEL FVAGETE-EEVRHVVEKLRNYGVKS-ILDYSVEADITSQEATDKTVKGTSVATVKPAAMTPVVDAKTLETTR--ERYTVHEEFGDRRQGVSSARTYFYEG
Drosophila FVAGEDQ-IKIIPTLERLRSFGVKP-ILDYSVEEDITQEEAEKREVESS---------VSSAGDKKEEGSMP---QYHVDKSFADRRYKVSSARTYFYLN
POMBE FCGGETP-QAVMATMDTLQAAGITS-CLNYSREVDLDGDMDVNKIAS--------------------QG------------------VVPPQVPVPSEK
Arabidopsis FCAGEDADAAAERVRSVYEATGLKG-MLVYGVEHAD--D
Tabacum FCAGKDL-IEVRRTVTKLSDVGLKG-MLDYGVEHAT--E
Oryza FCAGETAEEAAAAVRRLWRG-GMGG-ILDYGIEDAE--D
Cerevisiae YCGGENF-KEVIECGKRLQKRGISNMMLSLTIENSEGTKSLSSTP---VDQIVKE
Emericella FNAGENK-LEVQRSINAIKELGYRGVLLGYAREVLVGESKTDPR--D
PutA 259-FVTGETI-AEALANARKLEEKGFRY-SYDMLGEAAL--T
1ère insertion
α1
β2
Human 205-EAKCDSHME--TFLRCIEA--SGRVSDDGF---IAIKLTALGRPQFLLQFSEVLAKWRCFFHQMAVEQGQAGLAAMDTKLEVAVLQESVAKLG-IASRA
CAEEL EEQCDKNRD--IFKDSINAV-ASATKNEGF---VAVKITALGRPQLLLKLSEAIVQTQNFFKALTGGMS-----LQEGRLTSQEFYKRLGELGVKTDTE
Drosophila EATCERNME--IFIKCLEAV-SGATFGTGI---TAIKLTALGRPQLLLQLSEVIMRTRKYMEDMVGGQGN----VLTHHKTIKDLEKYYATLG---DNK
POMBE NQKVLRQIADKAFESNMHIIDMATYKPGTV---CAVKLTPFINPLVLQRYNSILN--
Arabidopsis AVSCDDNMQ--QFIRTIEAAKSLPTSHFSS---VVVKITAICPISLLKRVSDLL--
Tabacum NESCDQSMK--VFLQTAESTKSLPSSSVSF---VVVKITAICTPKLLKRMSDLL--
Oryza GPACDRNAA--GFLAAIDVAAALPPGSAS----VCIKITALCPVALLEKASDLL--
Cerevisiae TISSVHNILLPNIIGQLESK-PINDIAPGY---IALKPSALVDNP-----HEVLY--
Emericella EQASRQEIQ--TWLDGTLQT-VDMAQEGDF---VALKFTGMGI--------QAL--
PutA 294-AADAQAYMV--SYQQAIHAIGKASNGRGIYEGPGISIKLSALHP--
2ème insertion
α2
β3
α3
Human 296-EIEDWFTAETLGVSGTMDLLDWSSLIDSRTKLSKHLVVPNAQTGQLEPLLSRFTEEEELQMTRMLQRMDVLAKKATEMGVRLMV---DAEQTYFQP-AIS
CAEEL SVKKFFDEVDFDSDGIVDLHGWNHILDDHVKLGQLFQVLNIKTGSLEPLIQNLSNEEEQEFRNMVRRTLDVAEYAIEKGVRIMV---DAEQTYLQP-AIS
Drosophila DVKEFLNNVTSDKEGILHLFPWSGIVDEDSQLSDTFRVPDPQTGQMRRLISQIPPKEEEMFRNMIRRLNTIVKAAADLDVRIMV---DAEQTYFQP-AIS
POMBE ---QYP-----------------VESACNYLEHLK---------SP--E-LSTYEVSELKKFWEYADKLCQFAKEKQIPLFI---DAEQTYFQD-CMH
Arabidopsis ---RWEYKSPNFK------LSWK--LKSFPVFSESSPLYHTNS---EP--EPLTAEEERELEAAHGRIQEICRKCQESNVPLLI---DAEDTILQP-AID
Tabacum ---RWEHKNPSFN------LPWK--QKSLPLFSDSSPFYHTPQ---KP--EPLTVEEEHDLQLAHERLMTICKKCLELDVDLLI---DAEDTAIQP-AID
Oryza ---RWQQKHPATK------LPWK--VHGFPVLCVSSPLYLTAA---EP--PALEAEEERELEMAHGRLLAIGERCAEYDIPLLV---DAEYATVQP-AID
Cerevisiae ---NFSN----------------------PAYKAQ-----------R--DQLIENCSKITKEIFELNQSLLKKYPERKAPFMVSTIDAEKYDLQENGVY
Emericella ---EYL---QNQAPPSPFMDEAIKQVCDLAISRNVRLLV---DAEEQAVQP-GIE
PutA 336----RYS------------R-----------------------------------AQYDRVMEELYPRLKSLTLLARQYDIGINI---DAEEADRLEISLD


α3 β4 α4 β5 α5A α5B
Human 392-RLTLEMQRKFNVEKP---LIFNTYQCYLKDAYDNVTLDVELARREGWCFGAKLVRGAYLAQERAR-AAEIGYEDPINPTYEATNAMYHRCLDYVLEELKH
CAEEL KITIEMMKKYNKGRG---NIFNTYQAYLKGTLQNMEADMQVARREGWHFGAKLVRGAYMEQERAR-AKAIGYEDPINDNFEATSKMYESCLTRIADEVHR
Drosophila RITLEMMRKYNKDKA---IVFNTYQCYLRETFREVNTDLEQAKRQNFYFGAKLVRGAYMDQERDR-AKSLGYPDPVNPTFEATTDMYHRTLSECLRRIKL
POMBE AVTVDLMRKYNKEVA---IVHNTYQLYLKKSRKIMDDHIKKCVAEGWLMGAKLVRGAYLNSEPRF-LIHDTKAETDKDFDSAVEAIIAAAAKFAPGDPAS
Arabidopsis YMAYSSAIMFNADKDR-PIVYNTIQAYLRDAGERLHLAVQNAEKENVPMGFKLVRGAYMSSEASL-ADSLGCKSPVHDTIQDTHSCYNDCMTFLMEKASN
Tabacum YFAYSAAIKYHKDDD--PMIFGTIQAYLKDSKERMVIAKKAAEKMGVPMGFKLVRGAYMSSEREL-ASRLGVQSPIHDSIEQTHDCFNSCAEFMLDEISN
Oryza YFTFAGALAFNGGGR--PIVHGTVQAYLRDARDRLEAMARAAQGERVCLALKLVRGAYLAREARL-AASLGVPSPVHRSIQDTHDCYNGCAAFLLDRVRR
Cerevisiae ELQRILFQKFNPTSSKLISCVGTWQLYLRDSGDHILHELKLAQENGYKLGLKLVRGAYIHSEKNRNQIIFGDKTGTDENYDRIITQVVNDLIINGEDSYF
Emericella EWATMYQKYCNSRTPGRAIFYNTYQAYLCSTPATLARHLEISRKEGYTLGVKLVRGAYLKTEPRH-LIWAKKEQTDECYDGIVEALLTRRYNHMLKPASA
PutA 383-LLEKLCFEPELAGWN---GIGFVIQAYQKRCPLVIDYLIDLATRSRRRLMIRLVKGAYWDSEIKRAQMDGLEGYPVYTRKVYTDVSYLACAKKLLAVPNL
β6 α6 β7 α7 β8 α8
Human 488-N--------AKAKVMVASHNEDTVRFALRRMEELG-LHPADHR-VYFGQLLGMCDQISFPLGQ------------AGYPVYKYVPYGPVMEVLPYLSRR
CAEEL R------GKTNVSVMVASHNEDTVRFALNLMKEKC-ISPSERV-MCMAQLYGMCDQVSFSLGQ------------AGFSVYKYLPYGPVEEVLPYLSRR
Drosophila MKDCDD-DARKIGIMVASHNEDTVRFAIQQMKEIG-ISPEDKV-ICFGQLLGMCDYITFPLGQ------------AGYSAYKYIPYGPVEEVLPYLSRR
POMBE ASDPIASRKGKWGIMVASHNKKTMFESVNLAETKK--VDFTKTSFYLAQLLGMADDITYALAYS-------QRNQQPNFCIVKYVSCGPISEVLPYLVRR
Arabidopsis GSGF--------GVVLATHNADSGRLASRKASDLG-IDKQNGK-IEFAQLYGMSDALSFGLKR------------AGFNVSKYMPFGPVATAIPYLLRR
Tabacum GSG---------AVVLATHNIDSGKLAASKAIDLG-IRKDSQK-LQFAQLYGMAEGLSFGLRN------------AGFQVSKYLPFGPVEQVMPYLIRR
Oryza GAA---------AVTLATHNVESGQLAAARALELG-IGGGGDRGLQFAQLMGMADGLSLGLRN------------AGFQVSKYLPYGPVEQIIPYLIRR
Cerevisiae G----------HLVVASHNYQSQMLVTNLLKSTQ-DNSYAKSNIVLGQLLGMADNVTYDLITN----------HGAKNIIKYVPWGPPLETKDYLLRR
Emericella EHTT---ELPPVSVIVATHNRDSVRKAHALRLEQASRGEKSDVELTYAQLQGMADEISCELLQGFQTAGPENTKVAESPNVYKLLTWGSVKECMGFLLRR
PutA 480-IYP----------QFATHNAHTLAAIYQLAGQNY----YP-GQYEFQCLHGMGEPLYEQVTGKVADG------KLNRPCRIYAPVGTHETLLAYLVRR
α8
Human 565-ALENSSLMKGT--HRERQLLWLELLRRLRTGNLFHRPA-600 //
CAEEL ALENGSVLKKA--NKERDLLWKELKRRISSGEFKARSSSSS-564 //
Drosophila AQENKGVLKKI--KKEKRLLLSEIRRRLMRGQLFYKPKGNYVPI-669 //
POMBE ARENIDALDRC--KEERAYYRQALRRRIF-492 //
Arabidopsis AYENRGMMATG--AHDRQLMRMELKRRLIAGIA-499 //
Tabacum AEENRGLLSTS--AFDRQLMRKELTRRFKVATS-493 //
Oryza AEENRGLLSSS--SFDRQLLR-475 //
Cerevisiae LQENGDAVR----SDNGWPLIKAIAKSIPKRVGL-476 //
Emericella AVENTEAVGRT--KQSQEAMFSELRRRARRAFGLRY-478 //
PutA 557-LLENGANTSFVNRIADTSLPLDELVADPVTAVEKLAQQEGQTGLPHPKIPLPRDLYGHGRDNSAGLDLANEHRLASLSSALLNSALQKWQAL-648 ……

Notre alignement corrigé met ainsi en évidence la présence de domaines entremêlés chez PRODH humaine, et permet de prédire que les segments qui constituent le domaine catalytique humain sont situés dans les régions 113-150, 204-240, et 346-571. Les prédictions de structure secondaire réalisées sur la séquence humaine sont globalement en accord avec le report des éléments de structure secondaire de PutA669 sur le nouvel alignement, et notamment au niveau des brins supposés β1 (139-144) et β2 (231-233) de PRODH humaine qui sont effectivement prédits en feuillet. Cette analyse confirme ainsi l'exactitude de notre alignement comparé à l'alignement initial.

Les prédictions de structure secondaire suggèrent une structuration des 2 insertions, qui apparaissent dans le domaine catalytique, en hélice α. Sur notre alignement corrigé, ces 2 insertions sont respectivement localisées sur la séquence de PutA autour des résidus L292 pour la première, et R336 pour la seconde (Figure 3.2). De manière intéressante, ces 2 résidus appartiennent à des boucles situées sur une même surface exposée au solvant de la structure tridimensionnelle de PutA669 (Figure 3.3). Cette caractéristique structurale laisse supposer que ces 2 insertions pourraient former un domaine unique entremêlé à la périphérie du tonnelet α8β8 chez les eucaryotes supérieurs.

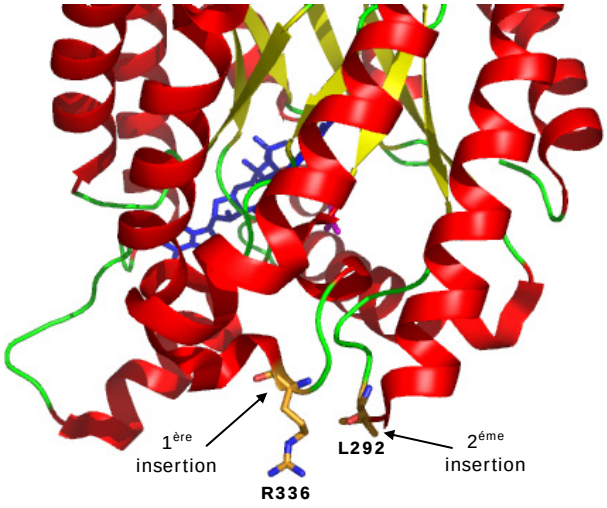


Figure 3.3 *: Mise en évidence des 2 sites d'insertion sur la structure du tonnelet α8β8 de PutA669. Les éléments de structure secondaire et les molécules de FAD et lactate sont colorés comme dans la figure précédente. Les résidus L292 et R336 sont représentés par des sticks. Les atomes d'azote sont colorés en bleu, et d'oxygène en rose.*

Outre les 2 insertions, l'alignement de la Figure 3.2 fait également apparaître une région N-terminale non conservée de la bactérie à l'homme dans l'extrémité 1-112 de PRODH humaine. Cette région, de fonction inconnue et uniquement conservée chez les

eucaryotes supérieurs, semble structurée au vu des prédictions de structure secondaire, et du nombre de résidus hydrophobes qu'elle comporte. Par conséquent, elle pourrait contenir un domaine de repliement autonome indépendant du domaine catalytique et des 2 insertions.

3) Sélection des 3 domaines à exprimer

Lorsque nous avons entrepris l'étude structurale de PRODH humaine, nous avions envisagé une stratégie qui consiste à isoler des domaines structurés de PRODH par digestion enzymatique à partir de la protéine sauvage repliée, puis à résoudre par RMN la structure de ceux dont la taille est compatible avec une telle étude. A présent, nous avons montré à partir de la connaissance de la structure de l'hétérologue bactérien PutA669 que le domaine catalytique humain est très probablement constitué d'un tonnelet α8β8 de près de 350 résidus. Nous avons également mis en évidence la présence d'un ou deux domaines entremêlés dans ce domaine catalytique (Figure 3.4). Sur la base de ces prédictions, il est clair que la caractérisation structurale du domaine catalytique humain n'est envisageable que par la résolution de structure de la large région 113-571 de PRODH humaine qui comporte le domaine catalytique et les 2 insertions. Aussi, l'étude structurale d'une telle région de 59 kDa n'est pas réalisable par RMN.

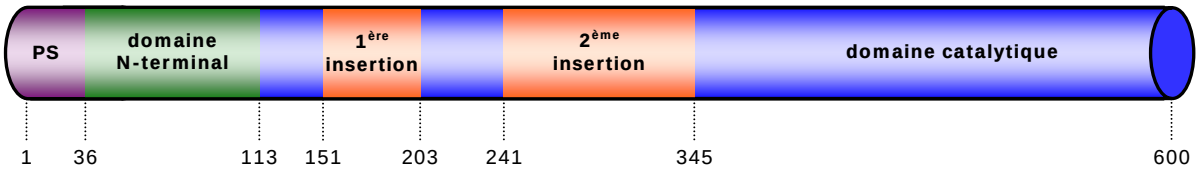


Figure 3.4 *: Prédiction des domaines potentiels de la proline déshydrogénase humaine à partir du bilan consensus de l'ensemble des analyses bio-informatiques. Le sigle PS correspond à « peptide signal ».*

La Figure 3.4 résume la prédiction des domaines potentiels de PRODH humaine réalisée à partir de l'ensemble des analyses bio-informatiques. Ces prédictions suggèrent que la proline déshydrogénase humaine comporte : un peptide signal d'adressage mitochondrial (1-36), une région N-terminale hydrophobe (37-112), et un large domaine catalytique (113-600) entremêlé avec 2 insertions de respectivement 52 et 104 résidus (151-203 et 241-345). Sur la base de cette analyse bio-informatique, nous avons décidé de modifier notre stratégie d'étude structurale initialement définie, et de sélectionner 3 domaines de PRODH humaine à

exprimer. En effet, au-delà du domaine catalytique, il serait intéressant de connaître les rôles structural et fonctionnel de la région N-terminale hydrophobe et de chacune des 2 insertions. Cependant, la résolution de structure du domaine catalytique n'en demeure pas moins un de nos objectifs dans l'optique de caractériser son mode d'action chez les organismes eucaryotes. C'est pourquoi, nous avons sélectionné 3 régions de PRODH humaine afin de les soumettre au programme de production de protéines du LMP. Ces 3 domaines protéiques sont les suivants :

- **PROcatal** (59 kDa) : région **115-600** de PRODH qui comporte le domaine catalytique prédit et les 2 insertions potentielles.

- **PROinser** (16 kDa) : région **239-353** de PRODH qui correspond à la seconde insertion.

- **PROter** (13 kDa) : région **39-125** de PRODH qui comporte le domaine N-terminal potentiel délestée du peptide signal.

La délimitation de ces 3 régions a été réalisée en utilisant les diagrammes de prédiction de structure secondaire, et de visualisation des amas de résidus hydrophobes (analyse HCA). Pour chaque domaine, la démarche a consisté à choisir le premier et le dernier résidu situés entre 2 éléments de structure secondaire prédits, et d'éviter que ces résidus soient hydrophobes, afin de limiter le risque d'agrégation lors de la surexpression chez *E. coli*. D'autre part, ayant conscience que la sélection de domaines à partir d'une analyse bio-informatique présente un caractère spéculatif, nous avons également entrepris de produire la forme mature de PRODH dans le cadre du programme de la plate-forme du LMP. Le choix du premier résidu de ce domaine a également été guidé en se basant sur le diagramme HCA et les prédictions de structure secondaire. Cette construction est nommée :

- **PROentier** (68 kDa) : région **39-600** de PRODH qui correspond à la protéine entière délestée du peptide signal potentiel.

Dans le cas où ces 4 protéines seraient exprimées sous forme soluble, les domaines de faible masse moléculaire PROinser et PROter seraient étudiés en solution par RMN, alors que les protéines PROcatal et PROentier, de poids moléculaire supérieur ou égal à 59 kDa, seraient plutôt destinées à une étude de croissance cristalline dans l'optique de résoudre la structure par radiocristallographie. Il serait également possible d'entreprendre une digestion enzymatique des protéines PROcatal et PROentier repliées afin d'isoler des domaines structuraux de faible taille qui pourraient alors être étudiés par RMN.

4) Matériels et Méthodes

4.1) Recherche d'homologie de séquence

Les recherches d'homologie de séquence protéique de PRODH ont été menées avec les logiciels BLAST et PSI-BLAST sur le serveur du NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) à partir des bases de données suivantes :

Genbank (NCBI) :	http://www.psc.edu/general/software/packages/genbank/genbank.html
RefSeq (NCBI) :	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/
SwissProt :	http://www.ebi.ac.uk/swissprot/
PDB :	http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do
PIR :	http://pir.georgetown.edu/
PRF :	http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?prf

4.2) Alignements de séquence et prédictions structurales

L'alignement des séquences protéiques, le calcul de quelques paramètres intrinsèques aux protéines, et les prédictions de structure secondaire et tertiaire nécessitent l'utilisation de différents logiciels d'analyse de séquence primaire. De nombreux programmes sont disponibles gratuitement sur Internet. Parmi ceux-ci, nous avons utilisé :

● Clustalw (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html) :
Logiciel d'alignement de séquences protéiques. La version du Pôle Bio-Informatique Lyonnais permet de visualiser facilement les résidus conservés grâce à un code couleur.

● Consensus Secondary Structure Prediction du Pôle Bio-Informatique Lyonnais (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sspred.html) :
Logiciel de prédiction de structure secondaire qui établit un consensus à partir de l'analyse de la structure primaire par plusieurs algorithmes (Predator, HNN, GorIV…).

● HCA (http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn_lg=fr&chzn_rsrc=HCA) :
Logiciel de visualisation des amas de résidus hydrophobes sur une séquence primaire. Ce programme permet notamment de distinguer les régions structurées des régions déstructurées.

● 3D-PSSM (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dpssm/) :
Logiciel de prédiction du repliement du squelette d'un polypeptide à partir de la structure de protéines dont la séquence présente plus de 25 % d'homologie avec la protéine d'intérêt.

CHAPITRE 4

Expression de 4 protéines PRODH dans le cadre d’un programme de production

L'expression des protéines PRODH sauvage et mature chez *E. coli* conduisant à l'unique formation de corps d'inclusion, nous avons modifié notre stratégie d'étude structurale initialement définie. Sur la base de nouvelles données apparues dans la littérature, nous avons sélectionné 3 domaines PRODH humains (PROcatal, PROter, et PROinser) à partir d'une étude bio-informatique. L'expression sous forme soluble constituant l'étape limitante de la stratégie, nous avons choisi de produire ces 3 domaines, ainsi que la forme mature de PRODH (rebaptisée PROentier), dans le cadre du programme de production 3PM du LMP du CEA de Saclay, dédié à la surexpression de protéines solubles chez *E. coli*. Avant de présenter les résultats de ce travail qui a été mené sous la direction des Dr. Sandrine Braud et Muriel Gondry, la stratégie de production des 4 protéines PRODH dans le cadre d'une telle structure sera exposée.

1) Stratégie de production des 4 protéines PRODH

1.1) Stratégie générale

Parmi les différents hôtes d'expression disponibles, la bactérie *Escherichia coli* est généralement choisie pour sa facilité d'utilisation, sa croissance rapide, sa génétique simple, son faible coût de production, et ses taux d'expression élevés. De plus, dans l'optique d'une caractérisation par RMN, il existe des milieux enrichis en isotopes ^{15}N et ^{13}C qui permettent de produire des protéines marquées avec des taux d'expression tout aussi élevés. Cependant, l'expression chez *E. coli* présente des inconvénients majeurs, comme l'absence de modifications post-traductionnelles, l'instabilité des ARNm, et la différence d'usage de codons avec les espèces eucaryotes. Ces inconvénients peuvent compromettre la qualité de l'expression en favorisant l'apparition de corps d'inclusion, comme nous l'avons constaté avec les protéines PRODH sauvage et mature.

Au cours de ces dernières années, il a été montré que la formation de corps d'inclusion, inhérente à l'utilisation de l'hôte bactérien *E. coli*, peut être limitée en exprimant les gènes d'intérêt en fusion avec un partenaire protéique fortement soluble (Kapust & Waugh, 1999). Les mécanismes avec lesquels ces partenaires favorisent le repliement des protéines d'intérêt sont à ce jour encore peu connus. Aussi, une récente étude comparative des 7 partenaires décrits comme les plus efficaces a mis en évidence qu'il n'existe aucune « règle

universelle » permettant de prévoir l'effet d'un partenaire de fusion sur la solubilité d'une protéine (Hammarström et al., 2002). En d'autres termes, certains partenaires qui se montrent très efficaces pour certaines protéines, se révèlent médiocres pour d'autres. Par conséquent, le criblage du plus grand nombre d'entre eux semble être la méthode qui offre le plus de chance d'obtenir une protéine de fusion exprimée sous forme soluble (Vincentelli et al., 2003).

Outre le partenaire de fusion, d'autres paramètres comme la souche bactérienne d'*E. coli* peuvent influencer l'expression et la solubilité des protéines recombinantes. Les grandes avancées dans le domaine du génie génétique, observées au cours de ces dernières années, ont abouti à l'émergence de nouvelles souches qui présentent des caractéristiques intéressantes dans l'optique de produire des protéines hétérogènes eucaryotes (stabilité accrue des ARNm, présence d'ARNt correspondant à des codons rares chez *E. coli*, surproduction de membranes, etc.) (Lopez et al., 1999 ; Jonasson et al., 2002).

Sur la base de ces études récentes, il nous est apparu intéressant d'intégrer une structure qui permette de tester l'expression des 4 protéines PRODH en fusion avec différents partenaires et dans plusieurs souches bactériennes. C'est pourquoi, nous avons entrepris de produire ces 4 protéines dans le cadre du Programme de Production et Marquage des Protéines 3PM du LMP (Braud et al., 2005). Pour pallier la formation des corps d'inclusion, la plate-forme 3PM propose un criblage systématique de plusieurs conditions expérimentales (7 partenaires de fusion, 3 souches d'expression, et 2 températures d'expression) afin de déterminer les meilleures conditions d'expression relatives à chaque protéine testée. Cependant, le criblage d'un grand nombre de conditions ne peut être réalisé dans un temps raisonnable sans recourir à une miniaturisation et un traitement en parallèle des échantillons. Par conséquent, le processus d'expression des protéines se déroule en 2 étapes distinctes :

- Une première étape de criblage des conditions d'expression réalisée à petite échelle sur microplaques en volume de 250 µL.

- Puis, une fois les meilleures conditions d'expression de protéine soluble déterminées, une production à grande échelle pour obtenir les protéines en quantité appréciable.

Outre la possibilité de tester un grand nombre de conditions, ce processus d'expression offre également l'avantage de pouvoir produire plusieurs domaines simultanément, ce qui est difficilement réalisable avec des techniques d'expression classiques. La stratégie de

production de protéines solubles dans le cadre du programme 3PM peut se décomposer en trois principales phases que je vais brièvement présenter dans les prochains paragraphes.

1.2) Stratégie de construction des vecteurs d'expression

La production de protéines en fusion avec de multiples partenaires nécessite la réalisation de nombreux plasmides. Aussi, il est indispensable de recourir à une méthodologie permettant de minimiser l'effort de clonage. Dans cette optique, l'utilisation d'un système de clonage par recombinaison homologue a été choisie : il s'agit de la technologie *Gateway*. La stratégie consiste dans un premier temps à cloner le gène d'intérêt à partir d'amplicons de PCR dans un plasmide appelé *vecteur d'entrée* (Figure 4.1). Le système *Gateway* permet alors, à partir de ce seul plasmide, d'obtenir *in vitro* et en parallèle, une multitude de *vecteurs d'expression* portants chacun le gène d'intérêt et un partenaire de fusion différent. Tout l'intérêt de cette technique de recombinaison homologue repose sur la rapidité et l'efficacité avec lesquelles sont construits les *vecteurs d'expression*.

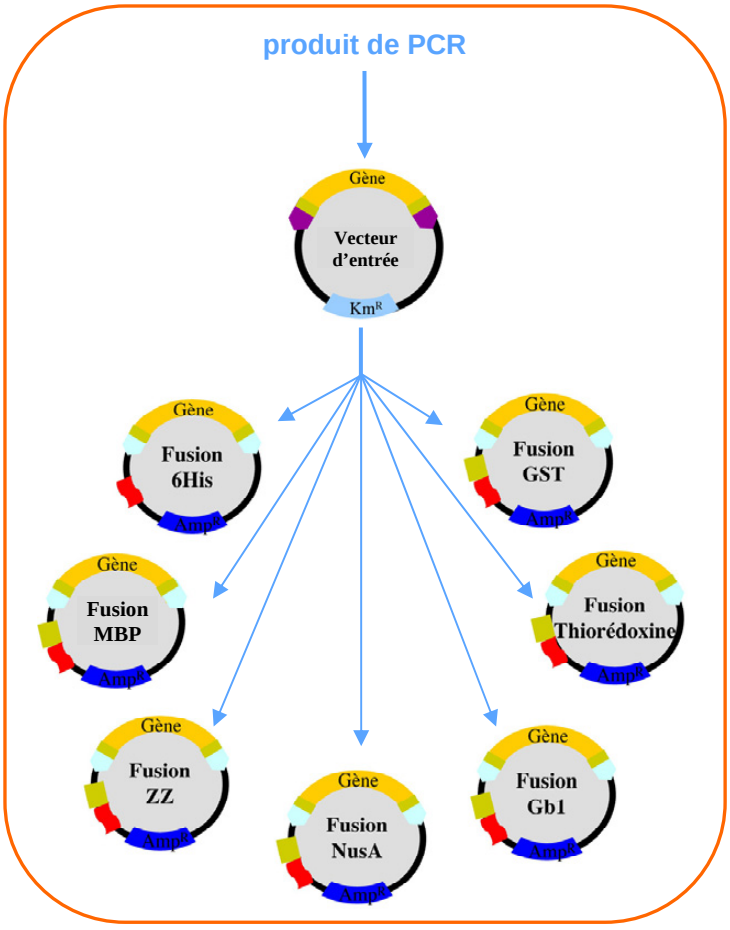


***Figure 4.1** : Stratégie de clonage par recombinaison homologue du programme 3PM.*

1.3) Criblage des conditions d'expression en microplaques

Le programme 3PM doit permettre l'analyse de l'influence de conditions expérimentales sur l'expression et la solubilité de protéines de fusion recombinantes. Au vu du nombre de conditions choisies, les techniques d'expression habituelles ne sont pas adaptées, et constituent un facteur limitant. Ainsi, à l'exception de l'analyse sur gel SDS-PAGE, toutes les étapes relatives au criblage des conditions d'expression, à savoir la transformation de *E. coli*, la culture d'expression, la lyse des bactéries, et la séparation des fractions soluble et insoluble, sont traitées sur microplaques 96 puits *via* l'utilisation de pipettes multicanaux. Outre le traitement plus facile d'échantillons en parallèle, l'utilisation de microplaques 96 puits permet de diminuer les volumes de culture (250µL), de réactifs utilisés, et de rendre possible une automatisation partielle du processus.

1.3.1) Les partenaires de fusion

Sur la base de l'étude comparative récente des 7 partenaires décrits comme les plus efficaces (Hammarström et al., 2002), il a été décidé que les séquences protéiques de l'étiquette 6xHis et des six partenaires suivants seront systématiquement utilisées pour être fusionnées en N-terminal avec les protéines d'intérêt. Il s'agit de :

- **GST** (26 kDa) : glutathion-S-transférase de *Schistosoma japonicum*
- **Gb1** (7,5 kDa) : domaine de liaison aux anticorps de la protéine G de *Streptococcus*
- **ZZ** (17 kDa) : double domaine de liaison aux anticorps de la protéine A de *Staphylococcus*
- **MBP** (43 kDa) : protéine de fixation au maltose de *E. coli*
- **Trx** (13 kDa) : thiorédoxine de *E. coli*
- **NusA** (55 kDa) : protéine de *E. coli*

1.3.2) Les souches bactériennes

Les souches d'expression utilisées dans le cadre du programme 3PM dérivent de la souche BL21 déficiente en protéases *lon* et *ompT*. Elles possèdent une copie chromosomique du gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle d'un promoteur *lac* inductible par l'IPTG (désignation DE3). Elles sont destinées à la surexpression des *plasmides d'expression* dont la transcription est contrôlée par un promoteur de type T7 inductible par cette polymérase. La production des protéines de fusion est testée dans les 3 souches suivantes :

- **BL21 STAR** (DE3) : cette souche possède un gène *rne* mutant qui code pour une RNase E tronquée incapable de dégrader les ARNm, d'où une augmentation de stabilité de ces derniers.

- **ROSETTA pLysS** (DE3) : la souche Rosetta est désignée pour augmenter l'expression de protéines recombinantes d'origine eucaryote dont les gènes correspondant contiennent des codons rarement utilisés chez *E. coli*. Cette souche contient ainsi un plasmide fournissant les ARNt correspondant à 6 codons rares (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA). La souche pLysS exprime le lysozyme T7, qui inhibe l'activité basale de l'ARN polymérase T7, optimisant de ce fait la régulation du niveau d'expression. La sélection spécifique de cette souche est possible en ajoutant du chloramphénicol dans les milieux de culture.

- **C41** (DE3) : recommandée pour l'étude de protéines toxiques, cette souche comporte une ou plusieurs mutation(s) de gène(s) inconnue(s) conduisant à la surproduction de membranes.

1.3.3) Les températures d'expression

D'autres paramètres, comme la température de la culture d'expression, peuvent influencer et améliorer la solubilité des protéines recombinantes. Ainsi, une diminution de la température conduit à une réduction des taux d'expression. La diminution de ces niveaux d'expression permet d'une part, de limiter les interactions hydrophobes intermoléculaires qui provoquent l'agrégation, et d'autre part, d'éviter de saturer les systèmes d'assistance au repliement formés par les protéines chaperonnes de *E. coli*. Pour des raisons pratiques, et afin de limiter le nombre de conditions, il a été décidé de tester l'expression des protéines de fusion aux 2 températures suivantes :

37°C et **20°C**

1.4) Production à grande échelle et obtention de la protéine d'intérêt

Une fois les meilleures conditions déterminées pour chaque protéine d'intérêt, la troisième phase du programme 3PM consiste dans un premier temps à valider ces conditions dans le cadre d'une production à grande échelle, et ainsi produire les quantités de protéine désirées (Figure 4.2).

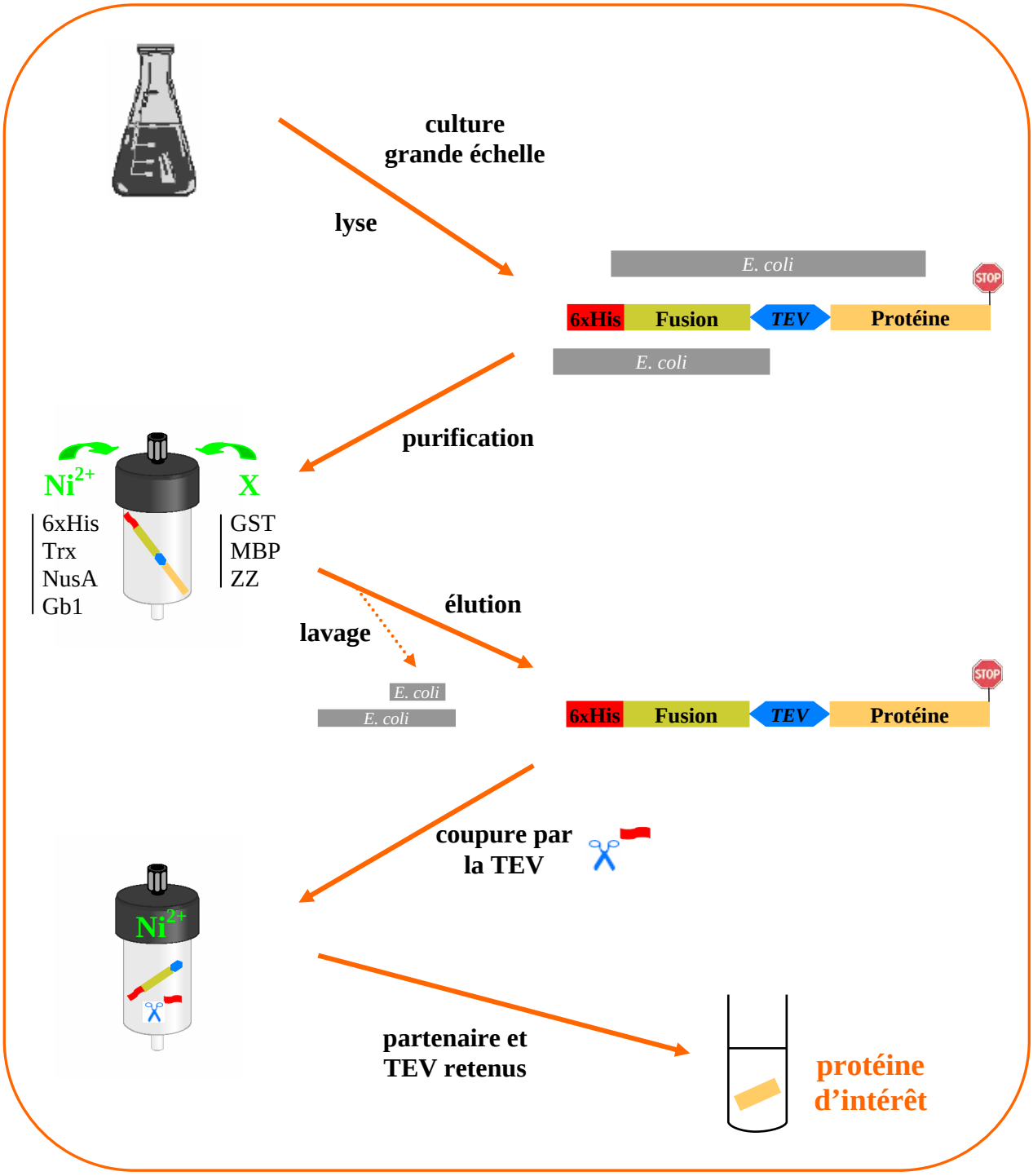


Figure 4.2 *: Stratégie de production à grande échelle et d'obtention de la protéine d'intérêt*

Toutes les protéines de fusion sont marquées en N-terminal par une étiquette 6xHis, ce qui permet potentiellement de les purifier par chromatographie de pseudo affinité IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity*) sur colonne à nickel. Le principe de ce type de chromatographie repose sur les interactions ioniques qui se forment entre les ions nickel et plusieurs noyaux imidazoles de résidus histidines. L'élution de la protéine hétérologue est

réalisée par un mécanisme compétitif en ajoutant des quantités croissantes d'imidazole. Cependant, il existe des résines qui présentent une affinité plus spécifique pour certains partenaires de fusion. C'est le cas de la résine de glutathion pour GST, de la résine d'amylose pour MBP, et de la résine d'anticorps IgG pour ZZ. Ces résines sont utilisées préférentiellement pour purifier les protéines hétérologues fusionnées avec l'un de ces partenaires. Dans le cas de la résine d'amylose, qui a été choisie pour purifier plusieurs domaines PRODH, l'élution est également menée par compétition en introduisant du maltose, qui est le ligand naturel de la MBP (*Maltose Binding Protein*).

Si l'incorporation d'un partenaire de fusion peut améliorer la solubilité de la protéine associée, celui-ci représente cependant une gêne, notamment dans le cas d'études structurales. C'est pourquoi, le système génétique utilisé permet la production de protéines recombinantes, qui possèdent une séquence de reconnaissance de la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*), insérée entre la protéine d'intérêt et le partenaire de fusion. L'action de la TEV conduit à l'élimination de tous les acides aminés relatifs au partenaire de fusion et au site de reconnaissance de la protéase, à l'exception d'une glycine qui devient alors le premier résidu N-terminal de la protéine cible. Cette étape peut intervenir en solution, après purification de la protéine hétérologue, ou bien « sur colonne », c'est-à-dire lorsque la protéine est accrochée à la résine de la colonne d'affinité.

Après clivage du partenaire de fusion, la protéine d'intérêt est finalement isolée après un nouveau passage sur résine de nickel. Cette deuxième étape de purification permet de retenir toutes les protéines qui possèdent une étiquette 6xHis comme notamment la protéine de fusion résiduelle, le partenaire de fusion clivé, et également la protéase TEV qui comporte une étiquette 6xHis à son extrémité N-terminale. La protéine d'intérêt ne possédant plus de séquence 6xHis après coupure enzymatique, elle ne doit donc pas accrocher la résine de nickel, et peut ainsi être séparée de son partenaire.

Le succès du criblage des conditions en microplaques, certes prédispose, mais ne garantit en aucun cas la réussite de la production en grand volume. En effet, il va falloir vérifier si le changement d'échelle induit une modification des profils d'expression et de solubilité des protéines hétérologues. D'autre part, une fois le partenaire de fusion clivé par coupure enzymatique, le comportement en terme de solubilité de la protéine d'intérêt n'est

pas prévisible car c'est un phénomène qui dépend de sa nature intrinsèque. Par conséquent, cette opération constitue véritablement l'étape critique de la stratégie.

2) Production des 4 domaines PRODH

2.1) Bilan du criblage des conditions d'expression en microplaques

Chacun des gènes encodant les protéines PROentier, PROcatal, PROter, et PROinser a été cloné dans 7 plasmides d'expression différents par recombinaison homologue. Les domaines PROcatal et PROentier ont été exprimés dans 28 conditions expérimentales différentes (7 partenaires de fusion, 2 souches d'expression, et 2 températures), contre 42 conditions pour les domaines PROter et PROinser (7 partenaires, 3 souches, et 2 températures). Au total, 140 cultures ont été réalisées. Pour chacune d'elles, les fractions contenant les protéines solubles et insolubles ont été déposées sur gel SDS-PAGE. L'analyse de l'expression des protéines de fusion à partir de l'interprétation des profils électrophorétiques des gels SDS-PAGE a été reportée, domaine par domaine, dans un tableau récapitulatif afin de déterminer les meilleures conditions d'expression et de solubilité pour chacune des 4 protéines.

Par souci de rendre fluide la lecture de ce manuscrit, je me contenterai de présenter dans ce paragraphe un bilan du criblage des conditions d'expression des 4 protéines PRODH en microplaques. Le détail des résultats, à savoir l'ensemble des gels SDS-PAGE et leur analyse, est présenté en annexe. Les matériels et méthodes, spécifiques au clonage et au criblage des conditions d'expression des 4 protéines PRODH dans le cadre du programme 3PM, sont également reportés en annexe.

De manière générale, les résultats du criblage des conditions d'expression montrent que la nature du partenaire de fusion est essentielle sur l'expression et la solubilité des protéines hétérologues PRODH. Ainsi, seuls les partenaires MBP et NusA permettent d'obtenir des taux suffisants de protéine soluble, contrairement aux autres partenaires, et notamment à l'étiquette 6xHis, qui conduisent à la formation quasiment exclusive de corps d'inclusion. Si la souche bactérienne et la température d'expression ne semblent pas influencer de manière directe la solubilité des protéines hétérologues PRODH, les criblages

de ces deux paramètres n'ont pas été pour autant inutiles. En effet, nous avons constaté que l'expression des domaines PRODH, en fusion avec les meilleurs partenaires, et en souche Rosetta cultivée à 20°C, permet dans la plupart des cas d'augmenter de manière significative les niveaux d'expression de protéine soluble.

Le criblage des conditions d'expression en microplaques du programme 3PM a donc rempli son objectif. En effet, après avoir testé en moyenne près d'une trentaine de conditions par domaine PRODH, nous avons pu déterminer, pour chaque domaine, au moins une condition qui permette une expression suffisante de protéines de fusion solubles (Tableau 4.1). Cependant, cette première étape a également mis en évidence le caractère toxique du domaine PROter qui laisse présager la rencontre de difficultés lors de sa production à grande échelle.

domaine	*partenaire de fusion*	*Souche d'expression*	*Température d'expression*
PROcatal	MBP	**Rosetta**	**20°C**
PROentier	MBP		
PROter	NusA		
PROinser	MBP		

***Tableau 4.1** : Récapitulatif de la meilleure condition d'expression obtenue pour chaque domaine PRODH à l'issu du criblage en microplaques.*

2.2) Production, purification, et obtention des protéines d'intérêt

Le détail des matériels et méthodes relatifs à la production à grande échelle, à la purification, et à l'obtention finale des 4 domaines PRODH figure en fin de ce chapitre dans le paragraphe 3.

2.2.1) Obtention du domaine PROcatal

La transposition des meilleures conditions d'expression de PROcatal à grande échelle a été entreprise en fernbach contenant 1 litre de culture. Les souches Rosetta ont été transformées par le *vecteur d'expression* encodant la protéine PROcatal fusionnée au partenaire MBP, puis mises en préculture afin d'ensemencer la culture de 1 litre. L'expression de la protéine hétérologue a été induite à une DO_{600} de 1.2 par ajout de 1 mM d'IPTG, puis maintenue pendant 14 heures à 20°C sous agitation. Les culots bactériens ont été lysés dans

un tampon Tris-HCl à pH 8.0, et les fractions contenant les protéines solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation.

Comme le montre le Tableau 4.2, les résultats de la transposition à grande échelle en fernbach sont tout à fait satisfaisants : le taux de protéine hétérologue PROcatal obtenu dans la fraction soluble est similaire, voire légèrement supérieur, à celui obtenu en microplaques.

PROcatal	Microplaque (250 µL)		Fernbach (1 L)	
MBP/Rosetta/20°C	S ++(+)	I ++	S +++	I +++

***Tableau 4.2** : Résultats de la transposition à grande échelle des meilleures conditions d'expression PROcatal. Après dépôt des fractions soluble (S) et insoluble (I) sur gel SDS-PAGE, chaque bande de surexpression est analysée, et une valeur semi-quantitative est associée à son intensité, de faible (+) à très forte (++++). Les fractions se confondant aux protéines endogènes de E. coli et constituant un doute, sont associées au sigle +/-. La légende de ce tableau s'applique également pour les résultats de la transposition des autres protéines PRODH (cf. Tableaux 4.3, 4.4, et 4.5).*

Sur la base de cette transposition très favorable, la purification de la protéine de fusion PROcatal a pu être entreprise. Celle-ci a été menée par chromatographie d'affinité sur résine d'amylose *Amylose Resin* (Biolabs) spécifique au partenaire MBP. La moitié du volume de surnageant de cassage, provenant de 500 mL de culture, a été chargée dans la résine d'amylose. Après rinçage, l'élution a été menée en introduisant un tampon contenant 10 mM de maltose. L'ensemble des fractions recueillies ont été déposées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, et les fractions d'élution ont été quantifiées par mesure de l'absorbance à 280 nm sur un spectromètre UV.

L'analyse SDS-PAGE de la fraction principale d'élution fait apparaître une bande majoritaire dont la masse apparente correspond à celle de la protéine de fusion MBP-PROcatal (Figure 4.3A). La quantité de protéine recombinante présente dans cette fraction est estimée à environ 29 mg, ce qui correspond à une production de près de 60 mg par litre de culture. Cependant, nous avons remarqué la présence de précipités troubles dans les différentes fractions lors de l'élution de la protéine. L'analyse SDS-PAGE de la fraction principale, après centrifugation et reprise du culot insoluble par du SDS, révèle en effet qu'une partie de la protéine hétérologue s'est agrégée (Figure 4.3B).

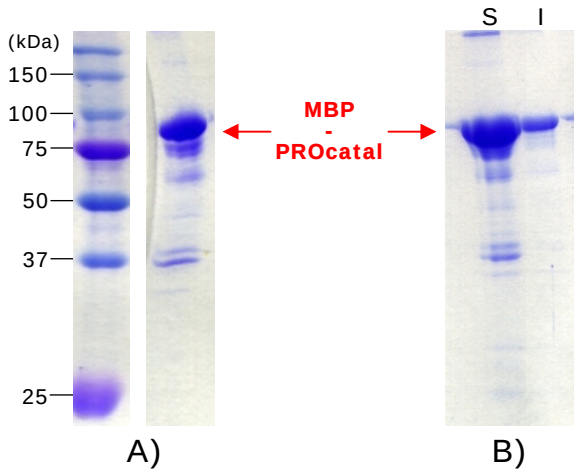


Figure 4.3 *: Purification de la protéine de fusion MBP-PROcatal (99 kDa) sur résine d'amylose. A) Analyse SDS-PAGE de la fraction principale d'élution. B) Mise en évidence de l'agrégation partielle de MBP-PROcatal : analyse SDS-PAGE des fractions soluble (S) et insoluble (I) après centrifugation de la fraction principale d'élution.*

Nous avons mené une étude de stabilité à 4°C sur plusieurs jours qui montre que la protéine de fusion MBP-PROcatal présente une propension lente à l'agrégation. En effet, alors que la fraction principale de protéine purifiée contient 29 mg de protéine soluble en sortie de purification, elle n'en contient plus que 23 mg au bout de 24 heures, et 18 mg au bout de 48 heures. D'autre part, la conservation de la protéine à -80°C, après congélation dans l'azote liquide, n'est pas recommandée car elle provoque une agrégation drastique à la décongélation. La stabilité de la protéine de fusion a également été testée sur plusieurs gammes de concentration. La dilution des échantillons au 1/2, au 1/5, ou au 1/10 avec du tampon d'équilibration (NaCl 200 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) n'induit aucune modification du profil de stabilité, ce qui suggère que la propension à l'agrégation n'est pas dépendante de la concentration. Dans certains cas, ce type de comportement peut être observé lorsqu'une protéine est mise en solution avec un tampon non adapté qui provoque son agrégation lente. Nous avons donc testé la solubilité de la protéine MBP-PROcatal avec 9 solutions tampons différentes : phosphate de sodium, hepès, MES, acetate de sodium, phosphate de potassium, acétate d'ammonium, citrate, imidazole, et Tris-HCl (étude non présentée). Aucun de ces tampons ne permet de ralentir le phénomène d'agrégation de la protéine de fusion. D'autre part, l'oxydation de cystéines libres favorise la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaires non natifs qui peuvent conduire à l'agrégation. Le domaine PROcatal possédant 8 cystéines, nous avons ajouté différents réducteurs dans les surnageants de lyse et dans les fractions d'élution : DTT, β-mercapto-éthanol, et TCEP. L'ajout de ces réducteurs n'a aucune influence sur le profil de stabilité de la protéine de

fusion. Au vu de l'ensemble des résultats de ces tests, il semble donc que cette propension à l'agrégation soit intrinsèque à la protéine hétérologue MBP-PROcatal.

En parallèle de ces études de stabilité, nous avons entrepris de cliver le partenaire de fusion MBP par coupure enzymatique avec la protéase TEV. Cette opération a été réalisée en solution en ajoutant 640 µg de protéase à un échantillon contenant 9 mg de protéine de fusion. Après une incubation à 4°C sous agitation pendant 14 heures, l'échantillon a été centrifugé et la fraction insoluble a été reprise avec du SDS. Comme le montre le gel SDS-PAGE de la Figure 4.4, le clivage de la protéine de fusion par la TEV n'a pas accentué le phénomène d'agrégation. Trois bandes de forte intensité dont les masses apparentes correspondent à celles de MBP-PROcatal, MBP, et PROcatal, apparaissent dans la fraction soluble sur le gel d'acrylamide. La coupure en solution est donc partielle, et le rendement peut être estimé à plus de 60% en comparant les intensités de ces 3 bandes protéiques.

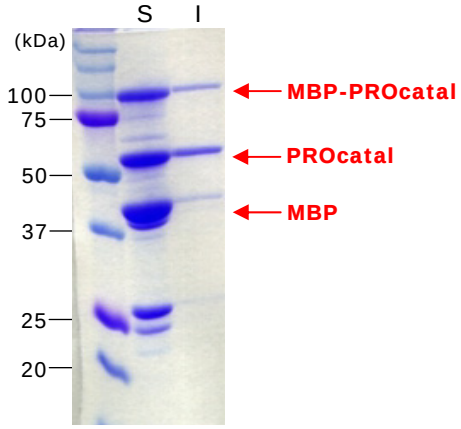


Figure 4.4 *: Clivage du partenaire de fusion de MBP-PROcatal (99 kDa). Analyse de la solution de clivage par la TEV après centrifugation. Mise en évidence des bandes protéiques de MBP-PROcatal, PROcatal (59 kDa), et MBP (43 kDa).*

Sur la base de ce bon résultat, nous avons envisagé de séparer le partenaire de fusion de la protéine d'intérêt par chromatographie de pseudo affinité sur résine de nickel *HisTrap HP* (Amersham). La solution de clivage, issue de la réaction de coupure enzymatique par la TEV de 9 mg de protéine de fusion, a été intégralement chargée sur une colonne *HisTrap HP*. Après lavage de la résine avec un tampon contenant 20 mM d'imidazole, l'élution a été réalisée avec un gradient linéaire en imidazole de 20 mM à 300 mM. Les fractions récoltées ont été analysées sur gel SDS-PAGE (Figure 4.5), et la concentration d'imidazole dans les fractions d'élution a été vérifiée par mesure de l'absorbance à 300 nm sur un spectromètre UV.

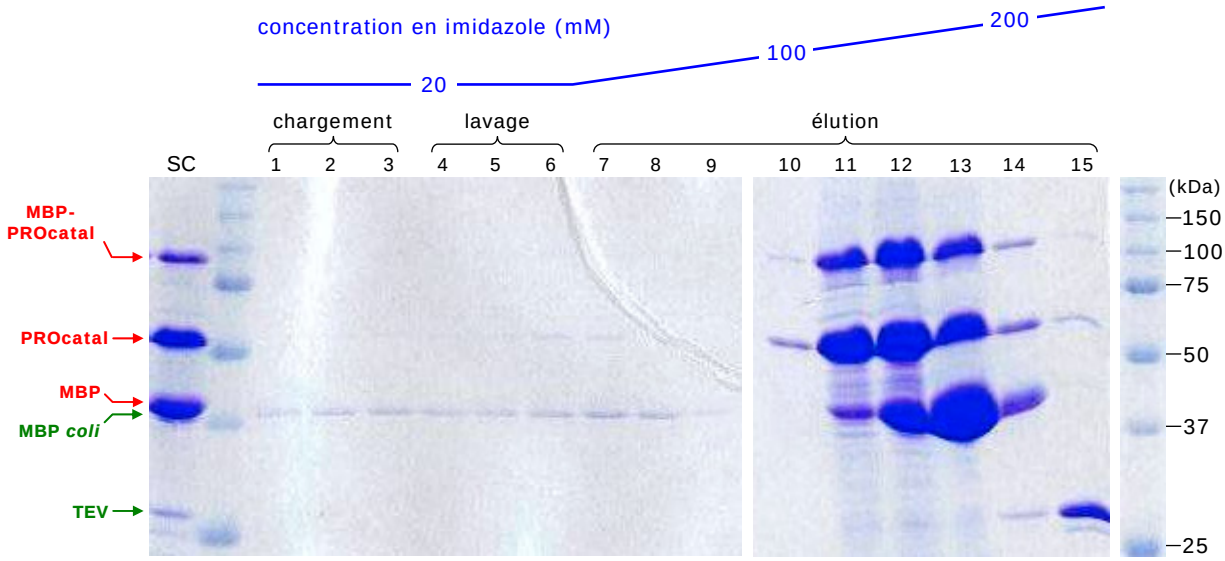


***Figure 4.5** : Suivi par SDS-PAGE de la purification de PROcatal sur résine de nickel. Analyse des fractions de chargement, de lavage, d'élution, et de la solution de clivage (SC). Les protéines MBP-PROcatal (99 kDa), MBP clivée (43 kDa), et PROcatal (59 kDa) sont mises en évidence par des flèches rouges, et la protéase TEV (27 kDa) et la MBP endogène à E. coli (40 kDa) par des flèches vertes.*

L'analyse SDS-PAGE met en évidence une bande protéique, dont la masse apparente est très proche de celle du partenaire MBP clivé, dans les fractions contenant les protéines non retenues (fractions 1 à 9). Cette bande correspond à la MBP endogène de *E. coli*, qui ne possède pas d'étiquette 6xHis, et qui s'est concentrée sur la résine d'amylose lors de la première étape de purification. La faible différence de poids moléculaire entre les deux formes de MBP est suffisante pour les différencier sur les gels d'acrylamide (respectivement 43 kDa pour le partenaire clivé, et 40 kDa pour la protéine endogène).

De manière inattendue, le profil d'élution de PROcatal, qui ne possède pas d'étiquette 6xHis, est similaire à celui de MBP-PROcatal et MBP clivée qui en comportent une. Ainsi, ces trois protéines fixent la résine de nickel jusqu'à des concentrations d'imidazole de l'ordre de 100 mM. La chromatographie de pseudo affinité IMAC est une technique de purification peu spécifique. Ainsi, il est communément observé que certaines protéines, qui présentent à leur surface un amas de plusieurs résidus histidine, sont capables de fixer la résine de nickel de manière non spécifique à des concentrations d'imidazole relativement faibles. PROcatal est un domaine de 486 résidus qui comporte 14 résidus histidine dispersés dans la séquence primaire ; il est donc tout à fait possible qu'il interagisse de manière non spécifique avec les ions nickel. Cependant, ce type d'interaction ne suffit pas pour accrocher la résine jusqu'à des

concentrations d'imidazole de l'ordre de 100 mM. Par conséquent, nous proposons une autre hypothèse expliquant le profil d'élution de PROcatal.

En effet, les gels d'acrylamide de la Figure 4.5 montrent que la présence de la protéine d'intérêt PROcatal dans les différentes fractions est toujours accompagnée du partenaire de fusion clivé MBP, ou de la protéine de fusion résiduelle MBP-PROcatal (fractions 10 à 15). Ceci suggère que l'élution de PROcatal, à des concentrations d'imidazole de l'ordre de 100 mM, puisse être due à un effet d'entraînement de grande envergure, qui s'expliquerait par l'existence de fortes interactions entre PROcatal et MBP. Ce type d'interactions de fortes intensités, entre la protéine d'intérêt et son partenaire de fusion après clivage par la TEV, suggère un repliement incorrect ou instable du domaine PROcatal, qui pourrait expliquer la propension à l'agrégation de la protéine de fusion. De manière intéressante, ce type de comportement a déjà été rencontré au LMP avec d'autres protéines dont la séparation de leur partenaire de fusion, pourtant clivé, n'a jamais été obtenue.

Dans l'optique de vérifier notre hypothèse, nous avons envisagé de séparer le partenaire de fusion MBP de la protéine PROcatal sur résine d'amylose dont l'affinité est beaucoup plus spécifique. Cependant, lorsque nous avons préparé cette opération 48 heures après la purification sur résine de nickel, nous avons constaté que plus de 80% de la protéine PROcatal s'était agrégée dans les fractions d'élution.

2.2.2) Obtention du domaine PROinser

Les meilleures conditions d'expression de PROinser obtenues à l'issu du criblage en microplaques sont identiques à celles obtenues pour PROcatal (MBP, Rosetta, 20°C). Par conséquent, nous avons eu recours aux mêmes stratégies et méthodologies pour produire, purifier, et isoler la protéine d'intérêt PROinser. Comme le montre le tableau 4.3, l'expression de la protéine de fusion MBP-PROinser, en fernbach contenant 1 L de culture, conduit à un taux de protéine soluble tout à fait comparable à celui obtenu en microplaques. Sa purification est donc envisageable.

PROinser	Microplaque (250 µL)		Fernbach (1 L)	
MBP/Rosetta/20°C	S ++(+)	I +	S ++	I +(+)

***Tableau 4.3** : Résultats de la transposition à grande échelle des meilleures conditions d'expression PROinser.*

La moitié du volume de surnageant de lyse, provenant de 500 mL de culture, a été déposé sur résine d'amylose. L'analyse SDS-PAGE des différentes fractions, après élution par un tampon maltose, met en évidence une bande majoritaire dans la fraction principale dont la masse apparente correspond bien au poids moléculaire de MBP-PROinser (56 kDa) (Figure 4.6A). Le rendement de l'expression de la protéine de fusion, obtenu à l'issu de cette première étape de purification, est d'environ 30 mg de protéine par litre de culture, ce qui est tout à fait satisfaisant. Cependant, nous avons également constaté que la protéine MBP-PROinser présente une tendance à l'agrégation comparable à celle de MBP-PROcatal. En effet, l'analyse SDS-PAGE de la fraction principale, après 24 heures d'incubation à 4°C, montre qu'une fraction importante de la protéine s'est agrégée (Figure 4.6B). Une étude de stabilité, identique à celle décrite précédemment, a donc été entreprise dans l'optique d'améliorer la solubilité de la protéine hétérologue. Les résultats de cette étude indiquent que MBP-PROinser présente une propension lente à l'agrégation quels que soient les paramètres expérimentaux testés (concentration, solution tampon, réducteur). Ainsi, aucune condition permettant de ralentir ce phénomène d'agrégation n'a été déterminée.

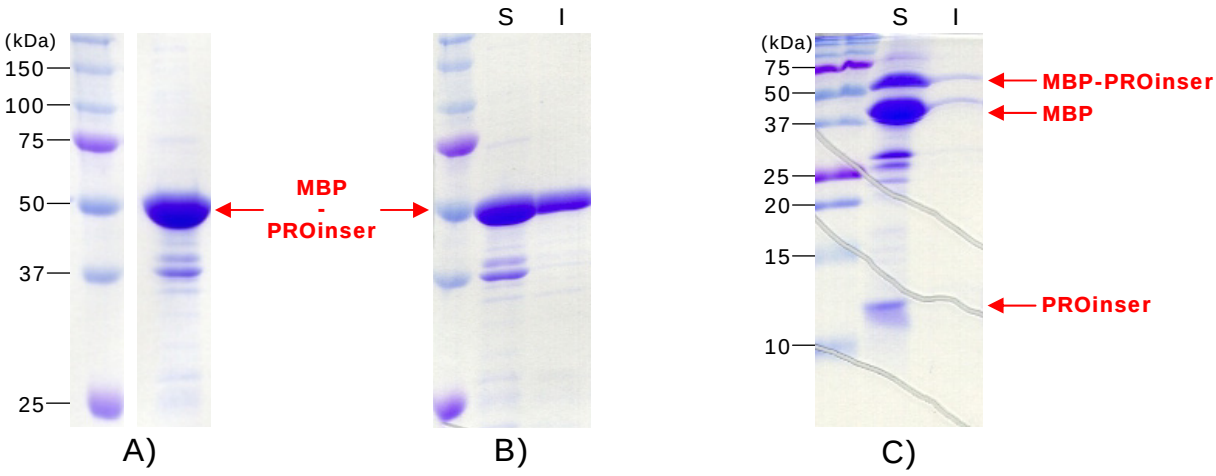


***Figure 4.6** : Purification et clivage du partenaire de fusion de MBP-PROinser (56 kDa) suivis par SDS-PAGE. A) Purification sur résine d'amylose : analyse de la fraction principale d'élution. B) Mise en évidence de l'agrégation partielle de MBP-PROinser : analyse des fractions soluble (S) et insoluble (I) après centrifugation de la fraction principale 24 heures après l'élution. C) Analyse de la solution de clivage par la TEV après centrifugation. Mise en évidence des bandes protéiques de MBP-PROinser, PROinser (13 kDa), et MBP (43 kDa).*

Nous avons tout de même entrepris de cliver le partenaire de fusion par coupure enzymatique avec la TEV. 680 µg de protéase ont été introduits dans la fraction principale d'élution de 10 mL contenant environ 8.5 mg de protéine de fusion. L'analyse SDS-PAGE de

la solution de clivage fait apparaître dans le surnageant une bande protéique de faible poids moléculaire à une masse apparente qui correspond à celle du domaine PROinser (Figure 4.6C). En se basant sur les intensités des bandes correspondant à MBP-PROinser, MBP, et PROinser, le rendement de coupure peut être estimé à une valeur proche de 70%. De plus, l'analyse de la fraction insoluble montre que l'introduction de la TEV n'a pas accentué le phénomène d'agrégation.

La quantité de protéine hétérologue clivée étant suffisante, la séparation du partenaire de fusion peut être envisagée sur résine de nickel. La solution de clivage a été intégralement chargée sur une colonne *HisTrap HP*. Après rinçage avec un tampon contenant 20 mM d'imidazole, l'élution a été menée avec un gradient linéaire en imidazole de 20 mM à 300 mM. L'analyse des éluats par SDS-PAGE fait apparaître 2 bandes protéiques dans les fractions contenant les protéines non retenues par la résine de nickel (fractions 1 à 6) (Figure 4.7). La première traduit la présence d'une faible quantité de protéine de fusion MBP-PROinser, et la seconde correspond à la MBP endogène de *E. coli*.

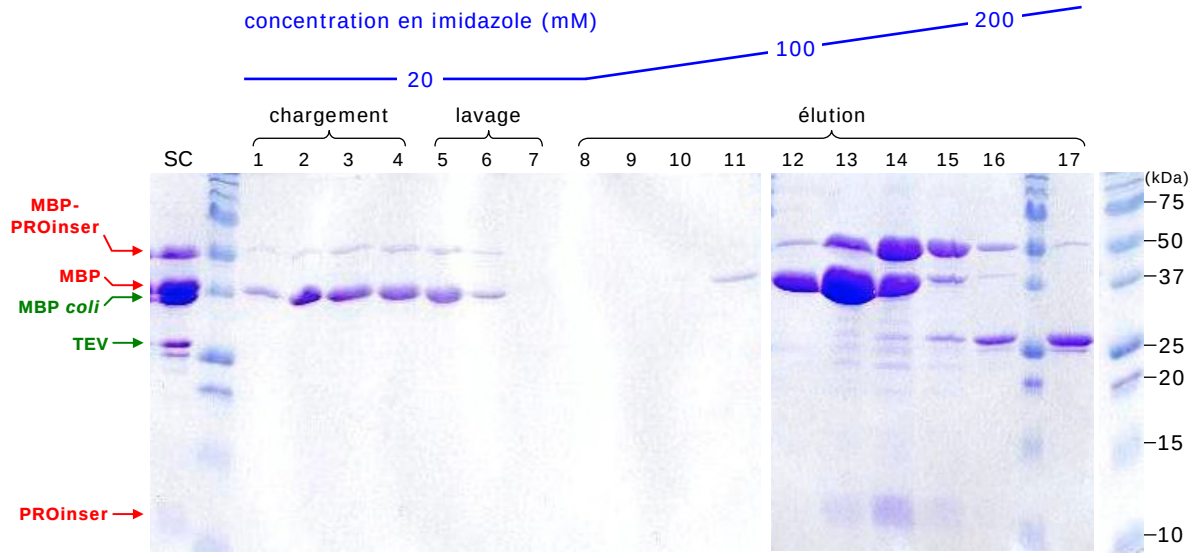


***Figure 4.7** : Suivi par SDS-PAGE de la purification de PROinser sur résine de nickel. Analyse des fractions de chargement, de lavage, d'élution, et de la solution de clivage (SC). Les protéines MBP-PROinser (56 kDa), MBP clivée (43 kDa), et PROinser (13 kDa) sont mises en évidence par des flèches rouges, et la protéase TEV (27 kDa) et la MBP endogène à E. coli (40 kDa) par des flèches vertes.*

De manière intéressante, le profil d'élution du domaine PROinser sur résine de nickel est tout à fait comparable à celui de PROcatal. En effet, PROinser, qui ne comporte pas d'étiquette 6xHis, est retenu dans la colonne jusqu'à des concentrations d'imidazole de

l'ordre de 130 mM ; ce qui est également le cas de la majeure partie de la protéine de fusion MBP-PROinser, et de MBP clivée, qui en possèdent une. Le domaine PROinser ne comportant que 2 résidus histidine dans sa séquence primaire, il est donc exclu que cette liaison à la résine de nickel soit due à des interactions non spécifiques. De plus, la présence de PROinser dans les différentes fractions est toujours accompagnée du partenaire MBP ou de la protéine de fusion résiduelle (fractions 13 à 15). A l'instar de PROcatal, il semble donc que le domaine PROinser interagisse avec son partenaire clivé ou la protéine de fusion via des liaisons non covalentes de fortes intensités. L'analyse des profils d'élution sur résine de nickel suggère donc un repliement incorrect ou instable du domaine PROinser, qui pourrait expliquer la propension à l'agrégation de la protéine de fusion, avant et après la coupure par la protéase TEV.

2.2.3) Obtention de la protéine PROentier

La production du domaine PROentier a également été entreprise avec le partenaire de fusion MBP et en souche Rosetta cultivée à 20°C. Les résultats de la transposition à grand volume, rassemblés dans le Tableau 4.4, montrent que le taux de protéine soluble, obtenu en fernbach ou en erlenmeyer, est très inférieur à celui obtenu en microplaques. Ainsi, l'expression dans la fraction soluble est à peine détectable en fernbach contenant 1 L de culture, et elle est un peu plus prononcée en erlenmeyer de 3L contenant 300 mL de culture.

PROentier	Microplaque (250 µL)		Fernbach (1 L)		Erlenmeyer (300 mL)	
MBP/Rosetta/20°C	S ++	I ++	S +/-	I ++++	S +	I +(+)

***Tableau 4.4** : Résultats de la transposition à grande échelle des meilleures conditions d'expression PROentier.*

Ces quantités de protéine soluble n'étant pas satisfaisantes, nous avons voulu tester la production à grande échelle du domaine PROentier en fusion avec le partenaire NusA, qui conduit au deuxième meilleur taux de protéine soluble en microplaques. Cependant, un certain nombre de difficultés inhérentes au *vecteur d'expression* ont été rencontrées lors des étapes de transformation et de précultures, et n'ont pas permis d'exprimer la protéine hétérologue NusA-PROentier.

La purification de la protéine de fusion MBP-PROentier a donc été entreprise à partir de la culture de 300 mL réalisée en erlenmeyer. La totalité du surnageant de lyse a été déposée sur résine d'amylose. L'analyse SDS-PAGE de la fraction principale d'élution fait apparaître une bande protéique majoritaire, dont la masse apparente correspond bien à celle de MBP-PROentier (Figure 4.8A), ce qui confirme la surexpression de la protéine de fusion. La quantité de protéine recombinante présente dans cette fraction de 11 mL est estimée à environ 2.3 mg, ce qui correspond à une production relativement faible d'environ 8 mg par litre de culture. Cependant, contrairement aux domaines PROcatal et PROinser, aucune tendance à l'agrégation de la protéine de fusion n'a été constatée.

Le clivage du partenaire de fusion a donc été réalisé en ajoutant 180 µg de protéase TEV dans la fraction d'élution contenant 2.3 mg de protéine de fusion. Comme le montre le gel d'acrylamide de la Figure 4.8B, le rendement de coupure du partenaire MBP est très satisfaisant et atteint quasiment 90 %. En effet, 2 bandes de moyenne intensité, dont les masses apparentes correspondent à celles de PROentier et MBP, apparaissent sur le gel d'acrylamide, alors que la bande protéique correspondant à MBP-PROentier a quasiment disparu.

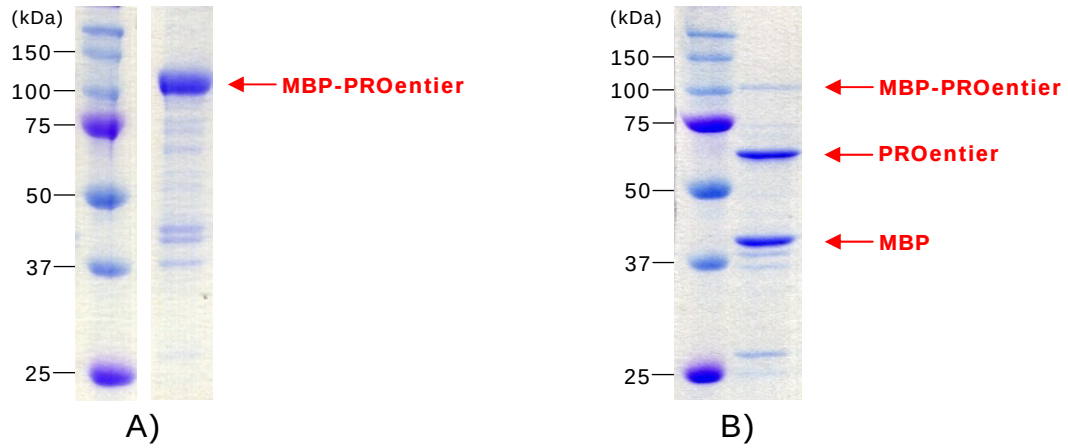


Figure 4.8 *: Purification et clivage du partenaire de fusion de MBP-PROentier (107 kDa) suivis par SDS-PAGE. A) Purification sur résine d'amylose : analyse de la fraction principale d'élution. B) Analyse de la solution de clivage par la TEV. Mise en évidence des bandes protéiques de MBP-PROentier, PROentier (67 kDa), et MBP (43 kDa).*

Au vu de ce bon résultat, nous avons abordé avec confiance la dernière étape de séparation du partenaire de fusion. La solution de clivage de 11 mL a été déposée sur une colonne *HisTrap HP*. La résine a été dans un premier temps lavée avec un tampon contenant 20 mM d'imidazole, puis l'élution a été menée avec un gradient linéaire en imidazole de

20 mM à 200 mM. L'analyse des fractions par SDS-PAGE montre clairement que le domaine PROentier n'est pas retenu sur la résine de nickel (Figure 4.9). En effet, la bande protéique correspondante n'apparaît que dans les fractions qui contiennent moins de 40 mM d'imidazole (fractions 1 à 8). On retrouve également dans ces fractions la MBP endogène de *E. coli* issue de la première purification sur résine d'amylose. Comme attendu, la protéine de fusion résiduelle MBP-PROentier, et le partenaire clivé MBP, fixent la résine de nickel jusqu'à des concentrations d'imidazole de l'ordre de 120 mM. Par conséquent, la chromatographie de pseudo affinité IMAC sur résine de nickel permet de séparer le domaine PROentier de son partenaire de fusion, ce qui n'était pas le cas avec PROcatal, et PROinser. Au vu de l'analyse SDS-PAGE des fractions contenant PROentier, un second passage sur résine d'amylose apparaît cependant nécessaire pour éliminer la MBP endogène de *E. coli*, et ainsi atteindre un degré de pureté satisfaisant. En se basant sur les fractions 6, 7 et 8 contenant la protéine relativement pure, le rendement obtenu, à l'issu de cette seconde étape de purification, atteint à peine 0.9 mg de domaine PROentier purifié par litre de culture. Il faudrait donc plus de 10 litres de culture pour espérer obtenir 10 mg de protéine purifiée.

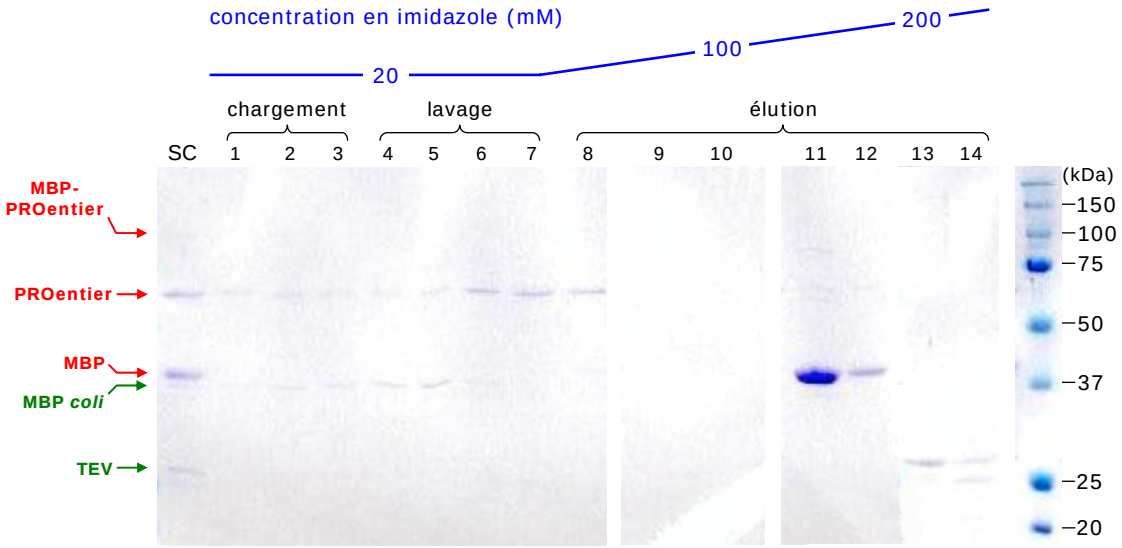


***Figure 4.9** : Suivi par SDS-PAGE de la purification de PROentier sur résine de nickel. Analyse des fractions de chargement, de lavage, d'élution, et de la solution de clivage (SC). Les protéines MBP-PROentier (107 kDa), MBP clivée (43 kDa), et PROentier (67 kDa) sont mises en évidence par des flèches rouges, et la protéase TEV (27 kDa), et la MBP endogène à E. coli (40 kDa) par des flèches vertes.*

Nous avons enregistré un spectre d'absorbance entre 400 et 600 nm sur l'échantillon N° 7 contenant 83 µg de protéine PROentier pure à plus de 90 % (estimation à partir du gel

d'acrylamide). De manière intéressante, ce spectre fait apparaître un léger pic à 450 nm qui correspond à la longueur d'onde d'absorbance du FAD dans le visible (non montré). Ce résultat suggère donc l'incorporation du cofacteur FAD au sein du domaine PROentier dont le repliement serait proche de la forme native. Cette analyse ne fournit cependant qu'une première indication et doit être confirmée avec un échantillon de protéine plus concentrée.

2.2.4) Obtention du domaine PROter

A l'issu des tests d'expression en microplaques, nous avons retenu comme meilleures conditions d'expression de PROter : le partenaire NusA, la souche Rosetta, et une température de 20°C. Comme le met en évidence le tableau 4.5, les résultats de la transposition à grande échelle, menée en erlenmeyer et en fernbach, ne permettent pas de valider ces conditions. En effet, l'expression dans la fraction soluble est quasiment nulle en erlenmeyer de 3L contenant 300 mL de culture, et elle est très faible en fernbach contenant 1 litre de culture. De plus, la diminution de la vitesse de croissance bactérienne observée en microplaques, a également été constatée à grande échelle ; ce qui confirme l'hypothèse du caractère toxique du domaine PROter. En parallèle, la production en grand volume avec le partenaire NusA a été testée en souche C41, qui permet d'améliorer l'expression des protéines hétérologues PROter en microplaques. Que ce soit en erlenmeyer ou en fernbach, aucune expression n'a été détectée dans la fraction soluble ou insoluble avec cette souche.

PROter	Microplaque (250 µL)		Fernbach (1 L)		Erlenmeyer (300 mL)	
NusA/Rosetta/20°C	S ++	I ++	S +	I +	S +/-	I +

***Tableau 4.5** : Résultats de la transposition à grande échelle des meilleures conditions d'expression PROter.*

Nous avons tout de même entrepris la purification de la protéine de fusion NusA-PROter à partir de la culture menée en fernbach. Aucune résine d'affinité spécifique à NusA n'étant disponible au laboratoire, celle-ci a été réalisée sur une colonne de nickel *HisTrap HP*. La moitié du surnageant, provenant de 500 mL de culture, a été déposée sur la résine. L'élution a été menée avec un gradient linéaire d'imidazole de 20 mM à 400 mM. L'analyse SDS-PAGE fait apparaître une très légère bande à peine discernable, dont la masse apparente correspond à celle de NusA-PROter, dans les fractions contenant entre 100 et 200 mM d'imidazole (fractions 9 à 12) (Figure 4.10A).

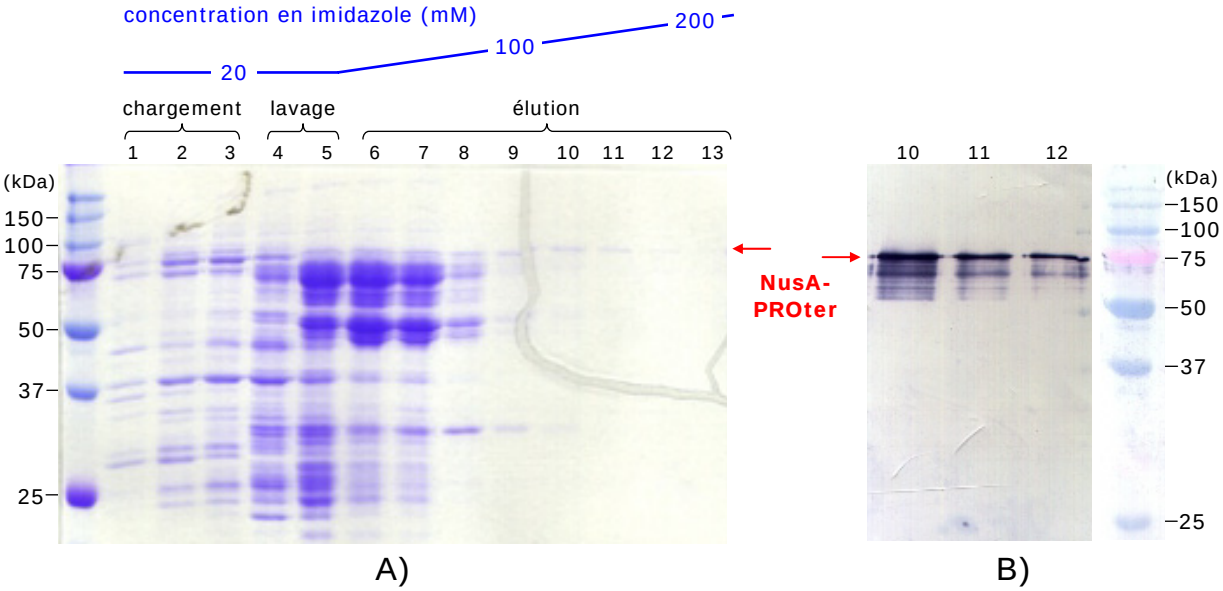


Figure 4.10 *: Purification de la protéine de fusion NusA-PROter (68 kDa) sur résine de nickel. A) Analyse des fractions de chargement, de lavage, et d'élution par SDS-PAGE. B) Analyse des fractions d'élution 10 à 12 par Western-blot avec un anticorps anti-NusA.*

Afin de confirmer la présence de la protéine de fusion, une hybridation Western-blot, beaucoup plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie, a été menée avec des anticorps anti-NusA (Figure 4.10B). Cette analyse montre que la bande protéique de faible intensité correspond bien à la protéine NusA-PROter, mais elle révèle également un profil de dégradation de la protéine hétérologue. En effet, la présence de « traînées » en dessous d'une bande majoritaire sur une membrane de Western-blot est caractéristique d'une protéolyse partielle. D'autre part, la quantité de protéine étant trop faible dans les fractions d'élution, il n'a pas été possible de quantifier le rendement de production par mesure de l'absorbance à 280 nm ; d'autant plus que l'imidazole possède une absorbance résiduelle à cette longueur d'onde. Au vu de ces résultats, il n'a pas été envisagé d'aborder l'étape suivante de clivage du partenaire de fusion.

3) Conclusions

De manière générale, la deuxième phase de production et purification du processus d'expression du programme 3PM n'a pas permis de valider les meilleures conditions issues du criblage en microplaques.

En ce qui concerne les domaines PROcatal et PROinser, bien que la transposition à grande échelle soit favorable, la tendance à l'agrégation constatée de ces 2 domaines a considérablement compliqué leur purification. De plus, malgré la réussite de la coupure enzymatique en solution par la protéase TEV, nous n'avons pas été en mesure de les séparer de leur partenaire de fusion. Ces résultats mettent ainsi en évidence le rôle complexe et ambigu du partenaire de fusion qui semble, dans certains cas, capable d'augmenter la solubilité générale d'une protéine en fusion, sans pour autant favoriser son repliement natif et stable, et par conséquent, indépendant. De manière intéressante, les profils de stabilité et de purification de ces 2 domaines, de taille très différente, sont tout à fait identiques. Ceci laisse supposer que l'instabilité du domaine catalytique (PROcatal) pourrait être due à la présence de l'insertion (PROinser) dans sa région N-terminale.

Le caractère toxique du domaine PROter, révélé à l'issu du criblage en microplaques, a été confirmé lors de la production à grande échelle : le vecteur d'expression PROter en fusion avec NusA induit d'une part, une expression très faible de protéine soluble et d'autre part, une diminution de la vitesse de croissance bactérienne. De plus, l'analyse de cette expression fait apparaître une protéolyse partielle de la protéine de fusion. Au vu de ces résultats, la production de ce domaine n'est donc pas adaptée chez l'organisme *E. coli*.

Dans le cas de la protéine entière, la stratégie d'expression du domaine PROentier en fusion avec le partenaire MBP est à première vue une réussite. Les différentes étapes de purification de la protéine de fusion, de clivage par la TEV, et de séparation du partenaire, ont globalement rempli leur objectif. Le seul désagrément se situe au niveau de la transposition à grande échelle qui, conduisant à une expression très faible de protéine, constitue un véritable obstacle dans le cas d'une étude structurale.

4) Matériels et Méthodes

4.1) Production à grande échelle et extraction des protéines

4.1.1) Production à grande échelle

La production à grand volume est réalisée en culture de 300 mL dans un erlenmeyer de 3L, ou en fernbach de 1 L, à partir des meilleures conditions définies à l'issue du criblage. Pour chaque construction, 50 µL de bactéries thermocompétentes Rosetta pLysS sont préalablement transformées par 20 ng de *vecteur d'expression* par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Le produit de transformation est ensuite mélangé avec 200 µL de SOC, incubé 1 heure à 37°C, puis étalé sur boîte LB/agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 35 µg/mL de chloramphénicol. Après une nuit d'incubation à 37°C, une préculture de 30 mL contenant les mêmes concentrations d'antibiotiques est inoculée avec plusieurs colonies, puis placée sous une agitation de 250 rpm à 37°C. Les cultures de bactéries Rosetta contenant les 2 antibiotiques sont ensemencées avec un volume de préculture de manière à obtenir une DO_{600} initiale de 0.05, puis incubées à 37°C sous une agitation de 250 rpm. Après induction avec 1 mM d'IPTG lorsque la DO_{600} atteint 1.2, les cultures sont placées à 20°C pendant 14 heures sous une agitation de 250 rpm. A l'issu de ce délai, la croissance bactérienne est stoppée par centrifugation à 2830xg pendant 20 minutes et à 4°C.

4.1.2) Lyse des bactéries et séparation des fractions soluble et insoluble

Les culots bactériens sont congelés dans l'azote liquide, repris au 1/20^{e} dans un tampon de lyse (100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de glycérol, 1 µM de phosphoramidon, et 1 mM de PMSF), puis cassés à la presse d'Eaton (technique de lyse mécanique par application d'une pression de 6 tonnes sur des cellules congelées à -80°C, dirigées vers un orifice de petit diamètre). 0.5 U/mL de benzonase et 10 mM de $MgCl_2$ sont ajoutés au broyat. Après une incubation de 15 minutes à 30°C, une centrifugation à 40000xg pendant 30 minutes à 4°C permet de séparer les fractions soluble et insoluble. Le culot est repris dans le même volume que le surnageant avec du SDS 2%. Les protocoles d'analyse SDS-PAGE et Western-blot sont identiques à ceux présentés dans la partie Matériels et Méthodes du chapitre 2 (cf. § 4.2.3).

4.2) Purification des protéines de fusion et des protéines d'intérêt

4.2.1) Purification sur résine d'amylose

La purification des protéines en fusion avec le partenaire protéique MBP est réalisée sur résine d'amylose *Amylose Resin* (Biolabs) de capacité théorique 3 milligramme par millilitre de résine. Le volume de résine introduit dans la colonne est choisi en fonction de la quantité de protéine de fusion estimée dans les surnageants de lyse. La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de tampon d'équilibration contenant, 30 mM de Tris-HCl (pH 7.8), 200 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, et 2 mM de β-mercapto-éthanol. Le débit est de 1 mL/min pour toute la purification. Après chargement des surnageants de lyse, la résine est lavée avec le tampon d'équilibration jusqu'à retour de l'absorbance mesurée à 280 nm à la ligne de base (*LKP Control Unit UV-1*, Pharmacia). L'élution est réalisée avec ce même tampon contenant 10 mM de maltose. Le volume des fractions recueillies est de 5 mL ou 10 mL. Elles sont analysées par SDS-PAGE et quantifiées par mesure de la DO_{280}.

4.2.2) Purification sur résine de nickel

Des colonnes *HisTrap HP* (Amersham) de 1 mL ou 5 mL, pré-chargées en résine de nickel, et de capacité théorique 12 mg/mL, sont utilisées pour séparer le partenaire de fusion après clivage ou purifier la protéine hétérologue NusA-PROter. Après équilibration de la colonne, à un débit de 1 mL/min, avec 10 volumes de tampon de fixation contenant, 100 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, 2 mM de β-mercapto-éthanol, et 20 mM d'imidazole (pour limiter les interactions non spécifiques), les échantillons sont introduits à un débit de 0.5 mL/min. La valeur du débit est ensuite portée à 1 mL/min jusqu'à la fin de la purification. La résine est lavée avec du tampon de fixation jusqu'à retour de la DO_{600} à la ligne de base initiale. La composition du tampon d'élution est identique à celle du tampon de fixation et contient en plus de l'imidazole à une concentration de 500 mM. L'élution est menée avec un gradient linéaire d'imidazole de 20 à 200, 300, ou 400 mM (selon les protéines purifiées) sur 10 volumes de colonne. Un lavage est finalement réalisé avec un tampon contenant 1 M d'imidazole sur 5 volumes de colonne. Le volume des fractions recueillies est de 1 mL ou 2 mL (collecteur *GradiFrac*, Pharmacia). Elles sont analysées par SDS-PAGE et quantifiées par mesure de la DO_{280}. La quantité d'imidazole dans les fractions d'élution est vérifiée en comparant leur absorbance mesurée à 300 nm à celle de solutions contenant des concentrations d'imidazole connues.

4.3) Clivage du partenaire de fusion par la protéase TEV

La présente du motif ENLYFQG, reconnu par la protéase TEV, en aval de la séquence de la protéine d'intérêt permet le clivage du partenaire de fusion. Par souci de réduction des coûts, cette protéase est produire au LMP sous forme recombinante chez *E. coli*. Les fractions issues de la première étape de purification sont soumises à une coupure en solution en introduisant 8% de TEV, soit 8 mg pour 100 mg de protéine de fusion. Elles sont ensuite incubées à 4°C pendant environ 14 heures sous légère agitation.

CHAPITRE 5

Conclusions & Perspectives

Lorsque j'ai abordé ce projet de thèse, le premier objectif fixé était de déterminer et produire un domaine structuré soluble de la proline déshydrogénase humaine, en espérant que sa taille soit compatible avec une étude par RMN. Aucune donnée structurale de proline déshydrogénase n'étant disponible, nous avons abordé une première approche, qui consistait à exprimer l'intégralité de la protéine sous forme native dans un organisme recombinant, puis à caractériser ses domaines structuraux par protéolyse ménagée. Pour des raisons essentiellement basées sur la simplicité de mise en œuvre, l'organisme producteur qui a été choisi est la bactérie *E. coli*. Cependant, et à l'image de plus de 50 % des protéines eucaryotes exprimées dans cet organisme, la production de PRODH chez *E. coli* conduit à l'unique formation d'agrégats de protéine insoluble et inactive : les corps d'inclusion.

Nous avons par conséquent entrepris de produire la forme mature de PRODH, c'est-à-dire délestée de son peptide d'adressage mitochondrial N-terminal. Sur la base de prédictions bio-informatiques, le peptide signal de la séquence de PRODH humaine a été ciblé au niveau de l'extrémité N-terminale 1-36. L'expression de la construction PRO564, correspondant aux 564 résidus C-terminaux de PRODH, a ainsi été initiée chez *E. coli*. Cette production s'est également soldée par l'unique formation de corps d'inclusion.

L'expression sous forme soluble constituant l'étape limitante de notre étude structurale, il nous fallait par conséquent modifier notre stratégie. Ces dernières années ont vu l'apparition d'un certain nombre d'innovations dans le domaine de l'expression de protéines recombinantes, qui ont notamment abouti à l'émergence de plates-formes de production dédiées à l'expression de protéines solubles chez *E. coli*. Nous avons ainsi entrepris de produire PRODH dans le cadre d'un de ces programmes, qui offre la possibilité de tester plusieurs partenaires de fusion et plusieurs souches d'expression différents. En parallèle, de nouvelles données sont apparues dans la littérature et nous ont permis d'envisager une stratégie alternative d'étude structurale. La publication récente de la première structure de proline déshydrogénase a mis en évidence l'existence d'un domaine catalytique PRODH replié en tonnelet α8β8 chez *E. coli*, et dont la taille n'est pas adaptée à une étude par RMN. Nous avons par conséquent abordé une seconde approche, qui consiste à prédire l'organisation des domaines de la protéine humaine sur la base de cette structure, et en utilisant des outils bio-informatiques. A partir d'alignements de séquence, de recherche d'homologie de séquence, et de prédiction de structure secondaire, nous avons prédit les

segments qui constituent le domaine catalytique humain. Cette analyse suggère la présence d'un large domaine catalytique C-terminal de 59 kDa, entremêlé avec deux insertions, de fonction inconnue, de respectivement, 50 et 100 résidus, et d'un domaine N-terminal également de fonction inconnue. Dans l'optique de caractériser les rôles structural et fonctionnel de ces domaines potentiels, 3 régions de PRODH humaine ont été sélectionnées afin de les soumettre au programme de production 3PM du Laboratoire de Structure des Protéines du CEA de Saclay. Il s'agit du domaine catalytique (PROcatal), du domaine N-terminal (PROter), et de la deuxième insertion (PROinser). La forme mature de PRODH humaine rebaptisée PROentier a également été soumise à la plate-forme de production 3PM.

Malgré la possibilité de tester un grand nombre de conditions d'expression, la production des 3 protéines PROcatal, PROter, et PROinser dans le cadre du programme 3PM s'est soldée par un échec. En effet, le criblage de ces conditions d'expression à petite échelle a, certes dans un premier temps, permis d'identifier un partenaire protéique qui conduit à une expression suffisante de protéine soluble. Cependant, nous avons été confrontés à plusieurs difficultés lors de la deuxième phase du processus d'expression à grand volume (absence d'expression, agrégation, protéolyse, incapacité à éliminer le partenaire), qui ne permettent pas de satisfaire les exigences inhérentes à une étude structurale par RMN ou cristallographie des rayons X (protéine soluble, native, stable, pure, et en grande quantité). En ce qui concerne la protéine mature PROentier, nous avons réussi à produire cette protéine sous forme soluble et pure. Toutefois, les meilleures conditions d'expression ne conduisent qu'à un rendement très faible de 0.9 mg par litre de culture, qui nécessiterait plus de 10 litres de culture pour espérer obtenir ne serait-ce que 10 mg d'une protéine de 67 kDa.

Au vu de l'ensemble des résultats, il ne semblait pas raisonnable de poursuivre ce projet dans le cadre de mon travail de thèse. En effet, la production de protéines et domaines recombinants PRODH a été très coûteuse en temps. Près de 20 mois ont été nécessaires pour cloner, produire, et optimiser les conditions d'expression des protéines PRODH, PRO564, PROentier, PROcatal, PROter, et PROinser. Au final, seul le domaine PROentier fait l'objet de résultats encourageants qui sont cependant insuffisants pour envisager l'analyse structurale. De plus, cette large région de 67 kDa n'est pas adaptée à une étude par RMN, qui représente un des objectifs de mon projet scientifique. La mise au point du protocole d'expression de la protéine PROentier n'a pas été pour autant inutile. En effet, la production

de plusieurs litres de culture serait suffisante pour entreprendre des études biochimiques sur la protéine PROentier, et ainsi caractériser pour la première fois la nature du cofacteur et/ou de l'inhibiteur compétitif naturel d'une proline déshydrogénase eucaryote. Pour ma part, j'ai entrepris de mettre à profit l'expérience acquise dans le domaine de l'expression de protéines recombinantes pour produire, puis caractériser la structure d'une autre biomolécule : la protéine KIN17, impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN.

SECONDE PARTIE

Caractérisation de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire

CHAPITRE 1

Introduction

1) Généralités sur le maintien de l'intégrité du génome

L'Acide Désoxyribose Nucléique, connu sous le nom d'ADN, est un polymère de nucléotides qui contient sous forme codée une grande partie des informations relatives à la vie d'un organisme vivant. La protection de l'intégrité du génome est un défi capital et constant pour les cellules. En effet, la survie des organismes dépend de la transmission totale et correcte de l'information génétique lors des processus de réplication de l'ADN. Les cellules doivent donc être capable de détecter et réparer les dommages de l'ADN, de toute nature qu'ils soient, afin de préserver leur patrimoine génétique.

1.1) Les dommages de l'ADN

1.1.1) Sources

Une cellule doit lutter en permanence pour protéger l'intégrité de son génome. Toute altération de ce précieux matériel nucléaire constitue un dommage de l'ADN. Les origines de ces altérations moléculaires sont aussi différentes que nombreuses. Ainsi, elles peuvent provenir d'agents exogènes, on parle alors d'altération environnementale, ou d'agents endogènes qui induisent des dommages dits spontanés.

Parmi les sources exogènes, figurent les rayonnements, les radiations ionisantes et les substances chimiques mutagènes. Les ultraviolets (UV), les radiations ionisantes (IR), ou le rayonnement γ, produisent des lésions sur l'ADN notamment dues à la radiolyse des molécules d'eau qui forme des espèces réactives de l'oxygène (Ames et al., 1993). Ces espèces réactives peuvent modifier aussi bien les bases de l'ADN, que les sucres, et créent des cassures au niveau du squelette phosphate (Hutchinson, 1985). Les agents chimiques comme des drogues, les analogues de base, ou les inhibiteurs de processus biologiques peuvent, une fois passée la membrane nucléaire, causer d'importants dégâts à la structure moléculaire de l'information génétique. C'est notamment le cas du *Méthyl Methane Sulfonate* (MMS) qui bloque la séparation des brins d'ADN.

Les dommages spontanés peuvent provenir d'erreurs générées durant les processus de réplication, recombinaison, ou réparation de l'ADN. Des modifications chimiques peuvent également avoir lieu dans certaines conditions de pH et de température. D'autre part, le

métabolisme cellulaire induit la formation endogène d'espèces réactives de l'oxygène. Elles proviennent notamment de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ames et al., 1993), des peroxysomes (compartiments cellulaires où sont dégradés les acides gras) (Yeldandi et al., 2000), et de la détoxification de certains composants de la cellule comme la vitamine D (Bondy & Naderi, 1994).

1.1.2) Nature et conséquences

Les différents types de dommage causés par des agents endogènes ou exogènes peuvent être classés en quatre catégories distinctes :

- Les cassures d'ADN simple ou double brin
- Les mésappariements
- Les dégradations des bases, comme la déamination, l'oxydation, ou la création de sites abasiques
- Les modifications encombrantes telles que pontages intra- et inter- brins et la formation de dimères de pyrimidine. Ainsi, les rayons UV sont connus pour introduire des dimères de pyrimidines et des pontages ADN-protéine ou ADN-ADN qui causent des distorsions importantes dans la double hélice pouvant amener à la rupture de la chaîne polynucléotidique.

Le renouvellement de l'ADN peut provoquer la dépurination spontanée de certaines bases à raison de 2000 à 10000 sites par cellule humaine quotidiennement (Lindahl, 1993). La cassure double brin est la plus dangereuse éventualité qu'une cellule peut rencontrer car elle peut susciter la perte d'un morceau de chromosome ou une translocation chromosomique (Thompson & Limoli, 2003; Tong et al., 2001). Si une cellule ne peut réparer les quelques 10000 altérations de l'ADN qu'elle s'impose quotidiennement (Lindahl, 1993), elle s'expose alors à de graves problèmes car l'instabilité génomique est l'un des évènements pouvant mener à la perturbation de la fonction cellulaire. En effet, l'accumulation de dommages peut avoir de lourdes conséquences s'ils surviennent à des endroits critiques dans la structure de l'ADN. Elle peut mener à l'apoptose (mort cellulaire programmée) ou à la formation de tumeurs, et ainsi augmenter le risque de développer des maladies graves telles que le cancer (Khanna & Jackson, 2001). Lorsque les mécanismes de réparation échouent ou commettent

des impairs, il y a apparition de mutations. Si celles-ci induisent une modification structurale significative, elles peuvent modifier l'activité d'une protéine ou la guider vers la dégradation.

1.2) Les systèmes mis en jeu

La cellule dispose de systèmes moléculaires complexes qui lui permettent de réagir rapidement à l'endommagement de son ADN. L'existence de pathologies humaines liées au dysfonctionnement de ces systèmes a permis de les caractériser et de souligner leur importance dans le maintien de l'intégrité du patrimoine génétique. Ils ont pour objectif :

- La réparation de l'ADN
- La signalisation des dommages
- La réponse transcriptionnelle (induction de gènes de la réparation par exemple)
- L'apoptose

Les quatre types de voies citées ci-dessus sont interconnectées : certaines protéines participent à plusieurs types de réponses aux dommages de l'ADN. Un défaut dans l'une de ces voies provoque l'instabilité du génome (Sancar et al., 2004).

1.3) Les voies de réparation des lésions de l'ADN

Suite à la détection d'un dommage de l'ADN, différentes voies de réparation peuvent être activées : la réparation directe, la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotide (NER), la réparation des mésappariements (MMR), et la réparation des cassures double brins qui peuvent être pris en charge soit par la voie de recombinaison homologue (HR), soit par le mécanisme de recombinaison non homologue (NHEJ pour *Non Homologous End Joining*). Ces différentes voies sont récapitulées dans la Figure 1.1.

La recombinaison homologue est sans doute le système le plus efficace de réparation d'une cassure double brin (Szostak et al., 1983). Ce mécanisme, principalement utilisé chez la levure et les bactéries, assure la conservation intégrale de l'information génétique. Il est basé sur l'échange de brins provenant d'un chromosome endommagé vers un chromosome homologue intact. La recombinaison non homologue ou illégitime (NHEJ) se fait par ligature des extrémités de la cassure de l'ADN. La réparation des cassures double brins par ce système

s'accompagne fréquemment de délétions (Jeggo, 1998). Ainsi, le gène n'est, en général, plus fonctionnel lorsqu'il est réparé par ce mécanisme.

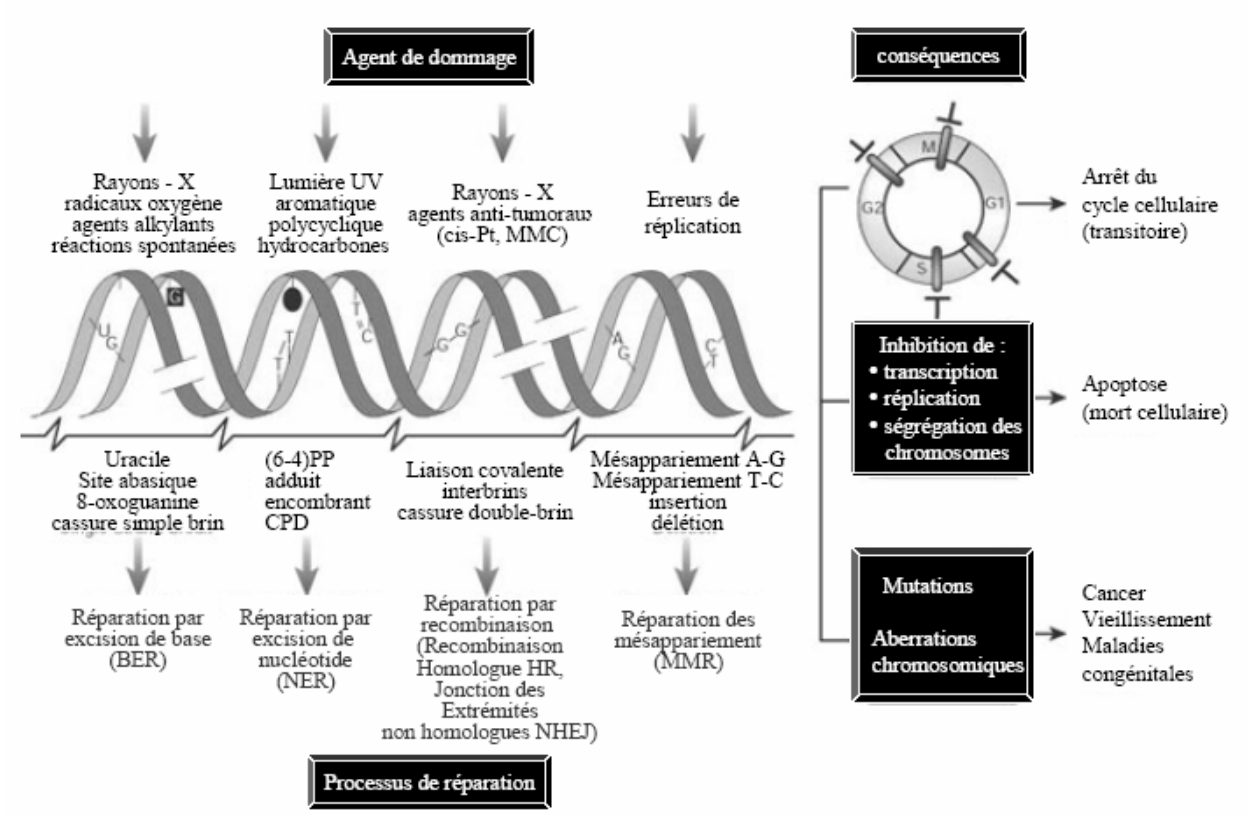


***Figure 1.1** : Schéma récapitulant la nature et les conséquences des dommages de l'ADN, et les différentes voies de réparation (d'après Hoeijmakers, 2001).*

Les mésappariements peuvent survenir au cours de la réplication ou lors de la recombinaison homologue. Leur réparation par le mécanisme MMR (Marti et al., 2002) peut se décomposer en trois principales étapes: la reconnaissance des mésappariements, le recrutement des protéines du MMR, et l'excision-resynthèse de l'un des deux brins.

La réparation par excision de bases (BER) découverte en 1974 (Lindahl, 1974) reconnaît le plus fréquemment des bases modifiées : déamination des cytosines en uracile, alkylation de base induite par des métabolites cellulaires, oxydation des bases de l'ADN et certains mésappariements induits par les erreurs de réplication de l'ADN. Plusieurs de ces lésions sont dues à des agents environnementaux comme les radiations ionisantes mais certaines résultent d'une hydrolyse spontanée. Dans ce mécanisme, seule la base qui a été modifiée est clivée, puis remplacée.

Enfin, la réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER) (Friedberg, 2001) est le mécanisme majeur de l'élimination des lésions simple brin. Cette voie de réparation corrige préférentiellement les modifications des nucléotides telles que les dimères de pyrimidine et autres lésions produits par les rayons UV, mais également les mésappariements de type C•C. Contrairement au BER, cette voie de réparation clive plusieurs nucléotides du brin d'ADN endommagé et libère un fragment simple brin de 24 à 32 bases. Un nouveau brin est alors synthétisé par des polymérases en utilisant comme matrice le brin non endommagé. C'est ce mécanisme de réparation qui intervient dans la régulation de la protéine KIN17.

2) La protéine KIN17

Le Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité (LGR) du CEA de Fontenay-aux-Roses s'intéresse aux effets biologiques produits par les stress génotoxiques sur les cellules, et notamment à la réponse des cellules de mammifères aux radiations ionisantes (RI). En 1991, les chercheurs du LGR ont découvert une nouvelle protéine nucléaire de 45 kDa appelée KIN17 (Angulo et al., 1991). Les fonctions précises et les partenaires protéiques de cette protéine, uniquement présente chez les organismes eucaryotes et exprimée de manière ubiquitaire, sont à ce jour inconnues. Cependant, un certain nombre d'études génétiques *in vitro* et *in vivo* ont permis de caractériser l'implication de cette protéine dans différents mécanismes nucléaires majeurs, et notamment la réplication et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

2.1) Les propriétés de la protéine KIN17

La protéine KIN17 a été initialement identifiée sur la base de sa capacité à réagir avec les mêmes anticorps que ceux dirigés contre RecA, une protéine bactérienne impliquée à la fois dans la réparation et la réplication de l'ADN (Angulo et al., 1991). KIN17 possède effectivement dans sa séquence une région d'environ 40 résidus qui présente 47 % d'identité avec un segment situé en C-terminal de RecA. De manière intéressante, dans RecA, cette région est impliquée dans la régulation de la liaison de la protéine à l'ADN et dans le mécanisme SOS, une des réponses aux lésions de l'ADN chez les organismes procaryotes (Kurumizaka et al., 1996).

2.1.1) Implication de KIN17 dans la réplication et la réponse aux dommages de l'ADN

Le gène humain encodant KIN17, situé sur le chromosome 10, fait partie de l'ensemble des gènes de l'organisme très faiblement exprimés. Cependant, les cellules en division rapide contiennent 3 fois plus d'ARNm KIN17 que les cellules au repos (Kannouche et al., 1998). De plus, la protéine KIN17 est distribuée dans les noyaux des cellules de mammifères sous forme de structures discrètes appelées « foyers intra-nucléaires » (Kannouche et al., 1997). Ce type de foyers reflète la compartimentation de l'ADN lors des processus complexes comme la réplication, la réparation, la transcription, ou l'épissage. Toutes ces observations suggèrent fortement que KIN17 appartient à un réseau de protéines intranucléaires requises lors de la prolifération cellulaire.

L'irradiation par des rayons UV ou γ et des radiations ionisantes provoquent une augmentation significative de la concentration d'ARNm KIN17 dans les 13 heures qui suivent l'irradiation de cellules de souris en culture (Kannouche et al., 2000 ; Biard et al., 2002). Cette augmentation s'accompagne d'une accumulation de la protéine dans le noyau des cellules. KIN17 est donc régulée de manière positive suite à une exposition à des sources rayonnantes qui induisent des dommages de l'ADN. De manière intéressante, cette régulation positive après irradiation par des UV-C dépend de la présence des protéines XPA et XPC (Masson et al., 2003). Ces deux protéines sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER) (Wakasugi & Sancar, 1999). Sur la base de ces observations, il apparaît donc que la protéine KIN17 est impliquée dans la réponse aux dommages cellulaires de l'ADN.

Par ailleurs, des études de gel filtration, réalisées sur un extrait cellulaire humain de protéine totale, ont révélé la présence de KIN17 dans 3 complexes multi-protéiques de très haute masse moléculaire (respectivement : 400 kDa, 600 kDa, et 1800 kDa) contenant la protéine de réplication RPA (Miccoli et al., 2005). De plus, une interaction physique entre KIN17 et l'antigène T du virus SV40 a été démontrée (Miccoli et al., 2002). Ces observations confortent l'hypothèse de l'implication de KIN17 dans la réplication de l'ADN.

2.1.2) Liaison de KIN17 aux acides nucléiques

En 1994, Mazin *et al.*, ont mis en évidence la capacité de KIN17 à lier l'ADN et l'ADN courbe *in vivo* et *in vitro* chez l'homme et la souris (Mazin et al., 1994). Ainsi, une fraction de KIN17 est fortement et directement associée avec l'ADN chromosomique dans les cellules humaines (Biard et al., 2002). L'ADN courbe est une forme de l'ADN, riche en bases adénine, retrouvée dans les sites de recombinaison illégitime des cellules de mammifère. Chez les organismes procaryotes, l'ADN courbe occupe une fonction importante dans la transcription des gènes (Nishikawa et al., 2003). L'affinité de KIN17 pour cette forme de l'ADN a été confirmée *in vivo* en surexprimant la protéine KIN17 de souris chez la bactérie *E. coli* (Timchenko et al., 1996). Dans cette étude, il est montré que KIN17 est capable de complémenter les fonctions du facteur de transcription H-NS, qui lie l'ADN courbe et contrôle l'expression d'au moins 36 gènes.

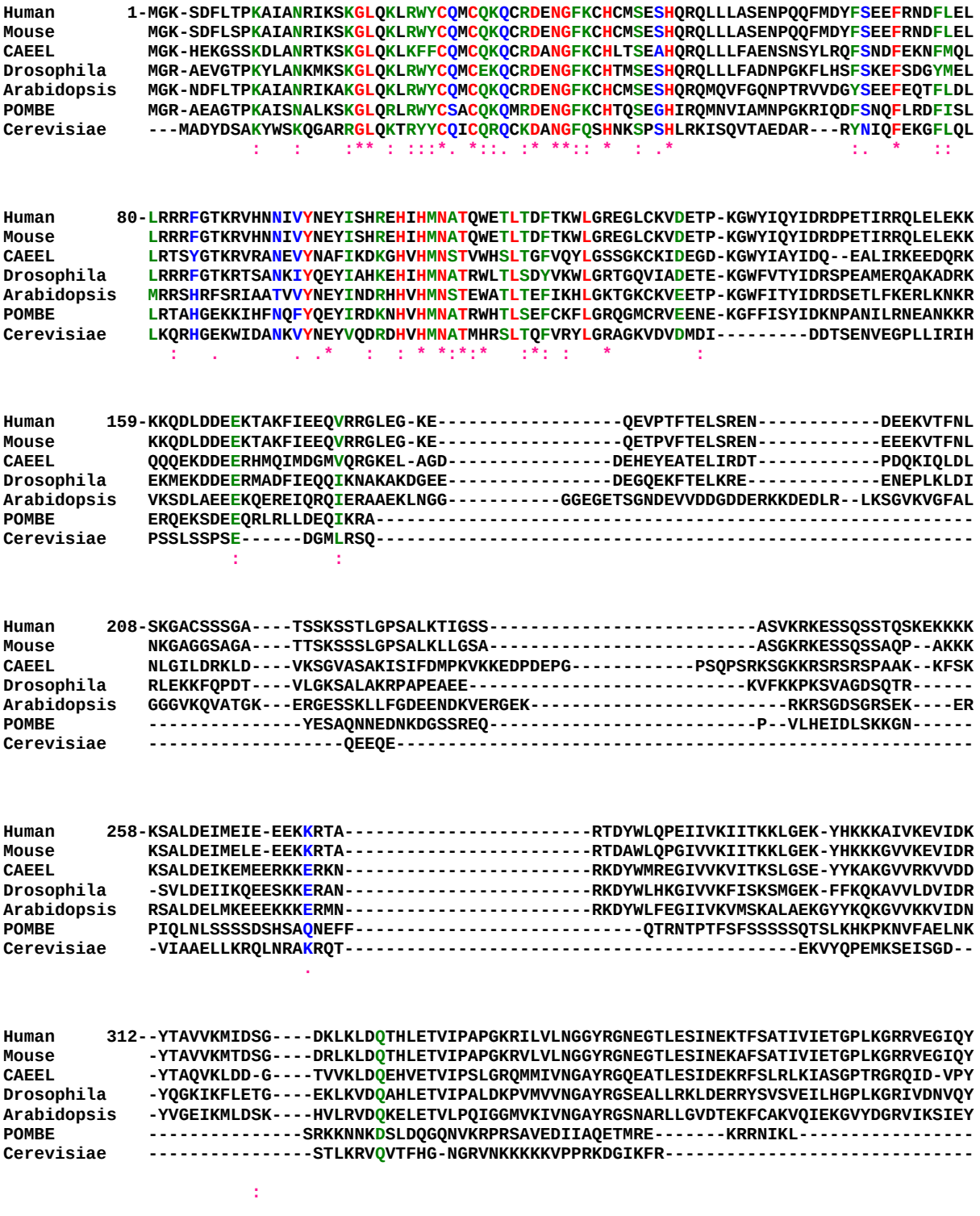
Par ailleurs, une étude protéomique à grande échelle a mis en évidence la présence de KIN17 dans le spliceosome humain, un large complexe protéine-ARN (Rappsilber et al., 2002). L'interaction de KIN17 avec l'ARN a été récemment caractérisée par Pinon-Lataillade *et al.*, qui ont montré d'une part, que la protéine KIN17 de souris était capable de fixer l'ARN *in vivo*, et d'autre part, que les protéines humaines et de souris reconnaissent de manière directe différents types d'homopolymères d'ARN *in vitro* (Pinon-Lataillade et al., 2004).

2.2) Organisation des domaines structuraux de KIN17

Depuis sa découverte en 1991, parallèlement aux études génétiques, la protéine KIN17 a fait l'objet d'analyses bio-informatiques qui ont permis de caractériser une organisation segmentée en domaines structuraux (Tissier et al., 1995 ; Pinon-Lataillade et al., 2004 ; Ponting, 2002). Sur la base de ces analyses, les chercheurs du LGR ont caractérisé quelques propriétés de ces domaines qui sont présentées dans ce paragraphe.

La protéine KIN17 humaine est un polypeptide de 393 acides aminés. Comme le montre l'alignement de la Figure 1.2, KIN17 est remarquablement conservée de la levure jusqu'à l'homme dans la moitié N-terminale correspondant aux résidus 1-165 de la séquence humaine. Dans cette région, les pourcentages d'identité et de similarité atteignent respectivement 14 % et 22 %. Cependant, les séquences de KIN17 ne s'alignent pas dans la

moitié C-terminale. En effet, la séquence de KIN17 ne compte qu'entre 250 et 300 résidus chez les eucaryotes inférieurs telle que la levure, alors qu'elle est proche de 400 résidus chez tous les eucaryotes supérieurs. Ceci laisse supposer l'existence d'un domaine structural supplémentaire chez les eucaryotes supérieurs.



```
Human     387-EDISKLA----------------------------
Mouse          EDISKLA----------------------------
CAEEL          EDASKLA----------------------------
Drosophila     EDISKLHGA--------------------------
Arabidopsis    EDICKLA----------------------------
POMBE          ---------------------------------
Cerevisiae     ---------------------------------
```

***Figure 1.2** : Alignement de 7 séquences de KIN17 réalisé avec l'aide du logiciel clustalw. Les séquences alignées sont relatives aux espèces eucaryotes humaine (Human, 393 résidus), Mus Musculus (Mouse, 391 réidus), Caenorhabditis elegans (CAEEL, 404 résidus), Drosophila Melanogaster (Drosophila, 390 résidus), Arabidopsis thaliana (Arabidopsis, 411 résidus), Schizosaccharomyces pombe (POMBE, 304 résidus), et Saccharomyces cerevisiae (Cerevisiae, 232 résidus). Les résidus sont colorés en rouge lorsqu'ils sont conservés (sigle *), en vert lorsqu'il sont fortement similaires (sigle :), et en bleu lorsqu'ils sont faiblement similaires (sigle .). La numérotation est relative à la séquence humaine.*

L'utilisation des programmes *SMART* (Schultz et al., 1998) et *Pfam* (Finn et al., 2006) de reconnaissances de domaines suggère l'existence de 4 motifs dans la séquence primaire de KIN17 humaine :

- Un motif « doigt de zinc » également appelé C_2H_2 (résidus 28-50)
- Un domaine de repliement FF (résidus 50-150)
- Une séquence signale de localisation nucléaire (région 239-256)
- Un motif KOW (335-373)

● Les motifs « doigts de zinc » sont des domaines de liaison aux acides nucléiques (ADN et ARN). Ils se caractérisent par la présence d'un ion zinc complexé entre 2 résidus cystéine et 2 résidus histidine (Figure 1.3). Lorsqu'ils ne sont pas retrouvés en plusieurs exemplaires dans une séquence, la liaison à l'ADN n'est en général pas spécifique d'une séquence nucléotidique donnée (Böhm et al., 1997). La présence des 4 résidus ultra conservés C28, C31, H44, et H50 (relatifs à la séquence humaine) suggère fortement que la région N-terminale de KIN17 comporte un motif C_2H_2 de la levure jusqu'à l'homme. Cette hypothèse a été confirmée par Mazin *et al.*, qui ont montré que le « doigt de zinc » potentiel de la protéine KIN17 de souris était capable de lier l'ADN de manière dépendante aux ions Zn^{2+} (Mazin et al., 1994).

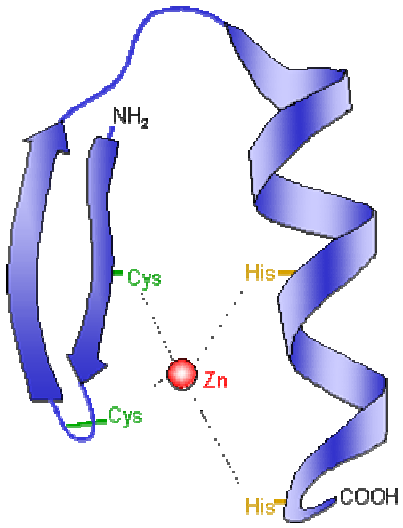


Figure 1.3 *: Représentation schématique d'un motif « doigt de zinc »*

● Entre les résidus 50 et 150, toutes les protéines KIN17 possèdent une région, qui, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* et le ver *Caenorhabditis elegans*, est prédite comme adoptant un repliement de type FF par le programme *SMART*. Les domaines de repliement FF sont des modules de liaison à des peptides phosphorylés trouvés dans de nombreuses protéines eucaryotes comme le facteur de transcription CA150 (Allen et al., 2002). Ceci suggère que les protéines KIN17 pourraient posséder un domaine de liaison à un motif phosphorylé. Cependant, ce type de repliement n'est pas prédit chez toutes les espèces qui ne contiennent pas tous les résidus décrits comme importants pour la structure en 3 hélices des domaines FF. D'autre part, la surexpression de plusieurs formes tronquées de KIN17 de souris chez *E. coli* a montré que la région 71-281 de KIN17 (relative à la séquence humaine) comportait un second domaine de liaison à l'ADN (Mazin et al., 1994). Or, les modules FF ne sont pas des domaines de liaison à l'ADN. Sur la base de ces résultats, l'existence d'un domaine FF chez KIN17 apparaît donc hypothétique.

● Enfin, les logiciels de détections de domaines ont mis en évidence l'existence d'un domaine additionnel d'environ 100 acides aminés contenant un motif appelé KOW (Kyrpides et al., 1996) dans la région C-terminale de KIN17 humaine absente chez les eucaryotes inférieurs. Ce module, également prédit dans les séquences KIN17 de ver, de plante, et de mammifère, est retrouvé dans une sous-famille des domaines TUDOR (Selenko et al., 2001). Les domaines TUDOR sont présents dans des protéines s'associant à l'ARN. Cependant, le rôle biologique des domaines TUDOR à motif KOW demeure obscur. De manière intéressante, les

chercheurs du LGR ont montré que la région C-terminale de KIN17 contenant le module KOW est impliquée dans la liaison à l'ARN (Pinon-Lataillade et al., 2004). Ceci conforte la prédiction des logiciels *SMART* et *Pfam*. Il est également à noter que la région C-terminale de KIN17 n'apparaît pas impliquée dans la liaison à l'ADN (Mazin et al., 1994).

3) Conclusions

Bien que plusieurs études aient montré l'importance de KIN17 dans la réplication et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, les fonctions précises et les partenaires biologiques de cette protéine nucléaire demeurent à ce jour inconnus. Dans le cas de KIN17, l'utilisation de logiciels bio-informatiques a permis de caractériser son organisation en plusieurs domaines structuraux qui semblent associés à différentes fonctions. Dans l'état actuel des connaissances, la caractérisation structurale de KIN17 apparaît indispensable dans l'optique de progresser vers la détermination de son rôle dans la régulation et la maintenance de l'ADN, de ses partenaires, et de ses modes d'action. C'est pourquoi, le Laboratoire de Structure des Protéines du CEA de Saclay (LSP) a entrepris une approche structurale par RMN et cristallographie des rayons X qui a pour objectif de résoudre la structure tridimensionnelle de la protéine KIN17 humaine. En raison de difficultés rencontrées pour surexprimer la protéine entière, cette caractérisation a été abordée par domaine. Sur la base des analyses bio-informatiques présentées précédemment, et à partir des diagrammes de prédiction de structure secondaire et de visualisation des amas de résidus hydrophobes (analyse HCA), trois domaines de la protéine KIN17 humaine ont été sélectionnés :

- Domaine K1 : région 270-390 contenant le module prédit KOW
- Domaine K2 : région 51-160 contenant le motif prédit FF
- Domaine K3 : région 1-160 contenant le motif prédit C_2H_2 et le domaine K2

En parallèle, une approche biochimique fonctionnelle a également été initiée afin de rechercher les partenaires biologiques de KIN17 et de chacun de ses 3 domaines structuraux.

Dans le cadre de ce projet, nous avons entrepris une collaboration avec les chercheurs du LSP afin de contribuer à améliorer la connaissance du mode de fonctionnement de la protéine KIN17 humaine, en nous intéressant plus particulièrement au domaine K2 correspondant à la région 51-160. La résolution de la structure tridimensionnelle de ce

domaine a ainsi été envisagée par Résonance Magnétique Nucléaire en solution. Cette étude a pour principal objectif d'émettre des hypothèses sur les fonctions potentielles adoptées par le domaine K2 de la protéine KIN17 humaine à partir de la connaissance de sa structure. Des études fonctionnelles d'interaction, réalisées en parallèle par les chercheurs du LSP sur les domaines K2 et K3, permettront d'étayer ou d'infirmer nos hypothèses structurales. A terme, l'interaction du domaine K2 avec un partenaire biologique pourra être facilement caractérisée par RMN, qui est une méthode de choix pour étudier les dynamiques moléculaires et les interactions entre molécules.

CHAPITRE 2

Production et analyses préliminaires du domaine K2 de la protéine humaine KIN17

1) Préparation des échantillons pour l'analyse RMN

1.1) Sélection et optimisation du système d'expression

Le Laboratoire de Marquage des Protéines du CEA de Saclay (LMP) a récemment élaboré un Programme de Production et Marquage des Protéines (3PM) qui a pour objectif de produire en grande quantité, chez la bactérie *E. coli*, des protéines solubles, pures, et sous forme native en vue de leur caractérisation structurale (Braud et al., 2005). La stratégie mise en œuvre pour obtenir de tels résultats a été présentée en détail dans le chapitre 4 de la première partie de ce manuscrit, consacrée à l'étude structurale de la protéine PRODH humaine. Elle repose notamment sur un criblage systématique de plusieurs conditions expérimentales. Toutes les étapes relatives au clonage, au criblage des conditions d'expression, à la production à grande échelle en milieu non marqué, et à la purification du domaine K2 ont été menées avec succès par les chercheurs du LMP dans le cadre de cette plate-forme de production. Ainsi, les quantités de protéine K2 soluble et pure obtenues à l'issue du processus 3PM étaient suffisantes pour envisager la préparation des échantillons pour l'analyse structurale.

La stratégie d'attribution de l'ensemble des raies de résonance RMN d'une protéine de 111 acides aminés comme K2 repose sur l'enregistrement d'expériences hétéronucléaires triple résonance (^{1}H, ^{15}N, ^{13}C), et nécessite la préparation d'échantillons uniformément marqués ^{15}N et ^{15}N / ^{13}C. En contrôlant de manière stricte les sources d'azote et de carbone d'un milieu de culture, il est possible de produire des protéines simplement ou doublement marquées de façon uniforme avec des rendements de marquage(s) isotopique(s) proches de 100%. Le contrôle total du milieu impose généralement des milieux pauvres (milieu minimum), dont le plus fréquent est le M9 (Maniatis et al., 1982). Par comparaison avec le LB, ce type de milieu est appauvri en métabolite, nécessite l'adaptation de l'hôte bactérien, et entraîne par conséquent une diminution de la croissance bactérienne, ainsi qu'une baisse du rendement de production. Pour pallier ces inconvénients, l'une des solutions consiste à enrichir le milieu M9 avec des vitamines et des oligo-éléments qui contiennent peu d'atomes de carbone et d'azote (Jansson et al., 1996). D'autre part, il existe des milieux riches contenant une réserve de métabolites bio-disponibles et adaptés au(x) marquage(s) isotopique(s) uniforme(s) (Reilly & Fairbrother, 1994). Ces milieux sont pour le plus souvent issus d'un hydrolysat de microorganismes photosynthétiques, ce qui est le cas du milieu

Algone préparé au LMP à partir de cultures de cyanobactéries *Spirulina maxima* doublement marquées ^{15}N / ^{13}C de manière uniforme.

La modification d'une condition expérimentale telle que le milieu de culture peut nuire à la qualité du profil d'expression d'une protéine. Par conséquent, il est nécessaire d'entreprendre une seconde étape d'optimisation de l'expression de K2 en milieux marqués avant de préparer les échantillons RMN. Celle-ci a été réalisée en milieu minimum sur la base des meilleurs résultats obtenus à l'issue du criblage des conditions d'expression en microplaques, puis en milieu Algone.

1.1.1) Résultats du criblage des conditions d'expression en microplaques

Le domaine K2 de la protéine KIN17 a été exprimé dans 30 conditions expérimentales différentes : 5 partenaires de fusion (His, Gb1, ZZ, GST, et Trx), 3 souches d'expression (BL21 Star, BL21 AI, et Rosetta DE3), et 2 températures (37°C et 20°C). Bien que les 3 souches testées conduisent globalement à de bons taux d'expression et de solubilité, les meilleurs résultats ont été obtenus en souche Rosetta (DE3). Le tableau 2.1 présente les taux de protéines soluble et insoluble obtenus dans cette souche après analyse sur gel SDS-PAGE.

K2	His		Gb1		ZZ		GST		Trx	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
37°C	+	+	++(+)	++	++	+++	+	+++	+	+(+)
20°C	++	+++	+	+	+++	+	+++	++	++++	+(+)

***Tableau 2.1** : Analyse de l'expression et de la solubilité des protéines de fusion K2 en souche Rosetta. Après dépôt des fractions soluble (S) et insoluble (I) sur gel SDS-PAGE, chaque bande de surexpression a été analysée, et une valeur semi-quantitative a été associée à son intensité, de faible (+) à très forte (++++). Les meilleures conditions sont mises en évidence par une coloration orange.*

Au vu de ces résultats, on constate que la nature du partenaire de fusion combinée à la température d'expression a un effet notable sur la solubilité des protéines hétérologues K2. Ainsi, les meilleurs taux d'expression de protéine soluble ont été obtenus à 20°C et lorsque K2 est en fusion avec les partenaires ZZ, GST, ou Trx. Au final, l'association partenaire Trx,

souche Rosetta, et température de 20°C constitue la meilleure condition d'expression à l'issue du criblage à moyen débit proposé par le programme 3PM.

1.1.2) Optimisation de l'expression en milieu minimum et milieu riche

a) Optimisation en milieu minimum non marqué

L'expression de K2 en milieu minimum M9 non-marqué a été menée en volume de 100 mL dans des erlenmeyers de 1 L. Les 3 meilleures conditions déterminées précédemment ont été testées ; la protéine K2 a été exprimée en fusion avec respectivement, GST, Trx, et ZZ, en souche Rosetta (DE3) cultivée à 20°C. Pour chaque construction, les étapes principales du protocole d'expression sont les suivantes :

La souche Rosetta (DE3) est transformée par le plasmide d'expression d'intérêt, puis mise en culture en milieu LB à 37°C. Après quelques heures, une préculture en milieu minimum est ensemencée puis incubée à 37°C sous agitation. La culture d'expression de 100 mL est inoculée avec un volume de préculture, et l'expression de K2 est induite à 20°C pendant 14 heures par ajout de 1mM d'IPTG lorsque la DO_{600} atteint 1.2. Les culots bactériens sont repris et lysés dans un tampon phosphate, et après centrifugation, les fractions soluble et insoluble sont analysées sur gel SDS-PAGE (Figure 2.1).

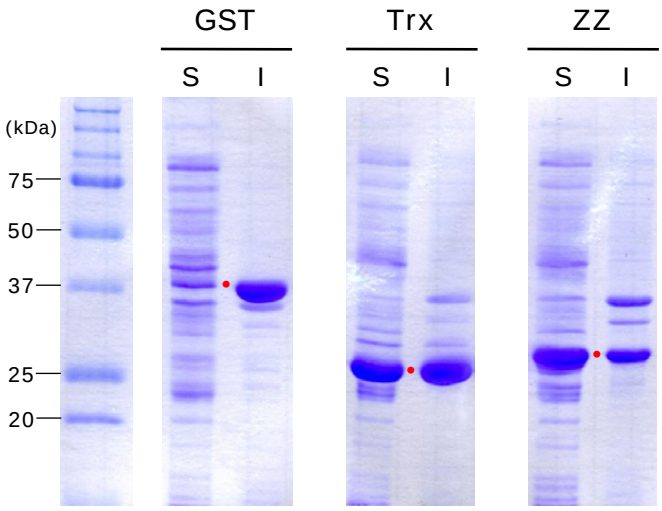


***Figure 2.1** : Expression des protéines de fusion GST-K2 (43.2 kDa), Trx-K2 (28.7 kDa), et ZZ-K2 (33.3 kDa) en souche Rosetta cultivée à 20°C en milieu minimum non marqué. Analyse SDS-PAGE des fractions soluble (S) et insoluble (I) pour les 3 partenaires testés. Les protéines de fusion sont mises en évidence par des points rouges.*

De manière intéressante, les profils d'expression obtenus en milieu minimum divergent significativement de ceux obtenus en milieu LB. La différence la plus spectaculaire concerne la fusion GST qui conduit à une expression de protéine très majoritairement insoluble en milieu minimum. L'expression de K2 en fusion avec Trx est tout à fait remarquable en milieu minimum, aussi bien dans la fraction soluble, que dans la fraction insoluble. On retrouve ce résultat pour le partenaire ZZ, bien que l'expression sous forme soluble soit plus importante que sous forme insoluble.

Les fusions ZZ et Trx conduisant à des taux d'expression de protéine soluble comparables, le choix du partenaire a été guidé par d'autres considérations. Ainsi, l'apparition d'un trouble persistant dans la fraction soluble de K2 fusionnée à Trx a révélé une propension lente à l'agrégation de cette construction. De plus, en anticipant sur la purification de la protéine hétérologue, les résines d'affinité spécifique à ZZ s'avèrent moins coûteuses que celles spécifique au partenaire Trx. Par conséquent, nous avons choisi de préparer les échantillons marqués pour l'analyse RMN en produisant le domaine K2 en fusion avec le partenaire ZZ en souche Rosetta (DE3) cultivée à 20°C.

b) Optimisation en milieu Algone doublement marqué ^{15}N / ^{13}C

Bien que préparé au LMP, l'Algone est un milieu riche très onéreux. Afin de réduire les coûts de production de l'échantillon doublement marqué ^{15}N / ^{13}C, ce milieu peut être dilué avec de l'eau MilliQ. Toutefois et à l'image des milieux pauvres, une diminution de la réserve métabolique du milieu de culture, entraînée par une dilution, peut avoir pour conséquence une modification du profil d'expression de la protéine recombinante. L'optimisation de l'expression de K2 en milieu Algone a ainsi pour objectif de déterminer le milieu le plus dilué permettant d'obtenir le meilleur taux de protéine soluble.

La production de K2 fusionnée à ZZ en souche Rosetta (DE3) cultivée à 20°C a été menée en volume de 30 mL dans des erlenmeyers de 300 mL. Trois dilutions d'Algone 1/3, 1/2, et 2/3 ont été testées, ainsi que le milieu Algone 100 %. Les résultats de cette optimisation mettent en évidence que le profil d'expression de la protéine de fusion ZZ-K2 en milieu Algone est quasiment identique à celui obtenu en milieu minimum non marqué, quelle que soit la dilution (Figure 2.2).

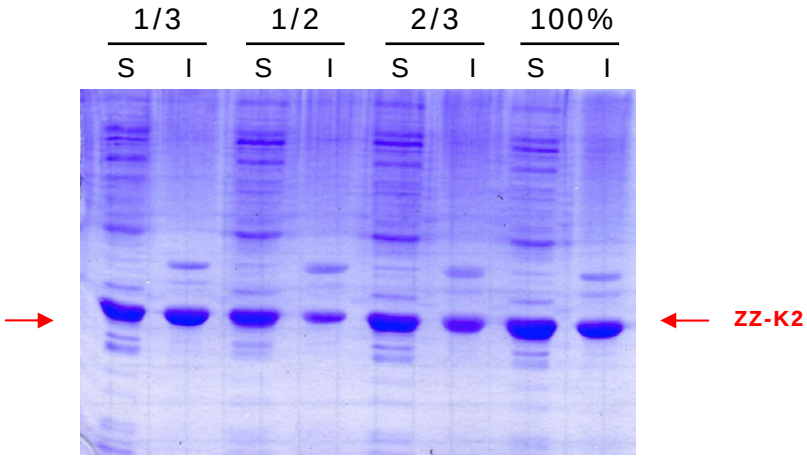


***Figure 2.2** : Optimisation de l'expression de K2 en milieu Algone (fusion ZZ, souche Rosetta cultivée à 20°C). Analyse SDS-PAGE des fractions soluble (S) et insoluble (I) correspondant à différentes dilutions du milieu Algone avec de l'eau milliQ (1/3, 1/2, 2/3, et 100 % Algone).*

Au vu des résultats de l'optimisation de l'expression de K2 en milieu minimum et milieu riche, il a été décidé de produire la protéine K2 doublement marquée ^{15}N / ^{13}C en milieu Algone dilué au 1/3, et K2 simplement marqué ^{15}N, en milieu minimum.

1.2) Obtention de K2 simplement marquée ^{15}N et doublement marquée ^{15}N / ^{13}C

1.2.1) Stratégie générale

Cette stratégie a été présentée en détail dans le chapitre 4 de la première partie de ce manuscrit. Par conséquent, je me contenterai de rappeler ses points essentiels.

Le plasmide d'expression de ZZ-K2 encode une protéine qui contient, une étiquette de 6 résidus histidine (6xHis), le partenaire de fusion ZZ, le site de reconnaissance TEV (sTEV), et le domaine K2. La construction obtenue est de la forme 6xHis-ZZ-sTEV-K2 pour un poids moléculaire de 33 kDa. La préparation de l'échantillon débute par la production de plusieurs litres de protéine de fusion. Après lyse des membranes bactériennes et extraction des protéines cytosolubles, les surnageants sont déposés sur colonne d'affinité spécifique au fragment protéique ZZ. Cette étape permet, dans un premier temps, d'éliminer les protéines endogènes de *E. coli*, puis de cliver le partenaire ZZ par une coupure sur colonne avec la protéase recombinante 6xHis-TEV (produite au laboratoire). Lors de l'élution de la protéine K2 clivée, le partenaire ZZ est retenu par la résine d'affinité. Une seconde étape de purification est alors réalisée sur résine de nickel. Contrairement aux protéines résiduelles

6xHis-ZZ-sTEV-K2 et 6xHis-ZZ, et à la protéase 6xHis-TEV, la protéine K2 ne comporte plus d'étiquette 6xHis après clivage de son partenaire. Elle ne doit donc pas être retenue par la résine de nickel et peut être séparée de la protéase 6XHis-TEV, ainsi que des 2 protéines résiduelles. Au final, les échantillons RMN sont obtenus après concentration sur cellule Amicon.

1.2.2) Production de la protéine de fusion en milieu minimum et milieu Algone

La première étape de préparation des échantillons de protéine K2, enrichie en isotopes ^{15}N et ^{15}N / ^{13}C, a consisté à produire la protéine de fusion dans 3 L de chaque milieu de culture marqué (milieu minimum marqué ^{15}N, et milieu Algone doublement marqué ^{15}N / ^{13}C dilué au 1/3). Le protocole d'expression résumé en Figure 2.3 a été préalablement mis au point en petit volume.

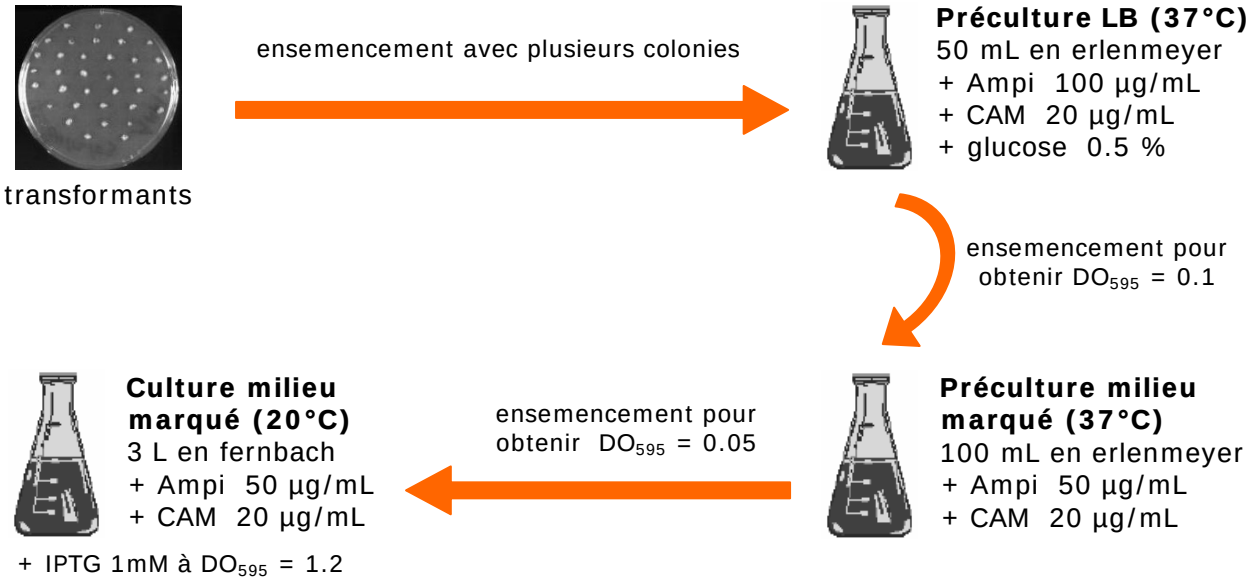


***Figure 2.3** : Protocole de surexpression de K2 en milieu marqué (milieu minimum marqué ^{15}N, ou milieu Algone doublement marqué ^{15}N / ^{13}C dilué au 1/3).*

La souche Rosetta transformée par le vecteur d'expression encodant la protéine de fusion est étalée sur boîte LB-agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Ampi) et 20 µg/mL de chloramphénicol (CAM), puis incubée à 37°C pendant 14 heures. Plusieurs colonies sont mises en préculture dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 50 mL de LB, 100 µg/mL d'Ampi, 20 µg/mL de CAM, et 0.5 % de glucose. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 3 heures sous une agitation de 250 rpm. 100 mL de milieu marqué contenant 50 µg/mL d'Ampi

et 20 µg/mL de CAM sont introduits dans un erlenmeyer de 1 L, puis ensemencés avec un volume de préculture LB de manière à obtenir une DO initiale à 600 nm égale à 0.1. Cette deuxième préculture est ensuite incubée à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant 6 heures. 3 L de milieu marqué contenant 50 µg/mL d'Ampi et 20 µg/mL de CAM sont alors répartis dans 3 fernbachs de 1 L, préchauffés à 37°C, puis ensemencés pour obtenir une DO initiale à 595 nm égale à 0.05. Les cultures d'expression sont ensuite placées à 37°C sous une agitation de 250 rpm. L'expression de la protéine de fusion K2 est induite par ajout de 1mM d'IPTG dans les milieux de culture lorsque la DO mesurée à 595 nm atteint 1.2. Les fernbachs sont ensuite incubés à 20°C sous une agitation de 250 rpm pendant 14 heures. A l'issu de ce délai, la croissance bactérienne est stoppée en introduisant les fernbachs de culture dans la glace.

La lyse des cellules procaryotes et l'extraction des protéines ont été menées de la manière suivante. Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 2830xg pendant 20 minutes à 4°C. Après élimination des surnageants, les culots bactériens sont soumis à un cycle de congélation-décongélation dans l'azote liquide. Ils sont ensuite resuspendus dans un tampon Tris contenant, 100 mM de Tris-HCl (pH=8.0), 150 mM de NaCl, 5 % de glycérol, 1 mM d'EDTA, et 1 mM de PMSF. La rupture des membranes bactériennes est réalisée par lyse mécanique en utilisant une presse d'Eaton. 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$, et 0.5 µL/mL de benzonase sont ensuite introduits dans les lysats. Les fractions soluble et insoluble sont finalement séparées par centrifugation à 40000xg pendant 30 minutes à 4°C.

L'expression soluble de K2 en fernbach a été contrôlée sur gel SDS-PAGE pour chacune des 3 cultures contenant 1 L de milieu marqué, et pour chaque milieu de culture. Comme le montre la Figure 2.4, les niveaux d'expression obtenus sont très satisfaisants en milieu minimum ^{15}N et en milieu Algone ^{15}N / ^{13}C. Ces profils d'expression sont tout à fait comparables à ceux obtenus lors des tests d'optimisation.

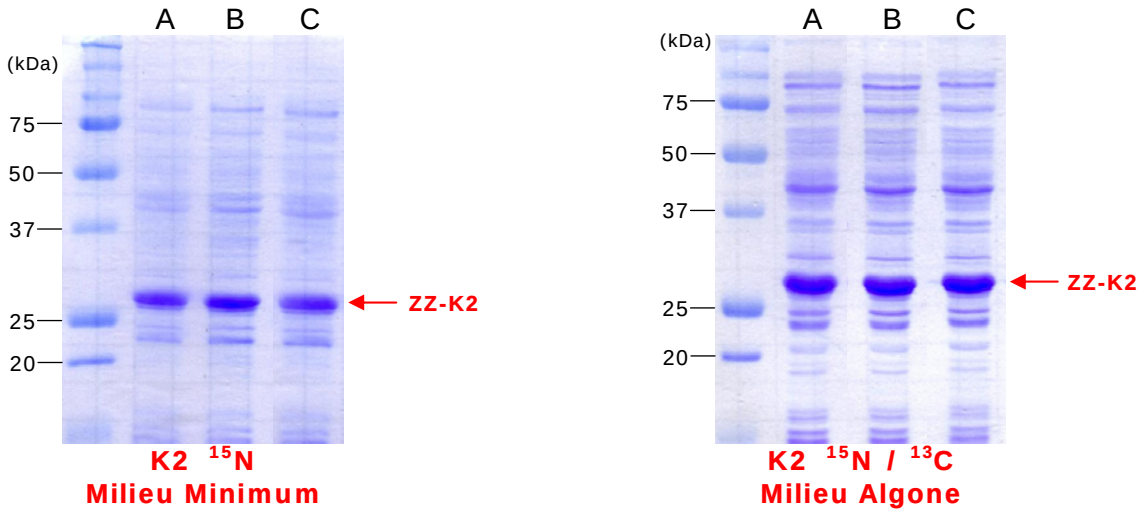


Figure 2.4 *: Contrôle de la production de la protéine de fusion K2 sous forme soluble en milieu minimum marqué ^{15}N et en milieu Algone ^{15}N / ^{13}C pour chaque litre de culture en fernbach A, B, et C (analyse SDS-PAGE).*

1.2.3) Purification de la protéine de fusion et clivage de son partenaire

La purification de la construction 6xHis-ZZ-sTEV-K2 (ZZ-K2) a été entreprise par chromatographie d'affinité sur résine *IgG Sepharose 6 Fast Flow* (Amersham). Cette résine d'anticorps humains IgG greffés lie de manière spécifique les fragments protéiques de type ZZ. La colonne est préalablement équilibrée avec la solution tampon Tris Saline Tween (TST) contenant, 50 mM de Tris (pH=7.5), 150 mM de NaCl, 0.05 % de Tween 20, 1 mM de PMSF, et 0.2 mM d'EDTA. Après injection des surnageants de lyse bactérienne, la colonne est rincée plusieurs fois avec du tampon d'équilibration TST jusqu'à retour de l'absorbance mesurée à 280 nm à la ligne de base. La résine est alors resuspendue dans du tampon TST et 2.6 mL de protéase recombinante TEV à 1.8 mg/mL sont introduits dans la colonne. Après une nuit sous agitation à 4°C, la solution de clivage contenue dans la colonne est éluée avec du TST en fractions de 30 mL. L'élution des protéines immobilisées à la résine est menée par introduction de plusieurs volumes d'acide acétique 0.5 M (pH=3.4). Toutes les fractions d'élution sont déposées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE et quantifiées par mesure de l'absorbance à 280 nm sur un spectromètre UV. Le pH des fractions d'acide acétique est préalablement neutralisé avant analyses.

L'analyse SDS-PAGE des fractions de clivage fait apparaître une bande de forte intensité à une masse apparente de 13 kDa (Figure 2.5). Cette masse correspond au poids

moléculaire du domaine K2 (13.6 kDa), ce qui indique que la protéine de fusion a été clivée par la protéase TEV. Le tampon acide acétique n'étant pas très adapté à la migration sur gel d'électrophorèse, les bandes protéiques des fractions d'élution apparaissent floues et peu intenses. Il est donc difficile de réaliser une observation fine des protéines présentes dans ces fractions et de calculer un rendement de coupure. On peut toutefois observer des nuances de coloration à des masses apparentes qui correspondent au partenaire ZZ clivé (20 kDa), et à la protéine de fusion (33 kDa), ce qui démontre que la coupure sur colonne n'est pas totale.

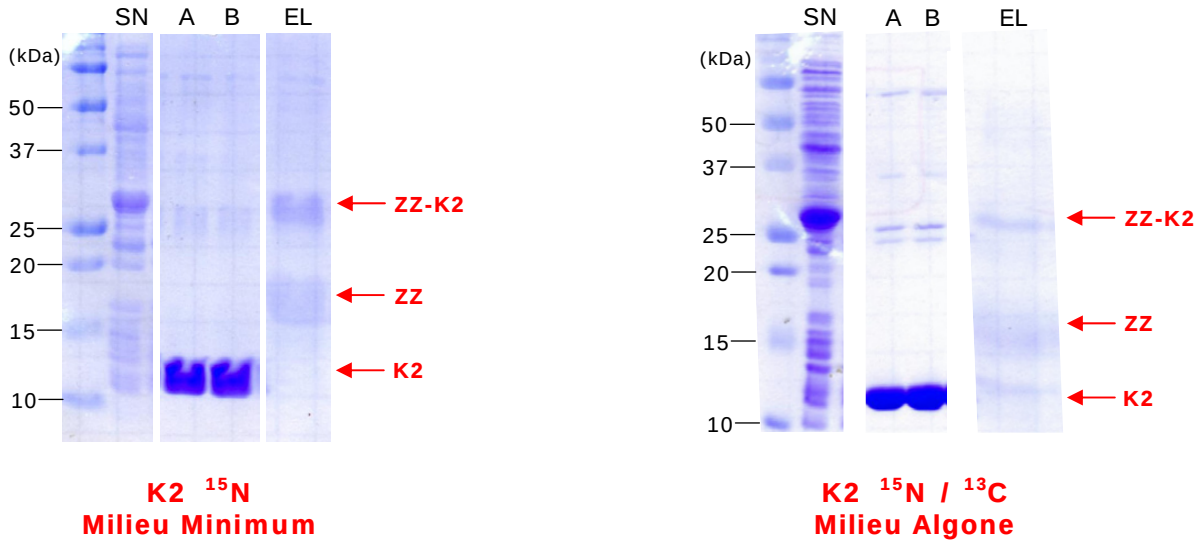


***Figure 2.5** : Purification de la protéine de fusion K2 sur IgG Sepharose et coupure sur colonne du partenaire ZZ. Analyse SDS-PAGE du surnageant de lyse bactérienne (SN), des fractions de clivage (A et B), et des fractions d'élution à l'acide acétique (EL).*

Au final, les rendements obtenus sont très satisfaisants et atteignent, 30 mg/L en milieu minimum, et 25 mg/L en milieu Algone. A l'issu de cette première étape, le degré de pureté de K2 est estimé à 90% bien que quelques bandes contaminantes de faible intensité soient observables dans les fractions de clivage.

1.2.4) Purification du domaine K2

La seconde étape de purification de la protéine K2 a été réalisée par chromatographie de pseudo-affinité sur colonne *Ni-NTA Agarose* chargée en ions Ni^{2+} (Qiagen). La colonne est équilibrée avec un tampon phosphate (50 mM, pH=7.2) contenant, 300 mM de NaCl, 4mM de β-mercapto-éthanol, et 1mM de PMSF. Les échantillons de K2 en solution dans du TST sont directement chargés dans la colonne, et plusieurs volumes de tampon phosphate sont

introduits jusqu'à retour de l'absorbance mesurée à 280 nm à la ligne de base. L'élution est menée par gradient linéaire d'imidazole avec du tampon phosphate contenant de 10 à 500 mM d'imidazole. Les fractions d'élution sont analysées sur gel SDS-PAGE (Figure 2.6) et quantifiées par mesure de l'absorbance à 280 nm.

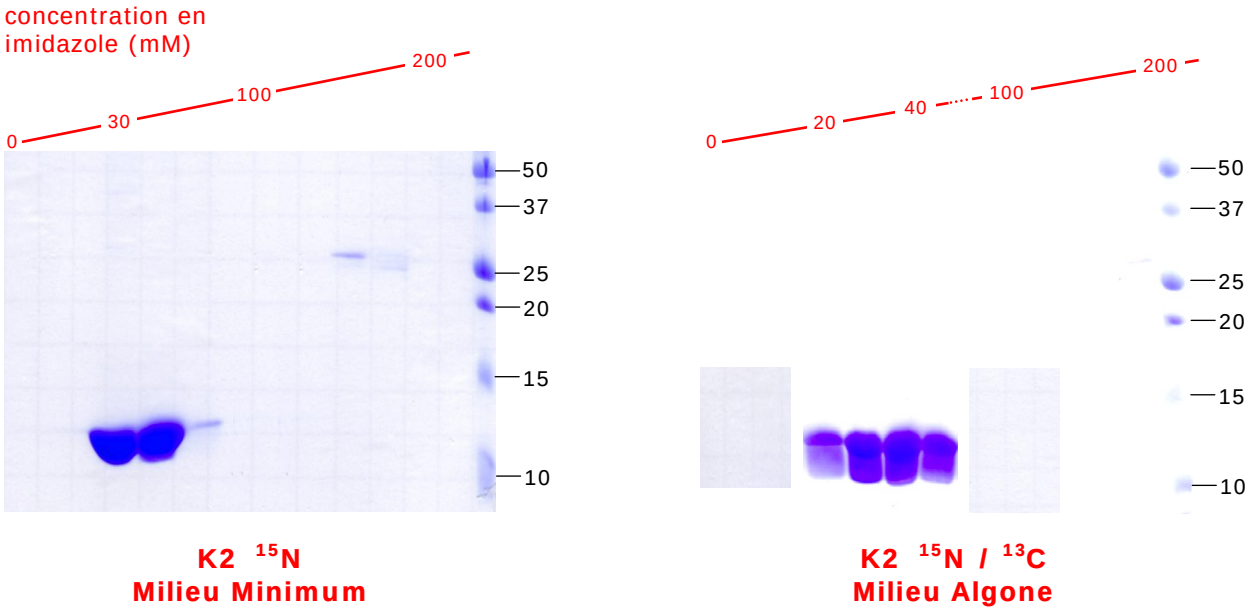


***Figure 2.6** : Purification de K2 sur Ni-NTA Agarose. Analyse SDS-PAGE des fractions d'élution par gradient linéaire d'imidazole (de 0 à 200 mM). La présence de « traînées » en dessous de la bande correspondant à la protéine K2 sur le gel de droite est due à un problème de migration.*

L'analyse SDS-PAGE des fractions d'élution fait apparaître que la protéine K2 est retenue par la résine de nickel jusqu'à des concentrations d'imidazole de l'ordre de 30 mM. Sur les 4 histidines que compte K2, les 3 résidus H52, H55, et H57 sont proches dans la séquence primaire. Par conséquent, ce type de fixation non spécifique, à des concentrations d'imidazole relativement faibles, s'explique probablement par la présence d'un amas, contenant ces 3 histidines, situé en surface de K2. Deux bandes protéiques, de masse apparente autour de 30 kDa, sont observables dans les fractions contenant une concentration d'imidazole d'environ 150 mM, et correspondent à la protéase 6xHis-TEV (27kDa), et à la protéine de fusion 6xHis-ZZ-sTEV-K2 (33 kDa).

Les rendements de l'expression du domaine K2 obtenus à l'issu de cette seconde étape de purification sont très satisfaisants car peu de protéine a été perdue (Tableau 2.2). De plus,

aucune bande contaminante n'est clairement discernable sur l'analyse SDS-PAGE des fractions de K2. Par conséquent, nous pouvons estimer avoir préparé des échantillons simplement et doublement marqués avec un degré de pureté supérieur à 95%.

Milieu	Milieu Minimum ^{15}N	Milieu Algone ^{15}N / ^{13}C
A) Rendement *IgG*	30 mg/L	25 mg/L
B) Rendement final	**26 mg/L**	**22 mg/L**

***Tableau 2.2** : Rendements de l'expression de K2, après purification sur IgG Sepharose et coupure sur colonne du partenaire (A), et à l'issu de la 2nde purification sur résine Ni^{2+} (B).*

1.2.5) Préparation du tube RMN

La dernière étape de préparation de l'échantillon pour l'analyse RMN a consisté à concentrer la protéine à une valeur proche de 1 mM. L'ultrafiltration de K2 a été menée sur cellule Amicon de 10 mL équipée d'une membrane YM3 avec un seuil de coupure de 3 kDa. Afin de réduire la concentration en NaCl et d'éliminer l'imidazole, plusieurs étapes de lavage-concentration ont précédé la concentration finale de K2. A l'issue de l'ultrafiltration, la protéine est en solution dans un tampon phosphate (50 mM, pH=7.0) contenant, 150mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 1 mM de TCEP, et 1 mM de PMSF. L'échantillon RMN est alors obtenu en ajoutant 10% de D_2O, 2 mM de TSP, 2 mM de cocktail d'inhibiteurs (SIGMA), et 0.01% de NaN_3. 600 µL de cette préparation ont été introduits dans un tube RMN de 5 mm de diamètre placé ensuite sous atmosphère d'argon.

2) Caractérisations préliminaires

2.1) Caractérisation de la séquence primaire et contrôle du marquage

Avant de débuter l'analyse structurale de K2 par RMN, nous avons voulu nous assurer de la fiabilité et de l'efficacité de la méthode employée pour obtenir les échantillons de protéine. La séquence primaire des protéines K2 simplement et doublement marquée a été contrôlée par spectrométrie de masse ITD-MS (Ion Trap Detector-Mass Spectroscopy) sous ionisation par ESI (ElectroSpray Ionization).

Après concentration sur cellule Amicon, 2 µL d'un échantillon de K2 ont été prélevés et introduits dans une solution contenant, 100 µL d'H_2O, 100 µL d'acétonitrile, et de l'acide formique (0.25% pour K2 ^{15}N, et 0.75% pour K2 ^{15}N / ^{13}C). 10 µL de ce mélange contenant environ 15 ng/µL de K2 ont ensuite été injectés dans la source ESI, puis analysés avec un enregistrement de 20 accumulations. Les spectres obtenus sont présentés en Figure 2.7 et les résultats sont regroupés dans le Tableau 2.3.

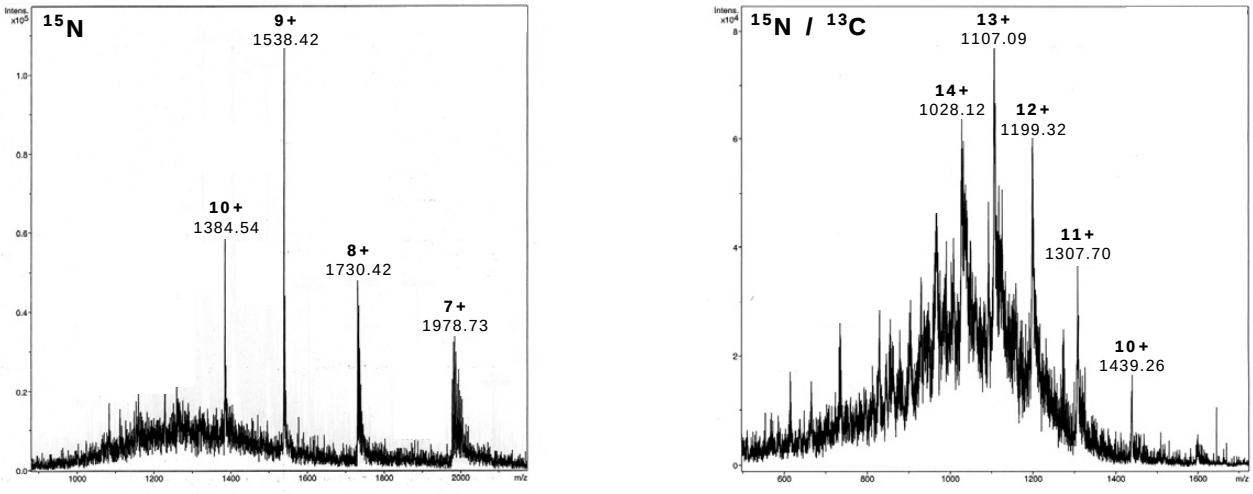


***Figure 2.7** : Analyse ESI-ITD-MS des échantillons de K2 ^{15}N et K2 ^{15}N / ^{13}C.*

Le spectre de masse de K2 simplement marqué ^{15}N fait apparaître une enveloppe d'ions multichargés centrée autour d'un ion nonachargé. La déconvolution de cette enveloppe permet de conclure à la présence d'une forme unique de masse expérimentale 13836 ± 3 Da. Cette masse correspond tout à fait à celle attendue et indique que la protéine simplement marquée ^{15}N a été produite avec un enrichissement isotopique total ou quasi-total.

Sur le spectre de l'échantillon doublement marqué, on observe la présence d'un massif isotopique pour chaque multichargé. L'apparition de ces amas traduit l'existence de plusieurs formes isotopiques de K2, et suggère que le double marquage n'est pas total. La déconvolution automatique d'un tel spectre n'étant pas possible, nous avons réalisé une déconvolution manuelle de chaque pic majoritaire correspondant aux 4 ions multichargés les plus intenses. Les résultats obtenus indiquent que la forme isotopique prédominante possède une masse expérimentale de 14379 ± 3 Da pour une masse attendue de 14445 Da. Le taux d'enrichissement isotopique de l'échantillon ^{15}N / ^{13}C peut donc être estimé à 92%.

Echantillon	masse théorique [Da]	masse expérimentale (déconvolution) [Da]	taux d'enrichissement
K2 ^{15}N	13838,9	13836 ± 3	**~ 100 %**
K2 ^{15}N / ^{13}C	14445,3	14379 ± 3	**~ 92 %**

***Tableau 2.3** : Caractérisation de la production des échantillons de K2 simplement et doublement marqués par analyse ESI-ITD-MS. Les masses théoriques sont indiquées en considérant un enrichissement isotopique de 100%.*

2.2) Caractérisation de l'état oligomérique

Une fois le poids moléculaire du domaine protéique vérifié par spectroscopie de masse, nous avons entrepris une analyse par chromatographie de gel filtration afin de caractériser l'état oligomérique de K2 en solution. Cette technique chromatographique d'exclusion permet de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire, et cela en conditions non dénaturantes en choisissant un tampon d'équilibration adapté.

La colonne de filtration sur gel que nous avons utilisée est une colonne *Superdex75 HR analytique* (Pharmacia) de 24 mL dont la gamme de résolution se situe entre 70 et 3 kDa. 200 µL d'un échantillon concentré de protéine doublement marquée ^{15}N / ^{13}C (soit environ 300 µg) ont été introduits dans cette colonne préalablement équilibrée avec une solution tampon de PBS (Phosphate Buffer Saline : 150 mM NaCl, 10 mM phosphate, 2.5 mM KCl, pH 7.4). L'élution des protéines a été détectée par suivi de l'absorbance à 280 nm. En amont de l'analyse de K2, la Superdex75 a été étalonnée dans les mêmes conditions avec un kit de calibration contenant un mélange de protéines standard.

Le chromatogramme de l'analyse de K2 doublement marquée fait apparaître un pic ultra majoritaire à un volume d'élution de 12.22 mL (Figure 2.8A). En se basant sur les volumes de rétention des protéines standard, ce volume correspond à un poids moléculaire d'environ 18 kDa pour une masse théorique monomérique attendue de 14.5 kDa. Il semble donc que la structure quaternaire du domaine K2 soit monodisperse et sous forme monomérique dans ces conditions d'analyse très proches des conditions RMN. Ce résultat est cependant nuancé par l'apparition d'un petit pic à 10.39 mL (~38 kDa) qui pourrait correspondre à une forme dimérique très minoritaire, ou à une impureté non observable sur le gel SDS-PAGE (Figure 2.8B). Par ailleurs, la chromatographie de gel filtration est certes une technique simple et rapide, mais elle ne fournit qu'une indication de l'organisation quaternaire d'une protéine dans un tampon donné. Ce résultat doit donc être considéré avec précaution ou confirmé par des études plus précises de diffusion de la lumière ou d'ultracentrifugation analytique.

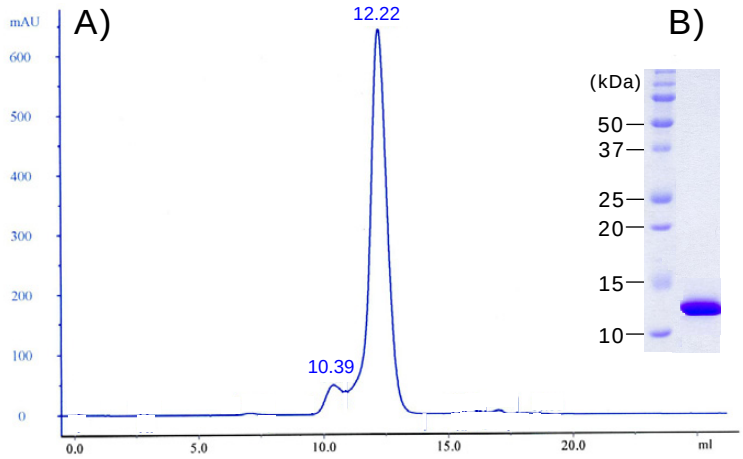


***Figure 2.8** : Caractérisation de la structure quaternaire de K2 ^{15}N / ^{13}C. A) chromatogramme de l'analyse par gel filtration en conditions non dénaturantes. B) analyse SDS-PAGE du même échantillon (conditions dénaturantes).*

2.3) Caractérisation de la structure secondaire et tertiaire

Le dichroïsme circulaire (DC) est une méthode simple et sensible qui permet d'évaluer le niveau de structuration d'un polypeptide. La technique repose sur les propriétés spectroscopiques des molécules chirales qui absorbent les composantes polarisées circulaires droite et gauche de la lumière de manière inégale. Dans le cas des protéines, le phénomène de dichroïsme circulaire est essentiellement dû à leur structure secondaire dans l'UV lointain

(région dominée par l'absorption des liaisons peptidiques), et à leur structure tertiaire dans l'UV proche (région dominée par l'absorption des cycles aromatiques). Aussi, chaque type de conformation présente un profil d'absorption qui lui est propre (Yang et al., 1986).

Selon ce principe, l'analyse des spectres de DC permet de distinguer sans aucune ambiguïté une protéine repliée d'une protéine non structurée. C'est dans cette optique que nous avons entrepris l'analyse du domaine K2 par dichroïsme circulaire. Les spectres de DC ont été enregistrés sur un échantillon de K2 non marquée afin de vérifier la structuration de la protéine avant de la produire en grande quantité en milieu minimum et Algone.

L'analyse a été menée à 25°C en solvant H_2O contenant 50 mM de tampon phosphate à pH 7.0, et 200 mM de NaCl. Le spectre enregistré dans l'UV lointain présente un minimum à 208 nm spécifique de la conformation hélicoïdale (Figure 2.9). Cependant, aucun autre minimum n'est clairement discernable dans la région autour de 222 nm. Ce profil d'absorption est caractéristique d'une protéine structurée en partie en hélice α et en feuillet β (Venyaminov & Yang, 1996). Par ailleurs, le signal d'un spectre DC enregistré dans l'UV proche est généralement très faible en absence de conformation ordonnée. Dans le cas de la protéine K2, deux minima intenses apparaissent à 279 et 288 nm et correspondent à l'absorption de cycles aromatiques de tyrosine et de tryptophane d'une protéine adoptant une structure tertiaire stable.

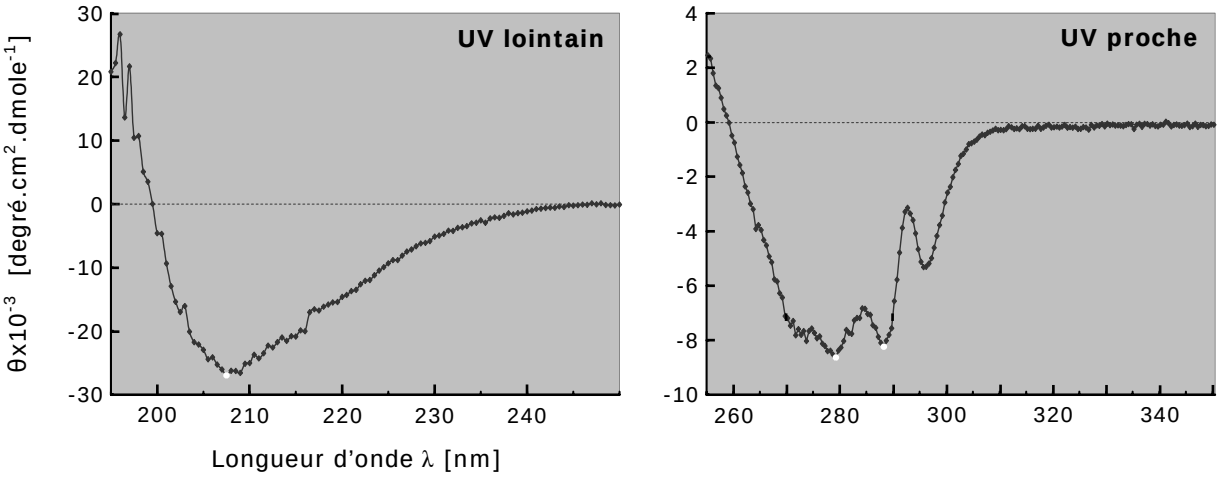


***Figure 2.9** : Spectres de dichroïsme circulaire enregistrés sur un échantillon de protéine K2 non marquée solubilisée dans un tampon phosphate à pH 7.0 et à 25°C.*

2.4) Etude préliminaire par Résonance Magnétique Nucléaire

2.4.1) Enregistrement des premières expériences

Dans l'optique de confirmer les résultats obtenus par dichroïsme circulaire, nous avons débuté l'étude RMN par l'enregistrement des spectres 1D ^{1}H et 2D HSQC ^{15}N-^{1}H sur un échantillon de protéine simplement marquée ^{15}N. Ces expériences ont été réalisées sur un spectromètre 600 MHz équipé d'une cryosonde *TXI* triple résonance dans les conditions initiales suivantes : une température de 20°C, un tampon phosphate de pH 7.0, et une concentration de protéine d'environ 0.7 mM.

Une protéine structurée présente une signature très différente d'une protéine peu ou pas structurée sur un spectre HSQC ^{15}N-^{1}H du fait de la variation de l'environnement chimique induite par les structures secondaire et tertiaire. La dispersion globale des pics de corrélation sur le spectre HSQC de K2 confirme que la protéine est repliée (Figure 2.10). Ainsi, les pics situés à gauche de la région centrale, à un déplacement chimique ^{1}H supérieur à 9 ppm, sont généralement caractéristiques d'une structuration en feuillet β. D'autre part, le spectre 1D ^{1}H fait apparaître des raies de résonance à un déplacement chimique négatif dans la région des protons aliphatiques. Ces observations sont typiques d'une protéine repliée adoptant des éléments de structure secondaire et tertiaire.

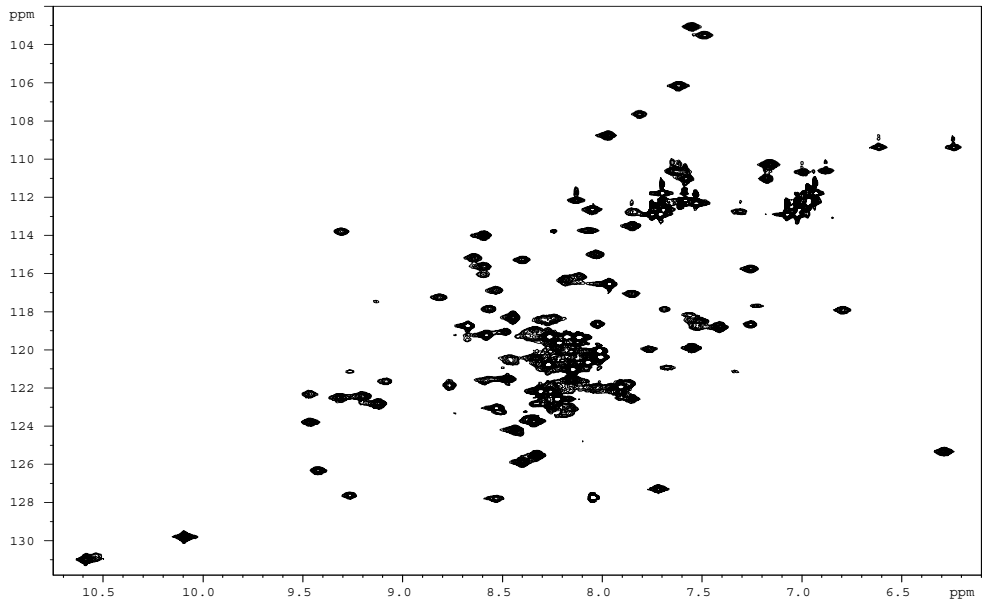


Figure 2.10 *: Spectre 2D HSQC ^{15}N-^{1}H de K2 simplement marqué ^{15}N (tampon phosphate, pH=7.0) enregistré sur un spectromètre 600 MHZ et à 20°C.*

Le nombre de pics de corrélation présents sur ce spectre est difficile à comptabiliser en raison d'une superposition importante dans la région centrale. Il est d'autant plus difficile à déterminer que la largeur des raies de résonance est importante à cette température. On peut toutefois estimer ce nombre proche de 100 sachant que le nombre de groupements amides attendu s'élève à 107 (111 résidus dont 3 prolines, et en considérant que le groupement amide NH_2 du premier résidu est généralement non observable).

Afin de déterminer si les conditions initiales choisies étaient adaptées à une étude complète par RMN, nous avons enregistré une première série de 4 expériences 3D hétéronucléaires sur un échantillon ^{15}N / ^{13}C de K2. Il s'agit des expériences 3D HNCO, HNCA, CBCA(CO)NH, et CBCANH, qui permettent l'attribution de la chaîne principale et des C_β. Pour chaque expérience, le nombre de pics qui apparaissent dans les spectres a été comptabilisé et figure dans le tableau 2.4. Bien que la HNCO soit l'expérience 3D la plus sensible, dans ces conditions d'analyse, 16 déplacements chimiques de carbonyle sont manquants. Les expériences HNCA et CBCA(CO)NH ne contiennent qu'environ 80% de données attendues. CBCANH, la moins sensible des 4 expériences, mais néanmoins majeure dans la stratégie d'attribution, ne contient qu'un peu plus du tiers de données attendues. Au final, la quantité d'information recueillie sur les spectres semble insuffisante pour envisager une attribution quasi-complète du squelette de K2. Par conséquent, nous avons conclu que les conditions initiales d'analyse (pH=7.0 et T=20°C) ne sont pas les plus adaptées pour attribuer l'ensemble des résonances ^{1}H, ^{15}N, et ^{13}C de la protéine K2.

Expériences	*nombre de pics attendus*	*nombre de pics observés*	**%**
HNCO	108	92	**85 %**
HNCA	216	174	**80 %**
CBCA(CO)NH	211	162	**77 %**
CBCANH	420	157	**37 %**

***Tableau 2.4** : Analyse des spectres HNCO, HNCA, CBCA(CO)NH, et CBCANH de K2 doublement marquée ^{15}N / ^{13}C (pH=7,0) enregistrés sur un spectromètre 600 MHZ et à 20°C.*

2.4.2) Optimisation des conditions de l'analyse par RMN

A ce stade de l'étude, une optimisation des conditions de l'analyse par RMN est apparue indispensable avant de débuter l'analyse d'une longue série d'expériences pouvant s'échelonner sur plusieurs semaines. Les deux principaux paramètres qui influent sur la qualité et la quantité de signal des spectres RMN sont le pH et la température.

L'absence d'une dizaine de corrélations de groupement amide sur le spectre HSQC de K2 peut être expliqué par un échange rapide de protons amides accessibles avec les protons de l'eau. La plupart des expériences 3D hétéronucléaires utilisées pour l'attribution reposent sur la corrélation d'un ou plusieurs atomes avec les noyaux ^{1}H et ^{15}N amides. Par conséquent, l'échange rapide des protons amides avec le solvant affecte également la quantité de signal sur ces spectres. Une diminution du pH de l'échantillon permet de réduire la vitesse de cet échange (Figure 2.11). Cette vitesse est minimum entre pH 3 et 4. Cependant, un pH trop acide peut déstabiliser le repliement et conduire à une déstructuration partielle ou totale de la protéine. L'optimisation de ce paramètre a donc pour objectif de déterminer la valeur de pH à laquelle l'information enregistrée est maximum et le risque de dénaturation minimum.

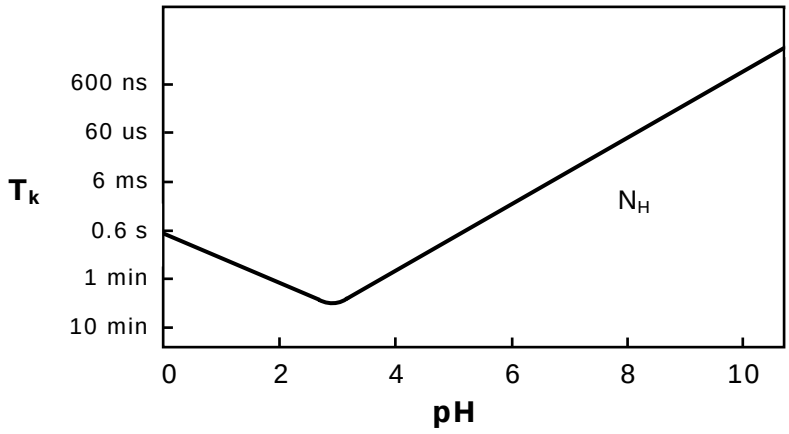


***Figure 2.11** : Influence du pH sur l'échange des protons amides accessibles au solvant. T_k représente le temps moyen d'échange de proton amide labile de polypeptide dans un solvant H_2O et à 25°C (d'après Wüthrich, 1986).*

Le spectre HSQC de K2 enregistré à 20°C présente une région centrale encombrée et peu résolue. La cause de ce manque de résolution est notamment imputable à la largeur de raie des pics de corrélation. Une augmentation de la température permet de réduire la viscosité de l'eau, et de raccourcir le temps de réorientation globale τ_c de la macromolécule. Ceci se

traduit par un affinement des raies, et donc par une amélioration de la résolution. De plus, l'augmentation de l'agitation brownienne peut influer sur la fréquence de résonance propre de certains noyaux et permettre l'éclatement d'un massif. Cependant, les échantillons de protéine sont généralement moins stables à haute température car la tendance à la dénaturation, et l'activité des protéases résiduelles issues de *E. coli*, sont alors plus prononcées. Comme pour le pH, le choix de la température doit donc résulter d'un compromis entre l'amélioration de la résolution spectrale et le risque associé de dénaturation.

L'influence du pH et de la température a été évaluée sur un échantillon de K2 simplement marqué ^{15}N concentré à 0.8 mM. Une série d'expériences HSQC ^{15}N-^{1}H a été entreprise sur un spectromètre 500 MHz dans 6 conditions expérimentales différentes. Chaque spectre a été enregistré et traité de la même façon et le nombre de pics (hors groupements NH ou NH_2 de chaîne latérale) a été comptabilisé pour chaque condition testée (Tableau 2.5).

Condition	pH=7.0		pH=6.5		pH=6.0	
	T=25°C	T=30°C	T=25°C	T=30°C	T=25°C	T=30°C
nb de pics	89	98	101	103	110	110

***Tableau 2.5** : Analyse des spectres 2D HSQC ^{15}N-^{1}H de K2 simplement marquée enregistrés sur un spectromètre 500 MHz dans différentes conditions de température et de pH.*

Tous les spectres HSQC enregistrés présentent le même profil, similaire à celui obtenu dans les conditions initiales. Par conséquent, la protéine K2 conserve un repliement stable aux différents pH et températures testés.

L'effet du pH sur la vitesse d'échange des protons amides de K2 est clairement visible sur les spectres HSQC. On observe bien une augmentation du nombre de résonances avec la diminution du pH. Jusqu'à 110 pics peuvent être comptabilisés à pH 6.0 pour un nombre attendu de 107. La figure 2.12 illustre l'influence de ce paramètre sur la région gauche du spectre qui fait apparaître de nouvelles taches de corrélation à pH plus acide. D'autre part, nous avons constaté que la diminution du pH permet d'accroître l'intensité de la majorité des raies de résonance de K2. Ce gain de signal est particulièrement intéressant dans l'optique de

recueillir davantage d'information sur les spectres 3D hétéronucléaires. L'effet de la température est également visible sur l'allure générale des spectres. La résolution de la région centrale croît avec l'augmentation de la température, ce qui permet de mieux distinguer les pics de corrélation.

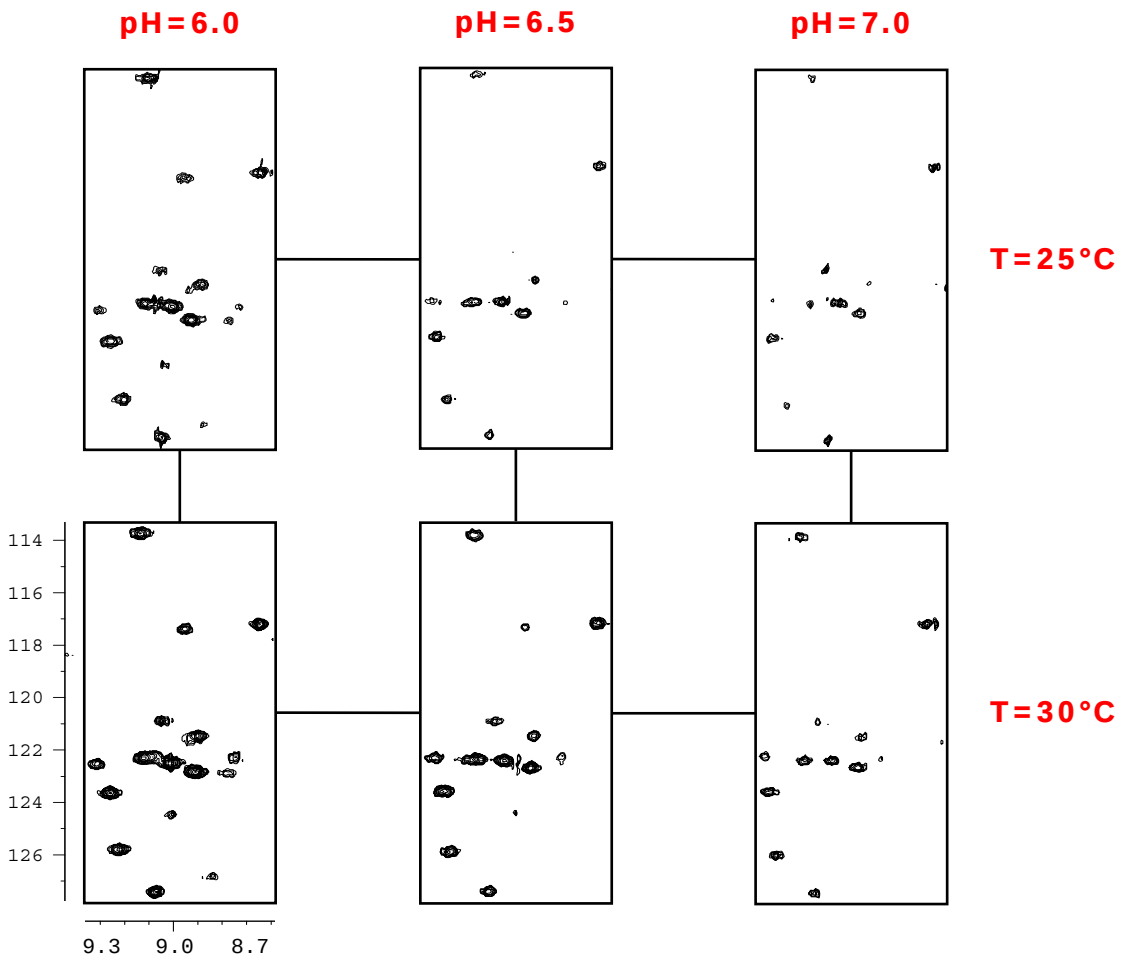


***Figure 2.12** : Extrait de spectres 2D HSQC ^{15}N-^{1}H de K2 simplement marquée ^{15}N enregistrés sur un spectromètre 500 MHz dans différentes conditions de température et de pH.*

Finalement, à la vue de l'ensemble de ces résultats, nous avons retenu comme conditions expérimentales, une température de **30°C**, et un pH de **6.0** pour mener l'étude structurale de K2 par RMN.

3) Conclusions

La stratégie de surexpression du domaine K2 dans le cadre d'une facilité de production à moyen débit s'est avérée très fructueuse. En effet, le criblage systématique de plusieurs conditions d'expression en amont de la production à grande échelle a permis d'augmenter les chances de déterminer une condition qui réponde aux exigences inhérentes à l'étude par RMN. Ainsi, nous avons préparé une quantité suffisante de protéine soluble simplement marquée ^{15}N, et doublement marquée ^{15}N / ^{13}C, pour envisager une attribution complète des noyaux ^{1}H, ^{15}N, et ^{13}C du domaine K2 (3 tubes simplement marqués ^{15}N à ~0.8 mM, et 3 tubes doublement marqués ^{15}N / ^{13}C à ~ 0.7 mM). De plus, les différentes analyses qui ont été menées montrent que la protéine est pure, stable, et structurée. D'un point de vue matériel, l'optimisation de l'expression en milieux marqués, associée aux choix portés sur les méthodes de purification, ont permis de réduire le coût de production des échantillons, qui reste cependant très onéreux.

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons également caractérisé une organisation monomérique du domaine K2 dans des conditions chimiques proches de l'échantillon RMN. Et enfin, nous avons optimisé les conditions de l'analyse RMN avant d'aborder une caractérisation structurale complète par RMN et modélisation moléculaire qui fait l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE 3

Stratégie d’étude par RMN et Modélisation Moléculaire du domaine K2

La radiocristallographie et la Résonance Magnétique Nucléaire sont à ce jour les deux techniques qui permettent d'obtenir la structure 3D d'une protéine à l'échelle atomique. Comparée à la RMN, les avantages principaux de la radiocristallographie sont d'une part, la précision de l'information obtenue et d'autre part, l'accès à des masses moléculaires élevées (> 200 kDa). Il en découle que la grande majorité des structures publiées sont résolues par cette technique moins restreinte, et souvent moins coûteuse en terme de temps d'interprétation des données. La spectroscopie de RMN n'est donc, à priori, pas la méthode de choix pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine. Cependant, elle est le seul recours lorsque l'obtention d'un monocristal ou la détermination des phases est impossible. Sa principale qualité se situe dans l'étude des dynamiques moléculaires et d'interactions entre les molécules, étape clef de l'exploration des relations structure activité. Ces quinze dernières années ont fait l'objet d'importants développements techniques et méthodologiques qui rendent la spectroscopie de RMN plus efficace dans la résolution de structures macromoléculaires. Ces progrès ont notamment visé à améliorer la résolution et la sensibilité de la technique.

La fréquence de résonance du proton, qui traduit l'intensité des aimants supraconducteurs, peut atteindre à présent jusqu'à 950 MHz. L'augmentation de résolution qui en découle a été accompagnée par l'apparition de sondes de mesure, à une température proche de celle de l'hélium liquide (cryosondes), qui offrent un gain de sensibilité d'un facteur 2 à 4 comparée aux sondes classiques. Ces grandes avancées technologiques n'auraient cependant pas été suffisantes sans le développement, de séquences RMN 3D et 4D (Marion et al., 1989 ; Clore & Gronenborn, 1991), et de méthodes de marquage(s) isotopique(s) des noyaux ^{15}N, ^{13}C, et ^{2}D (Redfield et al., 1989 ; Xu et al., 1999), qui permettent l'étude structurale de biomolécules de taille de plus en plus importante. Parmi ces progrès méthodologiques, figure notamment la spectroscopie TROSY (Transverse Relaxation Optimized spectroscopY) (Pervushin et al., 1997) utilisée à hauts champs pour des protéines de masse supérieure à 20 kDa, et dont la combinaison à un marquage au deutérium ^{2}D, apporte un gain considérable en résolution et en sensibilité. En amont du calcul de la structure, l'émergence de programmes d'attribution automatique ou semi-automatique, des résonances (Zimmerman et al., 1997), ou des pics nOe (Nilges et al., 1997), rend la collecte des contraintes structurales RMN moins lourde, et donc moins coûteuse en temps. L'application de l'ensemble de ces développements permet aujourd'hui de trouver dans la littérature des reports d'attribution de protéines de plus de 80 kDa (Tugarinov et al., 2004), ainsi que des structures tridimensionnelles de protéine de

48 kDa résolues par RMN (Williams et al., 2005). Cela étant, pour des protéines de cette taille, les moyens employés en termes de production d'échantillons (nécessité de différents marquages spécifiques et onéreux), temps d'enregistrement des expériences, et temps d'interprétation des données, deviennent alors considérables.

Stratégie générale de l'étude structurale de K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

La stratégie adoptée pour caractériser la structure d'une protéine par spectroscopie de RMN et Modélisation Moléculaire dépend de sa masse moléculaire, ainsi que des outils d'analyse et de traitement à disposition du structuraliste. Le domaine K2 de KIN17 est une protéine de 111 acides aminés, que l'on peut qualifier de taille moyenne pour une étude par RMN. Les différentes étapes de la méthodologie employée pour résoudre la structure de K2 sont schématisées en Figure 3.1, et sont détaillées dans ce chapitre.

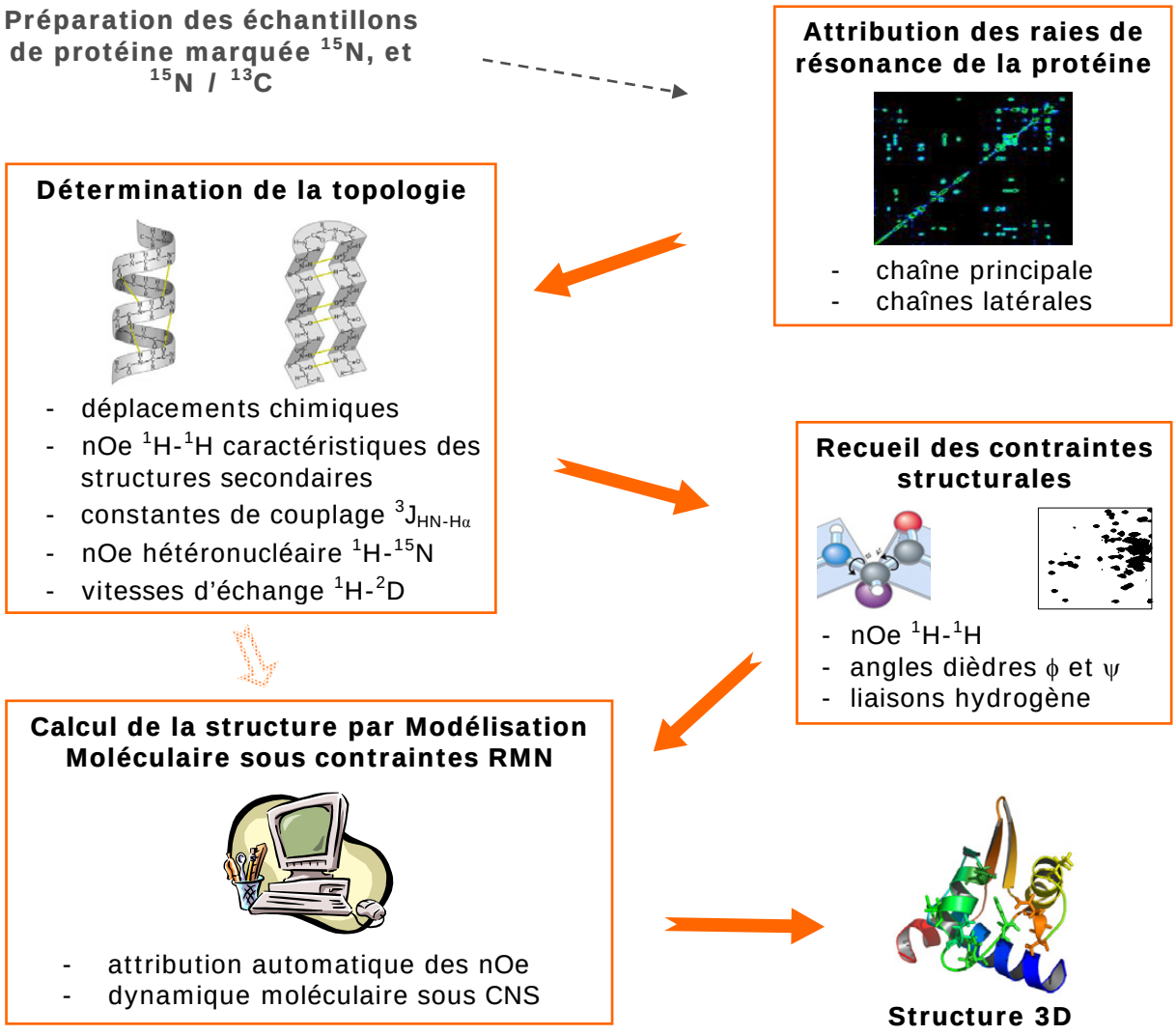


***Figure 3.1** : Résumé des principales étapes de la stratégie d'étude structurale du domaine K2*

1) Méthode d'attribution des raies de résonance

Après avoir préparé un échantillon de protéine pur, concentré, et stable, l'enregistrement des expériences RMN peut débuter. Les informations et contraintes structurales ne peuvent être directement extraites des spectres RMN. Il est tout d'abord nécessaire de déterminer les déplacements chimiques de chacun des atomes de la biomolécule. Le choix de la stratégie à employer pour attribuer les raies de résonance est dicté par la taille de la protéine étudiée. Pour une protéine de 111 résidus comme le domaine K2, l'attribution peut être menée par deux méthodes distinctes qui dépendent du type de marquage isotopique de l'échantillon.

La première de celles-ci est basée sur l'enregistrement d'expériences 3D hétéronucléaires de type ^{15}N-TOCSY-HSQC et ^{15}N-NOESY-HSQC. L'attribution des résonances ^{1}H et ^{15}N est alors réalisée selon la stratégie décrite dans l'ouvrage de Wüthrich (Wüthrich, 1986) qui repose sur les couplages homonucléaires scalaire et dipolaire ^{1}H-^{1}H. Cette méthode est généralement applicable à des protéines contenant jusqu'à 130 acides aminés, et présente l'avantage de ne nécessiter qu'un simple marquage ^{15}N. Toutefois, pour des polypeptides de cette taille, qui adoptent une structure tertiaire, ce type de stratégie basée sur l'identification du nOe présente un caractère ambigu. De plus, dès 100 résidus, l'augmentation de la taille peut conduire à une réduction de l'efficacité du transfert TOCSY ^{1}H-^{1}H, qui engendre une diminution du nombre de résonances, et notamment dans les régions structurées en hélice où les constantes de couplage $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ sont faibles. C'est le cas de la protéine K2 où la quantité d'information recueillie sur le spectre ^{15}N-TOCSY-HSQC est insuffisante pour envisager l'attribution complète des fréquences ^{1}H et ^{15}N par cette stratégie.

Il existe pour les protéines doublement marquées ^{15}N / ^{13}C une attribution séquentielle alternative basée uniquement sur des transferts de cohérence *via* les couplages scalaires homonucléaires et hétéronucléaires. La méthode repose sur l'enregistrement d'une combinaison d'expériences 3D hétéronucléaires de double ou triple résonance qui corrèlent chacune 2 ou 3 types de noyaux différents. Cette stratégie, utilisée pour attribuer l'ensemble des résonances de la chaîne principale de la protéine K2, est présentée dans le paragraphe suivant.

1.1) Attribution des carbones de la chaîne principale et des $^{13}C_\beta$

1.1.1) Stratégie générale

Les expériences 3D de triple résonance utilisées classiquement pour l'attribution du squelette d'une protéine doublement marquée sont, pour la plupart d'entre elles, basées sur le même principe : la corrélation du proton amide d'un résidu i avec respectivement, l'azote qui le porte, et un carbone C_i (CO, C_α, ou C_β) du résidu précédent et/ou du même résidu. Ces corrélations, dépendant du chemin de cohérence sélectionné, se font par le transfert successif de l'aimantation à travers plusieurs liaisons covalentes *via* des couplages scalaires $^{1,2}J$ relativement élevés ($^1J_{C-C}$, $^1J_{C-N}$, $^1J_{H-N}$, $^1J_{H-C}$, $^2J_{C-N}$, et $^2J_{C-C}$). Les six expériences 3D couramment utilisées pour l'attribution complète des noyaux ^1H_N, ^{15}N, ^{13}CO, $^{13}C_\alpha$, et $^{13}C_\beta$ sont : HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, CBCANH, et CBCA(CO)NH (Pour revues : Cavanagh et al., 1996 ; Sattler et al., 1999 ; Kanelis et al., 2001). Le nom de ces expériences indique les noyaux qui sont impliqués dans les chemins de cohérence suivis. Les noyaux mis entre parenthèses ne sont pas édités en fréquence et servent uniquement à relayer l'aimantation. On peut classer ces six expériences en deux catégories distinctes :

- La première corrèle le groupement amide du résidu i avec les carbones ^{13}C du résidu i-1, et permet ainsi d'obtenir les déplacements chimiques du triplet (N_i ; H^N_i ; C_{i-1}).

- Dans la seconde catégorie, le groupement amide du résidu i est relié aux carbones ^{13}C du résidu i et du résidu i-1. L'information obtenue est alors double, et les déplacements chimiques recueillis constituent le quadruplet (N_i ; H^N_i ; C_{i-1} ; C_i).

La combinaison de ces deux types d'expériences peut donc permettre de déterminer sans ambiguïté les déplacements chimiques des carbones ^{13}CO, $^{13}C_\alpha$, et $^{13}C_\beta$ des résidus i et i-1 relatifs à chaque groupement amide. Il est alors possible de connecter les résidus deux à deux en comparant les valeurs de déplacements chimiques C_i des uns aux valeurs de C_{i-1} des autres (Figure 3.2). Finalement, le rapprochement de cette attribution séquentielle à la séquence primaire est initié en recherchant les acides aminés particuliers qui présentent des valeurs de déplacement chimique caractéristiques. C'est le cas de la glycine qui ne possède pas de C_β, et des résidus thréonine, sérine et alanine, dont les valeurs de déplacement chimique de C_α et C_β sont spécifiques.

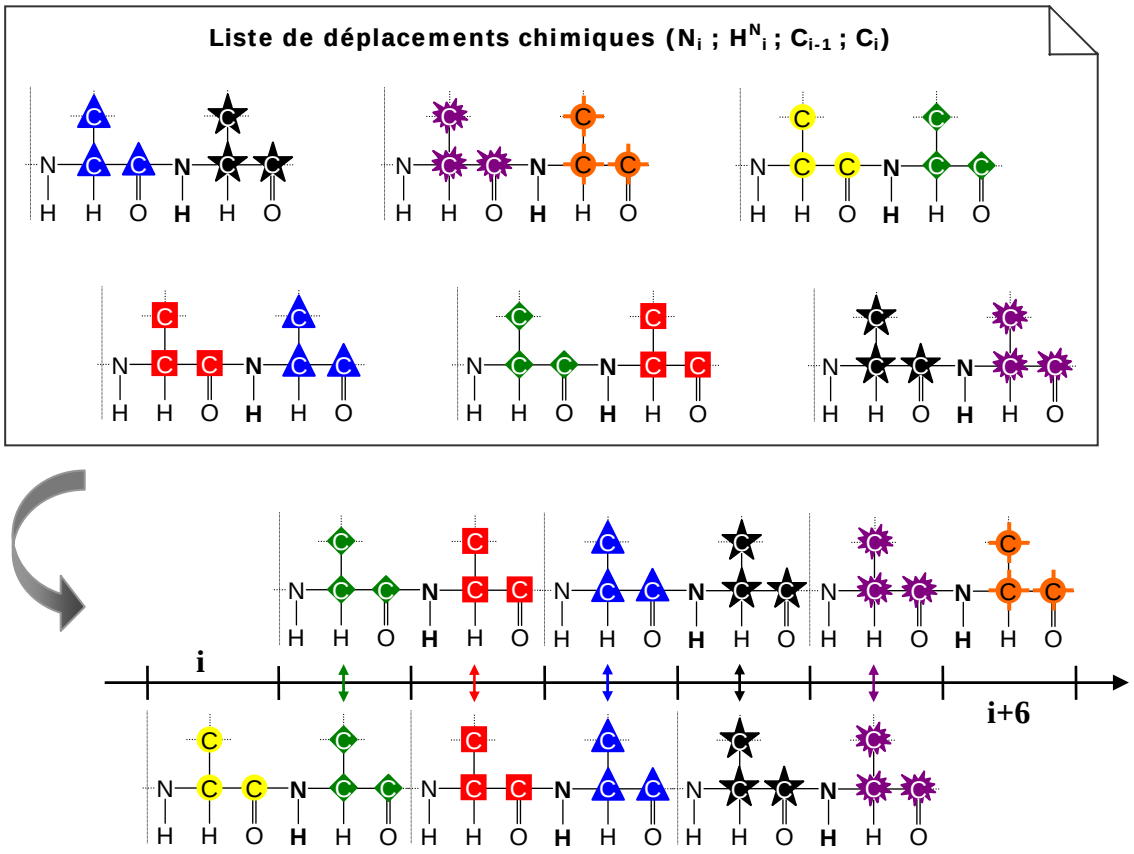


***Figure 3.2** : Principe de l'attribution séquentielle basée sur l'enregistrement d'expériences 3D de triple résonance ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C. Chaque groupement amide (H^N_i ; N^H_i) est associé aux triplets de déplacements chimiques ($^{13}CO_i$; $^{13}C^{\alpha}_i$; $^{13}C^{\beta}_i$) et ($^{13}CO_{i-1}$; $^{13}C^{\alpha}_{i-1}$; $^{13}C^{\beta}_{i-1}$) relatifs aux résidus i, et i-1. Les connexions de la séquence peptidique sont retracées résidu par résidu en comparant les valeurs de déplacements chimiques $^{13}C_i$ aux valeurs de $^{13}C_{i-1}$ triplet par triplet.*

Les valeurs de déplacement chimique des noyaux ^{13}CO, $^{13}C_{\alpha}$, et $^{13}C_{\beta}$ sont respectivement déterminées, par les couples d'expériences HNCO et HN(CA)CO, HNCA et HN(CO)CA, CBCANH et CBCA(CO)NH. Ces expériences s'interprètent par paire et chaque couple fournit un chemin d'attribution potentiel.

1.1.2) Description des expériences 3D triple résonance

Les séquences d'impulsion des expériences 3D de triple résonance utilisées pour l'attribution séquentielle sont toutes du même type : la séquence débute par un transfert de polarisation de type INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfert) du proton ^{1}H vers l'hétéroatome (^{15}N ou ^{13}C) qui le porte (Figure 3.3). L'aimantation évolue ensuite en fonction de différents couplages scalaires et du déplacement chimique $^{13}C_i$ avant d'être transférée vers le noyau amide $^{15}N_H$ via le couplage ^{15}N-$^{13}C_{\alpha}$ ou ^{15}N-^{13}CO. Finalement, un

transfert de polarisation de type INEPT-inverse permet de détecter l'aimantation sur le noyau amide ^1H_N.

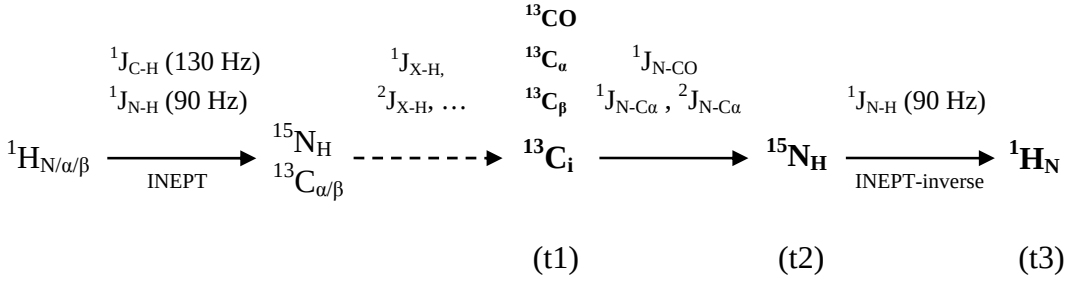


***Figure 3.3** : Représentation schématique du transfert de l'aimantation dans une expérience 3D triple résonance de type HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, CBCANH, ou CBCA(CO)NH.*

a) Attribution des C_α

L'expérience HNCA corrèle le groupement amide au carbone C_α *via* le couplage scalaire ^{15}N-$^{13}C_\alpha$. Sur les spectres correspondants, deux pics peuvent apparaître par résidu : une première corrélation du groupement amide avec le C^α_i, et une seconde avec le C^α_{i-1} (Figure 3.4). Ceci s'explique par les valeurs de constante de couplage $^1J_{N\text{-}C\alpha}$ (11 Hz) et $^2J_{N\text{-}C\alpha}$ (-7 Hz) qui sont du même ordre de grandeur. La différence d'intensité des deux pics, due au fait que $|^1J_{N\text{-}C\alpha}| > |^2J_{N\text{-}C\alpha}|$, pourrait permettre de distinguer le déplacement chimique provenant du C^α_i, de celui du C^α_{i-1}. Il est cependant préférable de vérifier une telle attribution à l'aide de l'expérience HN(CO)CA complémentaire. Celle-ci corrèle le groupement amide au seul carbone $C_{\alpha-1}$ en deux étapes *via* le carbonyle $^{13}CO_{i-1}$ non édité. La différence de constante de couplage $^1J_{N\text{-}CO}$ (15 Hz) et $^2J_{N\text{-}CO}$ (1 Hz) permet d'orienter sélectivement l'aimantation vers le $^{13}CO_{i-1}$, puis vers le C^α_{i-1} via la liaison $^1J_{CO\text{-}C\alpha}$ (55 Hz).

Ces deux expériences fournissent un premier chemin d'attribution séquentielle et pourraient suffire à connecter tous les résidus deux à deux. Cependant, pour la majorité des acides aminés, les déplacements chimiques de C_α ne sont pas caractéristiques, et ne permettent une attribution sans ambiguïtés. De plus, le recouvrement des pics de corrélation dans les régions encombrées des spectres peut induire une incertitude sur certaines valeurs de déplacement chimique de C_α.

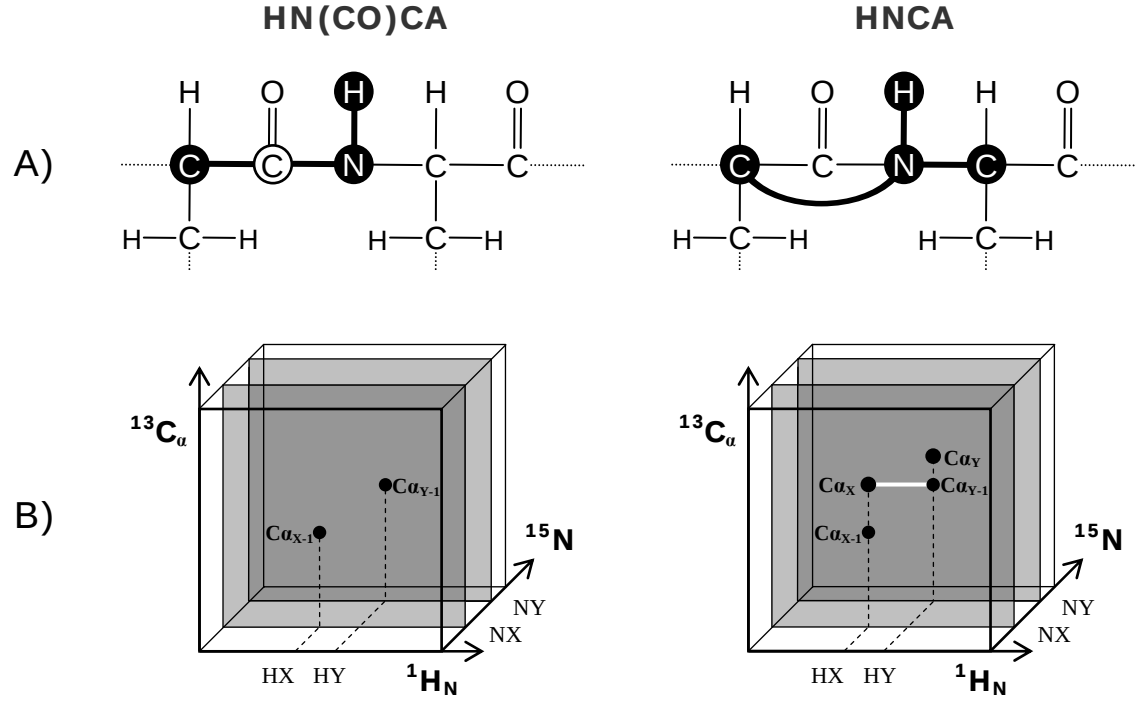


***Figure 3.4** : Expériences 3D de triple résonance utilisées pour l'attribution des $^{13}C_\alpha$ d'une protéine. A) Schéma du transfert de l'aimantation dans les expériences HN(CO)CA et HNCA. Les noyaux édités en fréquence sont indiqués par des cercles noirs, alors que ceux uniquement relayés, sont indiqués par des cercles blancs. B) Exemple illustré de spectres HN(CO)CA et HNCA correspondants à un segment de 2 résidus consécutifs X-Y ; mise en évidence de la connectivité séquentielle.*

b) Attribution des CO

Selon le même principe, les expériences HNCO et HN(CA)CO procurent les corrélations entre les résonances $^{1}H_N$ et $^{15}N_H$ et les ^{13}CO intra- et inter-résidus (Figure 3.5). L'expérience HNCO fournit uniquement une corrélation avec le carbonyle $^{13}CO_{i-1}$ *via* la constante de couplage $^{1}J_{N\text{-}CO}$. La HN(CA)CO utilise les couplages scalaires $^{1}J_{N\text{-}C\alpha}$, $^{2}J_{N\text{-}C\alpha}$, et $^{1}J_{N\text{-}CO}$ pour relier le $^{13}CO_i$ et le $^{13}CO_{i-1}$ au groupement amide *via* le noyau (CA) non édité. A l'instar de l'expérience HNCA, l'intensité du pic inter-résidu est généralement plus faible que celle du pic intra-résidu du fait que $|^{1}J_{N\text{-}C\alpha}| > |^{2}J_{N\text{-}C\alpha}|$.

Alors que la HNCO est l'expérience de triple résonance la plus sensible, la HN(CA)CO est la moins sensible. Toutefois, il existe d'autres expériences, comme la (HCA)CO(CAN)NH, qui permettent d'obtenir les corrélations des ^{13}CO intra- et inter-résidus, et qui sont plus sensibles que la HN(CA)CO. Cependant, la quantité d'information présente sur les spectres n'est pas toujours suffisante pour retracer les connexions de la chaîne

peptidique résidu par résidu. D'autre part, la dispersion des déplacements chimiques des carbonyles étant faible (de l'ordre de 10 ppm), le risque d'ambiguïtés et de recouvrement spectral en est plus important. Ces deux types d'expériences ne constituent donc pas le couple privilégié permettant l'attribution séquentielle, mais apportent cependant une information supplémentaire pour lever d'éventuelles ambiguïtés.

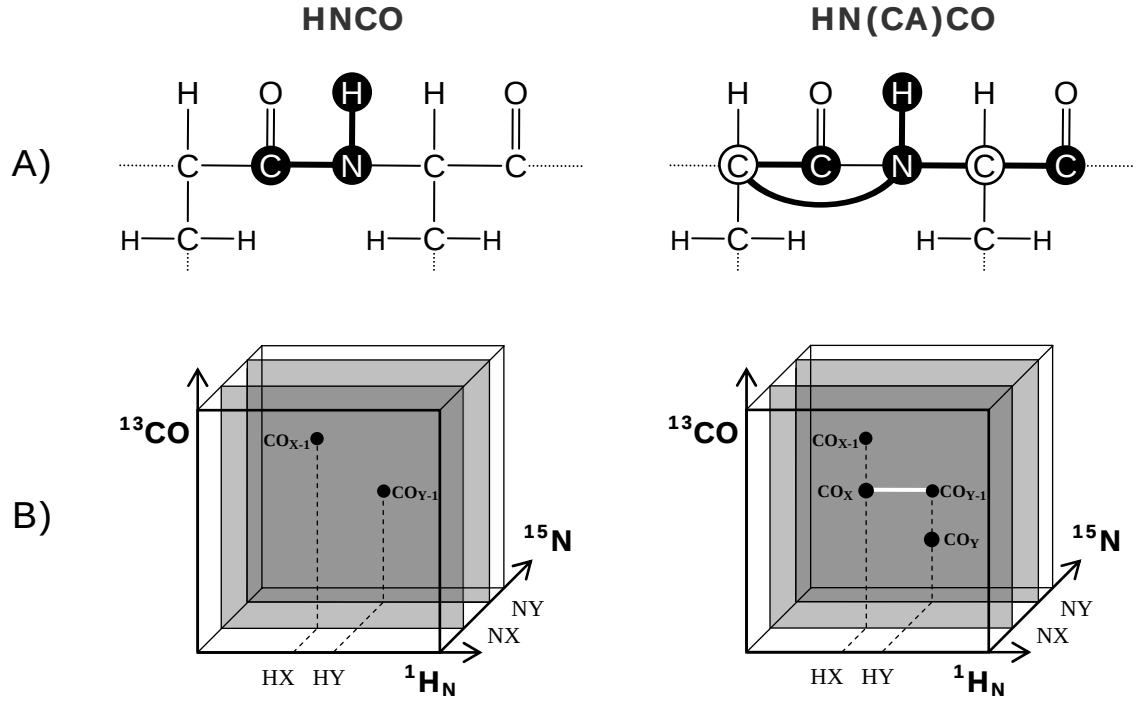


***Figure 3.5** : Expériences 3D de triple résonance utilisées pour l'attribution des ^{13}CO d'une protéine. A) Schéma du transfert de l'aimantation dans les expériences HNCO et HN(CA)CO. Les noyaux édités en fréquence sont indiqués par des cercles noirs, alors que ceux uniquement relayés, sont indiqués par des cercles blancs. B) Exemple illustré de spectres HNCO et HN(CA)CO correspondants à un segment de 2 résidus consécutifs X-Y ; mise en évidence de la connectivité séquentielle.*

c) Attribution des C_β

Les expériences CBCA(CO)NH et CBCANH sont sans aucun doute les expériences majeures dans la stratégie d'attribution. Elles fournissent les mêmes informations que le couple HN(CO)CA et HNCA et de plus, mettent en évidence les corrélations du groupement amide avec les $^{13}C_\beta$ intra- et inter-résidus (Figure 3.6). Outre l'apport d'une information de fréquence supplémentaire, la connaissance du déplacement chimique du $^{13}C_\beta$ permet une identification partielle du type de résidu, et de relier les chaînes latérales à l'attribution séquentielle du squelette.

Les deux expériences débutent de la même façon : après transfert de l'aimantation des protons aliphatiques vers leur carbone, l'aimantation provenant du $^{13}C_\beta$ est transférée au $^{13}C_\alpha$ *via* la constante de couplage $^1J_{C\alpha\text{-}C\beta}$ (35 Hz). Elle est ensuite orientée sélectivement vers le $^{15}N_H$ pour la CBCANH, ou vers le ^{13}CO (puis vers le $^{15}N_H$) pour la CBCA(CO)NH. Au final, l'expérience CBCANH fait apparaître les corrélations du groupement amide avec les noyaux $^{13}C_\alpha$ et $^{13}C_\beta$ des résidus i et i-1, et la CBCA(CO)NH procure uniquement les corrélations avec les noyaux $^{13}C_\alpha$ et $^{13}C_\beta$ du résidu i.

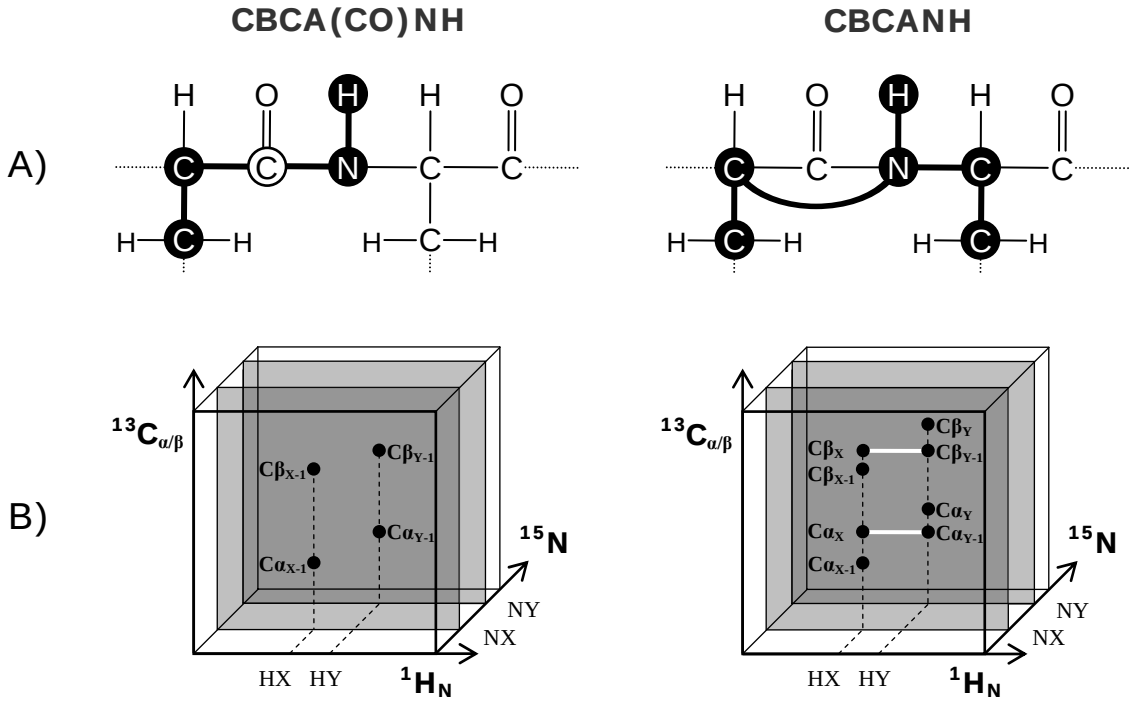


***Figure 3.6** : Expériences 3D de triple résonance utilisées pour l'attribution des $^{13}C_\beta$ d'une protéine. A) Schéma du transfert de l'aimantation dans les expériences CBCA(CO)NH et CBCANH. Les noyaux édités en fréquence sont indiqués par des cercles noirs, alors que ceux uniquement relayés, sont indiqués par des cercles blancs. B) Exemple illustré de spectres CBCA(CO)NH et CBCANH correspondants à un segment de 2 résidus consécutifs X-Y ; mise en évidence des connectivités séquentielles.*

1.2) Attribution des protons H_α et H_β

Les 3 couples d'expériences décrits précédemment ne sont pas toujours suffisants pour reconstituer l'ensemble de la chaîne peptidique. En effet, certains inconvénients inhérents à l'analyse d'une protéine par RMN comme le recouvrement spectral, et la dégénérescence partielle du signal, nuisent à la qualité et à la quantité d'information présente sur les spectres, et ne permettent généralement pas de relever la totalité des déplacements chimiques $^{13}C_\alpha$, $^{13}C_\beta$, et ^{13}CO des résidus i et i-1 relatifs à chaque groupement amide. L'attribution

séquentielle peut cependant être complétée et vérifiée à partir du déplacement chimique $^{1}H_{\alpha}$ fournit par les expériences 3D HNHA et HBHA(CO)NH.

L'expérience HNHA (Vuister & Bax, 1993) est classiquement utilisée pour corréler le groupement amide ($^{1}H^{N}_{i}$; $^{15}N^{H}_{i}$) au seul proton $^{1}H^{\alpha}_{i}$ intra-résiduel. Cette expérience de double résonance ^{1}H, ^{15}N ne nécessite qu'un échantillon de protéine simplement marquée ^{15}N. Cependant, l'intensité des pics observés sur les spectres est proportionnelle à la constante de couplage $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$, et pour des valeurs faibles, il est parfois difficile d'observer une tache de corrélation. Cet inconvénient ne se retrouve pas avec l'expérience triple résonance HBHA(CO)NH (Grzesiek & Bax, 1993), qui permet de relier chaque groupement amide aux noyaux $^{1}H_{\alpha}$ et $^{1}H_{\beta}$ du résidu précédent (Figure 3.7). En effet, cette expérience, plus sensible que la HNHA, est tout à fait comparable à la CBCA(CO)NH et met en jeu un transfert de l'aimantation, via des couplages scalaires forts, de la chaîne latérale i-1 au groupement amide i via le noyau $^{13}CO_{i-1}$ non édité.

La combinaison des expériences HNHA et HBHA(CO)NH permet donc d'identifier le déplacement chimique des protons $^{1}H_{\alpha}$ des résidus i et i-1 relatifs à chaque groupement amide, et ainsi de consolider l'attribution séquentielle. Le déplacement chimique des protons H^{β}_{i-1}, dont l'ordre de grandeur fournit une indication du type d'acide aminé, peut également être utilisé pour contrôler l'attribution.

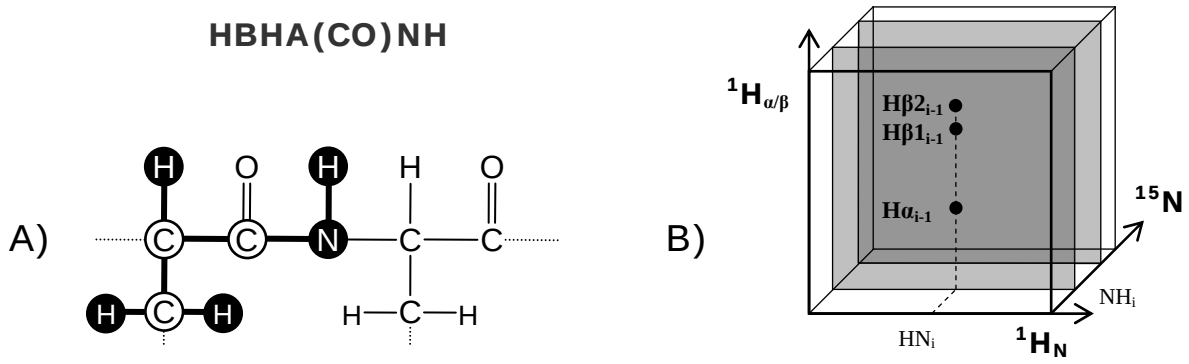


***Figure 3.7** : Attribution des protons $^{1}H_{\alpha}$ et $^{1}H_{\beta}$ avec l'expérience 3D de triple résonance HBHA(CO)NH. A) Schéma illustrant le transfert de l'aimantation : les noyaux édités en fréquence sont indiqués par des cercles noirs, et ceux uniquement relayés, sont indiqués par des cercles blancs. B) Illustration des corrélations observables sur un spectre HBHA(CO)NH pour un groupement amide i.*

1.3) Attribution des chaînes latérales

1.3.1) Description des expériences 3D HCCH-COSY et HCCH-TOCSY

Les expériences utilisées pour l'attribution des chaînes latérales sont généralement des expériences 3D de double résonance ^{1}H et ^{13}C. C'est le cas de la HCCH-COSY, et de la HCCH-TOCSY, qui permettent d'identifier les protons et carbones des chaînes aliphatiques et aromatiques (Kay et al., 1993 ; Majumdar et al., 1993) . Ces deux expériences peuvent être interprétées comme des 2D ^{1}H-^{1}H COSY et TOCSY, et la troisième dimension disperse l'information selon la fréquence du carbone ^{13}C. Les chemins de cohérence suivis sont cependant très différents de ceux observés dans des expériences 2D homonucléaires ^{1}H. Ainsi, la séquence d'impulsions HCCH-TOCSY contient un motif TOCSY ^{13}C-^{13}C pendant lequel l'aimantation est transférée le long de la chaîne carbonée (Figure 3.8). Comparé au TOCSY classique ^{1}H-^{1}H basé sur les constantes de couplage $^{2}J_{H\text{-}H}$ et $^{3}J_{H\text{-}H}$ (4-10 Hz), ce type de transfert est bien plus efficace car il repose sur le couplage fort $^{1}J_{C\text{-}C}$ (35-55 Hz). Il en est de même pour le transfert COSY ^{13}C-^{13}C de l'expérience HCCH-COSY qui est basé sur cette même constante de couplage $^{1}J_{C\text{-}C}$. La bonne sensibilité de ces expériences s'explique également par des transferts de cohérence rapides entre les noyaux ^{1}H et ^{13}C via la constante de couplage $^{1}J_{C\text{-}H}$ (125-250 Hz).

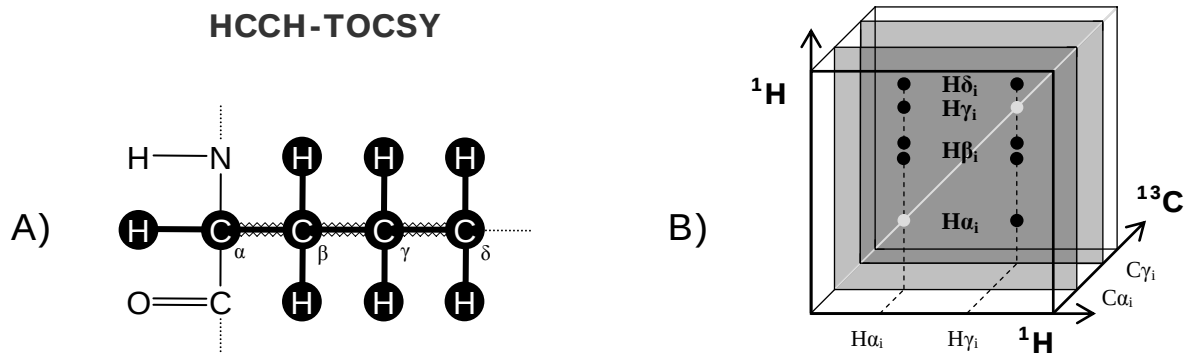


***Figure 3.8** : Attribution des noyaux ^{1}H et ^{13}C des chaînes latérales aliphatiques et aromatiques. A) Description du transfert de l'aimantation dans une expérience 3D de double résonance HCCH-TOCSY. Les noyaux édités en fréquence sont indiqués par des cercles noirs et le transfert TOCSY ^{13}C-^{13}C est indiqué par un trait ondulé. B) Exemple illustré de spectre HCCH-TOCSY. Mise en évidence du système de spin de 2 protons H_α et H_γ appartenant au même résidu et respectivement portés par les carbones C_α et C_γ.*

1.3.2) Attribution des chaînes latérales aliphatiques

Les fréquences de résonance des noyaux ^{1}H et ^{13}C de chaîne latérale aliphatique se déterminent à partir des spectres HCCH-TOCSY et HCCH-COSY édités sur la région

aliphatique. Dans l'optique d'obtenir des spectres de bonne qualité, il est préférable d'enregistrer ces 2 expériences sur un échantillon de protéine doublement marquée ^{15}N / ^{13}C, préalablement lyophilisé, et repris dans 100 % de D_2O. Les valeurs de déplacement chimique de $^{13}C_\alpha$, $^{13}C_\beta$, $^{1}H_\alpha$ et $^{1}H_\beta$ servent de point de départ pour identifier les autres résonances aliphatiques de chaîne latérale.

1.3.3) Attribution des chaînes latérales aromatiques

Les raies de résonance des protons et carbones de chaîne latérale aromatique s'attribuent en deux étapes. Dans un premier temps, les systèmes de spin aromatiques se déterminent à partir de l'expérience HCCH-TOCSY, éditée sur la région aromatique, et enregistrée sur un échantillon doublement marqué en solvant D_2O. Les valeurs de déplacement chimique ^{13}C des cycles aromatiques sont spécifiques du type d'acide aminé, ils permettent ainsi la distinction entre les différents cycles. L'attribution de ces systèmes se réalise ensuite en recherchant les nOe intra-résiduels qui corrèlent les noyaux $^{1}H_\alpha$ et $^{1}H_\beta$ aux noyaux ^{1}H aromatiques sur le spectre ^{13}C-NOESY-HSQC, édité sur la région aliphatique et enregistré sur le même type d'échantillon.

Dans le cas du domaine K2, les expériences 3D HCCH-COSY et HCCH-TOCSY suffisent pour identifier la quasi-totalité des résonances aliphatiques et aromatiques. Cependant, la forte similarité de déplacement chimique de certains types de noyaux aliphatiques ^{1}H et ^{13}C induit généralement la présence de nombreuses zones de recouvrement sur les spectres, qui ne permet pas toujours une attribution sans ambiguïté. Pour une protéine de cette taille, la stratégie peut alors consister à enregistrer d'autres expériences de type 3D ou 4D, qui corrèlent les noyaux ^{1}H ou ^{13}C aliphatiques au groupement amide du résidu suivant (Grzesiek et al., 1993 ; Logan et al., 1993).

2) Détermination de la topologie et recueil des contraintes structurales

Une fois les déplacements chimiques de la protéine attribués, la seconde étape de l'étude consiste à extraire un certain nombre de paramètres des spectres RMN, puis à les convertir en contraintes structurales. Pour une protéine de taille moyenne comme le domaine K2, deux types de contraintes géométriques sont classiquement utilisés pour le calcul de la structure. Il s'agit de la distance inter-atomique ^{1}H-^{1}H, et des angles dièdres ϕ et ψ qui

définissent le squelette peptidique. Les contraintes de distance sont principalement issues de l'effet Overhauser homonucléaire ^{1}H. Aussi, la détermination de la structure de biomolécules par RMN repose essentiellement sur ce paramètre.

2.1) L'effet Overhauser nucléaire

2.1.1) Aspect expérimental

Deux noyaux proches dans l'espace présentent entre eux des interactions dipolaires qui peuvent être mises en évidence par saturation ou inversion d'un des deux spins. Le couplage dipolaire résultant correspond à un transfert d'aimantation à travers l'espace, appelé relaxation croisée ou effet Overhauser nucléaire (nOe). L'intensité η d'un pic de corrélation dipolaire entre deux atomes est fonction de plusieurs paramètres caractéristiques de la molécule étudiée. Elle dépend notamment de la longueur du vecteur (ou distance) entre les deux atomes (en r^{-6}), et du temps de corrélation τ_c de ce vecteur en fonction du champ magnétique ω du spectromètre :

$$\eta = f(r^{-6} ; \omega\tau_c) \qquad (2.1)$$

Dans l'approximation d'un mouvement isotrope d'une molécule sans mobilité interne, le temps de corrélation τ_c représente le temps nécessaire à la molécule pour se réorienter de un radian. Ce temps de corrélation est directement lié à la masse moléculaire de l'objet analysé. Par conséquent, l'effet Overhauser nucléaire est fonction de la taille de la protéine étudiée.

Les expériences RMN qui contiennent des séquences NOESY mettent en évidence des corrélations dipolaires homonucléaires ^{1}H entre protons distants de moins de 6 Å. Dans ce type d'expérience, le transfert de l'aimantation entre deux protons proches dans l'espace a lieu pendant le temps de mélange expérimental τ_m. Dans le cas d'une protéine de 14 kDa comme le domaine K2, le produit $\omega\tau_c$ implique un nOe négatif pouvant atteindre un accroissement de 100%. Aussi, comparé aux petites molécules, l'effet Overhauser est plus efficace et s'établit à des faibles temps de mélange τ_m. Toutefois, pour des protéines de cette taille, le nOe est accompagné d'effets indirects, telle que la diffusion de spin, qui apparaît à des temps de mélange intermédiaires, et dont le poids augmente avec τ_m. Dans ces conditions, l'effet Overhauser est biaisé et n'est plus représentatif de la proximité entre protons. Le temps de mélange τ_m doit donc être choisi de manière à obtenir le maximum d'informations dipolaires tout en évitant le phénomène de diffusion de spin. En pratique, il serait possible

d'estimer le τ_m optimal en réalisant pour chaque expérience des études classiques de « build-up » sur les échantillons de protéine K2. Dans notre cas, le choix du τ_m a été guidé en se basant sur des études similaires menées sur des protéines de taille comparable à fréquence de champ comparable.

Une fois ces considérations prises en compte, on peut alors estimer que le volume d'un pic de corrélation dipolaire entre deux protons est proportionnel à la distance *r* qui sépare les deux noyaux en $1/r^6$. Cette dépendance du nOe en distance est d'une importance considérable pour le calcul de la structure à haute résolution car elle va permettre la conversion du volume V_{ij} de chaque pic en contrainte de distance r_{ij} via une référence (V_{ref}, et r_{ref}), et ainsi d'accéder potentiellement à l'ensemble des proximités spatiales entre protons au sein de la protéine :

$$r_{ij} = r_{ref} \left(\frac{V_{ref}}{V_{ij}} \right)^{1/6} \qquad (2.2)$$

2.1.2) Le problème de l'attribution des pics nOe

L'interprétation du nOe ^{1}H en contrainte de distance nécessite au préalable l'attribution des pics de corrélation dipolaire, c'est-à-dire de déterminer pour chaque pic associé à un proton de la protéine, le (ou les) noyau(x) en interaction dipolaire avec celui-ci. Dans le cas de l'étude d'un peptide n'adoptant pas de structure tertiaire, la majorité des nOe inter-résidus observés résulte de proximités à courte et moyenne distances, qui traduisent la structure secondaire dans laquelle chaque acide aminé est engagé. En pratique, ce type de nOe correspond à la corrélation d'un proton d'un résidu avec un ou plusieurs protons de résidu proche dans la séquence, ce qui limite le nombre d'attributions possibles. De plus, la connaissance de la structure secondaire, fournie par l'analyse des paramètres structuraux RMN (couplage scalaire, déplacement chimique…), facilite considérablement l'attribution de ces pics. Dans le cas de l'étude d'une protéine repliée, la structure tertiaire induit l'apparition de nombreux effets à longue distance entre protons appartenant à des résidus éloignés dans la séquence. Ces effets sont d'une importance capitale car ils traduisent l'organisation tridimensionnelle de la protéine, et notamment celle du cœur hydrophobe. Aussi, l'attribution des pics nOe devient alors beaucoup plus délicate car elle nécessite une connaissance préalable d'éléments de structure tertiaire, difficilement appréciables pour des protéines structurées majoritairement en hélice. D'autre part, plus la taille de la protéine est importante,

et plus les possibilités d'attribution sont nombreuses. La collecte des contraintes de distance peut alors devenir une étape lourde et coûteuse en temps.

Pour contourner ces difficultés, il existe des programmes d'attribution automatique (ou semi-automatique) des pics nOe couplés aux logiciels classiques de modélisation moléculaire. Dans le cadre de l'étude structurale du domaine K2, nous avons pu bénéficier des ressources informatiques du DIEP du CEA de Saclay, et notamment du programme d'attribution automatique des nOe développé au Laboratoire de Structure des Protéines par le Dr. Bernard Gilquin. Ce programme fonctionne en interface avec le logiciel de modélisation CNS et sera présenté dans le paragraphe 3.3. Son utilisation nécessite la connaissance de la topologie de la protéine.

2.2) Détermination de la structure secondaire et de la topologie

L'extraction des paramètres structuraux RMN est la méthode classique qui permet d'identifier rapidement la structure secondaire d'une protéine. L'analyse consensus de ces paramètres conduit à l'obtention des premiers éléments de structure tertiaire, utilisés par le programme d'attribution automatique en amont du calcul de la structure.

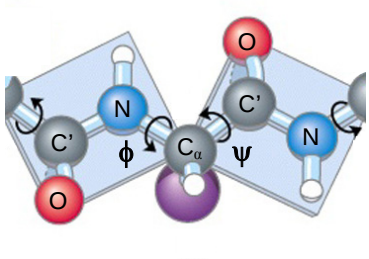
2.2.1) Les déplacements chimiques secondaires

Le déplacement chimique des noyaux de la chaîne principale d'un résidu est influencé par plusieurs facteurs dont la structure secondaire dans laquelle celui-ci est engagé. Wishart *et* Sykes ont mis au point une méthode qui permet d'apprécier les types, et les positions dans la séquence, des éléments de structure secondaire à partir du déplacement chimique des noyaux ^{13}CO, $^{13}C_{\alpha}$, $^{13}C_{\beta}$, et $^{1}H_{\alpha}$ (Wishart et al., 1992 ; Wishart & Sykes, 1994). La procédure consiste à calculer la différence entre le déplacement chimique expérimental (δ_{obs}) et une valeur de référence (δ_{ref}) correspondant au même noyau pour le même acide aminé dans une conformation aléatoire. La valeur obtenue est appelée déplacement chimique secondaire (CSD ou Chemical Shift Deviation). Les indices CSD n'ont pas la même signification selon la nature du noyau. Ainsi, pour le proton ^{1}H, une succession d'indices supérieurs à 0.1 ppm en valeur absolue reflète une structure secondaire stable et le signe en précise le type : positif pour un feuillet β, et négatif pour une hélice α ou 3_{10}. Dans le cas des $^{13}C_{\alpha}$, il s'agit exactement du contraire, et la valeur significative de CSD est de 1 ppm.

2.2.2) La constante de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$

Les angles ϕ et ψ sont deux des trois angles de torsion qui décrivent le squelette peptidique d'une protéine. La combinaison d'effets stériques, au sein d'un même résidu, ou entre les chaînes latérales, ne permet à ces angles de prendre que certaines valeurs qui définissent les différents types de structure secondaire. La constante de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ est reliée indirectement à l'angle dièdre ϕ via l'équation de Karplus (2.3) avec les coefficients semi-empiriques A, B, et C (Karplus, 1959). Plusieurs jeux de coefficients ont été proposés, et ceux utilisés par Pardi *et al.*, sont les plus communément admis (2.4) (Pardi et al., 1984). La résolution de l'équation fait apparaître que les valeurs idéales de constante $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ sont de 4Hz pour l'hélice α (-57°), et de 9 Hz pour le feuillet β antiparallèle (-139°). Plusieurs études statistiques, comme celle menée par Smith *et al.*, sur 85 structures résolues par radiocristallographie, ont cependant conduit à considérer des valeurs corrigées de $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ (Smith et al., 1996). Sur la base de ces études, il est généralement admis que plusieurs valeurs de $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ consécutives inférieures à 5.5 Hz indiquent une conformation hélicoïdale, alors que des valeurs supérieures à 8 Hz reflètent une structure en feuillet ou étendue.

A)



B)

$$^3J_{HN\text{-}H\alpha} = A.cos^2\ \theta - B.cos\ \theta + C$$

$$avec\quad \theta = |\phi - 60°| \qquad (2.3)$$

C)

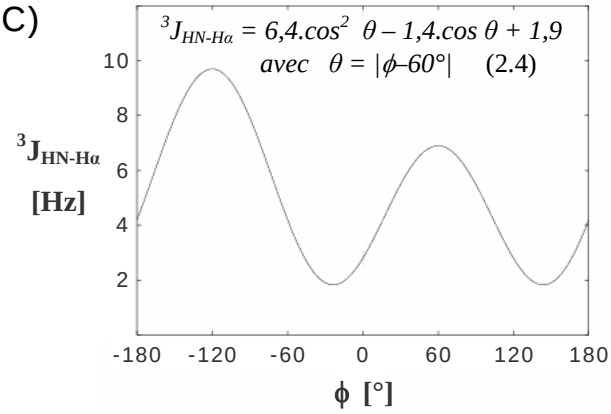


***Figure 3.9** : Estimation de l'angle dièdre ϕ à partir de la constante de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$. A) Définition des angles de torsion ϕ et ψ du squelette peptidique. B) Relation de Karplus liant la constante $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ aux angles θ et ϕ. C) Résolution de l'équation de Karplus selon les coefficients de Pardi.*

Dans le cas des protéines, les constantes de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ sont généralement estimées à partir de l'expérience 3D HNHA, qui met en évidence la corrélation intra-résiduelle entre un groupement amide (^1H_N, $^{15}N_H$) et son proton alpha ($^1H_\alpha$). Sur les spectres correspondants, le rapport d'intensité entre le pic croisé négatif (I_c) et le pic diagonal positif (I_d) est relié à la constante $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ *via* une constante ε (Vuister & Bax, 1993) :

$$I_c / I_d = -tan^2\ (2\pi\varepsilon\ .\ ^3J_{HN\text{-}H\alpha}) \qquad (2.5)$$

2.2.3) Recherche des nOe caractéristiques

Comme suggéré dans le paragraphe 2.1.2, chaque type de structure secondaire donne naissance à des pics nOe spécifiques en nature et en intensité sur les spectres NOESY. Aussi, la méthode classique proposée par Wüthrich pour identifier les éléments de structure secondaire consiste à reporter sur un diagramme les nOe caractéristiques entre protons appartenant à des résidus proches dans la séquence (Wüthrich, 1986) (Figure 3.10A). Ces nOe sont facilement identifiables sur les spectres NOESY-HSQC éditée ^{15}N, et un simple examen de ce diagramme suffit en théorie à discerner de manière univoque les différents types de conformation au sein de la protéine.

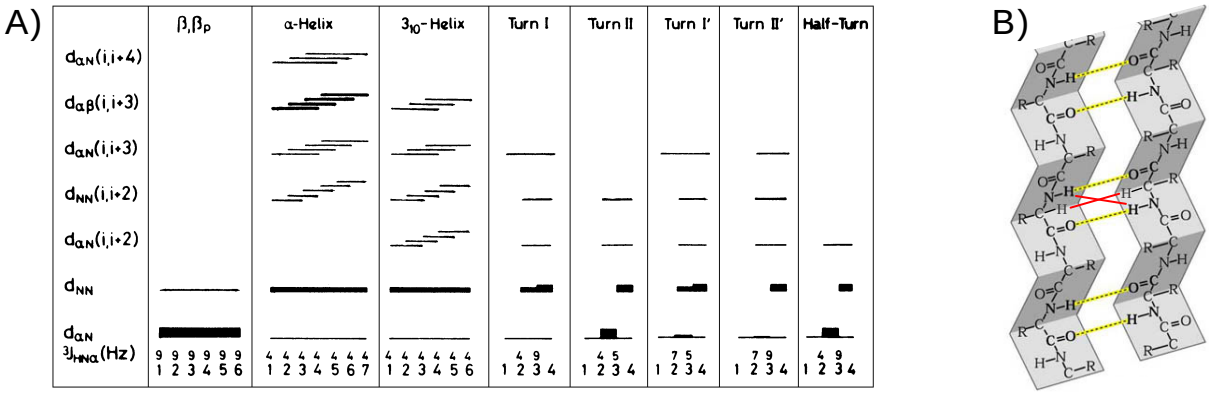


***Figure 3.10** : Identification des éléments de structure secondaire et de la topologie d'une protéine à partir de l'attribution de pics nOe spécifiques. A) Diagramme des nOe caractéristiques des différents types de structure secondaire selon Wüthrich (*Wüthrich, 1986*). B) Description schématique d'un feuillet β antiparallèle. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés jaunes. Les traits rouges représentent le type de connectivité longue distance recherchée.*

Une fois les éléments de structure secondaire identifiés à partir du résultat consensus de l'analyse des paramètres structuraux, la topologie de la protéine est déterminée en recherchant des effets spécifiques à longue distance de type H_N-H_N, H_N-H_α, et H_α-H_α au niveau des résidus n'adoptant pas de structure hélicoïdale. La caractérisation de ces effets permet d'une part, de distinguer les régions étendues de celles impliquées dans un feuillet β et d'autre part, de caractériser l'organisation des brins au sein des feuillets (parallèle ou antiparallèle) (Figure 3.10B). Ces éléments de structure tertiaire facilement identifiables sont extrêmement précieux car ils fournissent les premières informations du repliement de la protéine, et vont guider le programme d'attribution automatique des nOe.

2.2.4) Le nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le phénomène de relaxation croisée entre deux spins dépend essentiellement de la distance *r* entre les deux noyaux, et du temps de corrélation effectif τ_c entre les deux spins, c'est-à-dire de l'amplitude de leur mouvement. Dans l'approximation d'une distance fixe entre les atomes $^{15}N_H$ et $^{1}H_N$ (r_{HN} ~ 1.01 Å), le paramètre nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N ne dépend plus que des mouvements rapides de la liaison N_H-H_N (de la picoseconde à la nanoseconde). D'autre part, ce type d'effet est indépendant des protons environnants (Kay et al., 1989). Par conséquent, la mesure du nOe ^{1}H-^{15}N peut se révéler très utile pour distinguer les parties flexibles de la protéine, telles que les boucles exposées ou les parties déstructurées (mouvements rapides), de la partie repliée (mouvements plus lents).

En pratique, ce paramètre dynamique est quantifié à partir de deux expériences 2D similaires qui permettent d'observer la corrélation scalaire ^{1}H-^{15}N de chaque résidu. Le premier spectre est enregistré avec une saturation préliminaire des ^{1}H qui engendre un transfert d'aimantation vers le ^{15}N *via* le couplage dipolaire. Le second spectre est obtenu par la même séquence d'impulsion, mais en absence de saturation des ^{1}H (Farrow et al., 1994). Pour chaque pic de corrélation, le rapport entre l'intensité du pic saturé (I_{sat}) et l'intensité du pic non saturé (I_{ref}) détermine alors le nOe hétéronucléaire (2.6). L'incertitude sur chaque valeur est calculée à partir des erreurs de mesure des intensités qui sont estimées par le bruit spectral sur chacun des deux spectres.

$$nOe^{(1H\text{-}15N)} = \frac{I_{sat}}{I_{ref}} \qquad (2.6)$$

Les régions dans lesquelles les résidus ont une valeur de nOe ^{1}H-^{15}N supérieure à 0.5 sont considérées comme rigide, entre 0.2 et 0.5 comme relativement flexibles (boucles), et les acides aminés pour lesquels ce nOe est inférieur à 0.2 ou négatif appartiennent à des régions déstructurées de la protéine. Dans l'optique du calcul de la structure, la mesure du nOe hétéronucléaire fournit une information supplémentaire car elle permet d'identifier avec précision les résidus non structurés des extrémités N- et C-terminales. Aussi, sur les spectres de type NOESY, les nOe homonucléaires ^{1}H observables correspondent à une moyenne pondérée des nOe correspondants à chaque population de l'espace conformationnel. Dans le cas de résidus en échange conformationnel très rapide, le poids de chaque population est

faible et les contacts de type longue distance sont incompatibles avec une telle flexibilité. Par conséquent, la connaissance de ces résidus peut être utilisée par le programme d'attribution automatique des pics nOe afin de restreindre le nombre de possibilités d'attribution et donc de faciliter celle-ci.

2.3) Recueil des contraintes structurales

Les contraintes expérimentales de distance et d'angle dièdre utilisées pour le calcul de la structure de K2 sont issues de quatre observables RMN : l'effet Overhauser nucléaire ^{1}H, le couplage scalaire, le déplacement chimique, et les vitesses d'échange des protons amides.

2.3.1) Collecte des pics nOe

La grande majorité des contraintes de distance est obtenue à partir des expériences 3D NOESY-HSQC éditée ^{15}N, et ^{13}C. Les pics de corrélation dipolaire ^{1}H-^{1}H sont sélectionnés sur les spectres, puis leur volume est mesuré à l'aide du logiciel *Felix* (Accelrys). La démarche consiste dans un premier temps à définir des « boites » d'intégration autour de chaque pic nOe. Avant de mesurer le volume de ces boites, leur taille doit être optimisée, l'une après l'autre, afin d'éviter d'intégrer du bruit spectral ou un pic voisin, qui conduirait à des distances inter-atomiques erronées (souvent sous-estimées). Cette étape est donc cruciale dans l'optique de préparer un jeu de contraintes expérimentales de qualité. Selon la stratégie définie, l'attribution des pics nOe n'est pas nécessaire à ce stade de l'étude. Seuls les nOe inter-résidus qui traduisent la topologie des feuillets β sont attribués et convertis en contraintes de distance.

2.3.2) Les contraintes d'angle dièdre

Le déplacement chimique des noyaux $^{13}C_{\alpha}$, $^{13}C_{\beta}$, ^{13}CO, $^{1}H_{\alpha}$, et ^{15}N peut être utilisé pour déterminer les angles ϕ et ψ sur la base d'une prédiction empirique réalisée par le logiciel TALOS (Cornilescu et al., 1999). Ce programme recherche dans une base de données, actuellement constituée de 78 protéines, des triplets de résidus consécutifs ayant une homologie de déplacements chimiques et de type de résidu avec les triplets de la protéine étudiée. Pour chaque triplet de la protéine, les 10 tripeptides les plus proches en séquence et en déplacements chimiques sont sélectionnés. Aussi, si les angles ϕ et ψ des résidus centraux de 9 de ces 10 triplets sont similaires, la prédiction est considérée comme fiable. Leur valeur

moyenne et l'écart type correspondant sont alors utilisés pour constituer les contraintes d'angle dièdre sous forme d'un intervalle de valeurs permises.

Pour les résidus dont la prédiction TALOS n'est pas jugée satisfaisante, le jeu de données angulaires peut être complété à partir de la constante de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ pour des valeurs inférieures à 5.5 Hz ou supérieures à 8 Hz (cf. § 2.2.2). L'intervalle des valeurs permises d'angle ϕ est alors déduit de la courbe de Karplus intégrée par les coefficients de Pardi (Tableau 3.1) :

$^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ (Hz)	contrainte sur l'angle ϕ (°)
$^3J > 9.0$	–120 ± 30
$8.0 < {}^3J < 9.0$	–120 ± 40
$5.5 < {}^3J < 8.0$	Ø
$5.0 < {}^3J < 5.5$	–70 ± 30
$^3J < 5.0$	–60 ± 30

***Tableau 3.1** : Intervalles de contraintes sur l'angle ϕ en fonction de la constante $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$.*

2.3.3) Les contraintes de distance déduites des liaisons hydrogène

Dans toute solution aqueuse, l'autodissociation de l'eau en ions H_3O^+ et OH^- catalyse l'échange des protons amides avec les protons de l'eau (Englander et al., 1972). Selon ce principe, l'incubation d'une protéine dans une solution à 99% d'eau lourde va mener à la substitution progressive de la majorité des protons ^1H_N par le deutérium de l'eau lourde. La cinétique de cet échange dépend d'une part, de l'accessibilité au solvant et d'autre part, de la liaison hydrogène dans laquelle un proton amide peut être impliqué en se liant à un oxygène de carbonyle. Un proton ^1H_N exposé au solvant et non engagé dans une liaison hydrogène s'échangera très rapidement, alors que dans le cas d'un proton amide impliqué dans une liaison hydrogène, la vitesse d'échange sera d'autant plus lente que cette liaison est enfouie dans le cœur hydrophobe de la protéine. Par conséquent, une expérience de spectroscopie d'échange $^1H\text{-}^2D$ suivie sur spectres HSQC $^1H\text{-}^{15}N$ peut permettre de localiser une partie des protons amides impliqués dans une liaison hydrogène. Ces liaisons sont spécifiques de chaque structure secondaire. Aussi, la connaissance de la topologie de la protéine est utilisée

conjointement pour identifier les deux atomes impliqués dans chaque liaison. Cette donnée structurale est finalement convertie en contraintes de distance de la manière suivante :

2.1 Å < $d_{HN\text{-}O}$ (i, i–4) < 2.5 Å et 3.1 Å < $d_{N\text{-}O}$ (i, i–4) < 3.5 Å dans une hélice α
2.1 Å < $d_{HN\text{-}O}$ (i, i–3) < 2.5 Å et 3.1 Å < $d_{N\text{-}O}$ (i, i–3) < 3.5 Å dans une hélice 3_{10}
2.1 Å < $d_{HN\text{-}O}$ (i, j) < 2.5 Å et 3.1 Å < $d_{N\text{-}O}$ (i, j) < 3.5 Å dans un feuillet β

3) Modélisation Moléculaire sous contraintes RMN

Les contraintes structurales issues de l'interprétation des paramètres RMN ne permettent pas d'accéder directement à la structure tridimensionnelle de la protéine. Ces données expérimentales sont introduites dans des procédures de modélisation moléculaire afin de construire des modèles à l'échelle atomique. Il s'agit de la modélisation moléculaire sous contraintes RMN, étape indispensable pour obtenir une représentation graphique de la structure 3D d'une protéine.

La méthode s'appuie sur des calculs théoriques de mécanique moléculaire et de dynamique moléculaire pour déterminer un ensemble de conformations, qui correspondent à des minima énergétiques, et qui sont en accord avec les données expérimentales RMN. Dans le cadre de l'étude de la protéine K2, nous avons utilisé le logiciel de modélisation CNS adapté au traitement de données expérimentales obtenues par radiocristallographie ou par RMN. Les principes de mécanique et dynamique moléculaire sur lesquels repose ce logiciel seront évoqués en première partie de ce paragraphe. La seconde partie sera consacrée à la présentation du programme d'attribution automatique des pics nOe, qui fonctionne en interface avec le logiciel CNS.

3.1) Principe de la mécanique moléculaire adaptée aux systèmes biologiques

3.1.1) Notion de champ de force

Une grande part des systèmes auxquels la modélisation moléculaire s'intéresse ont une taille bien trop importante pour pouvoir être étudiés par des méthodes classiques de mécanique quantique de type *ab initio* ou semi-empiriques. En effet, malgré le perpétuel développement du domaine de l'informatique et notamment de la capacité de calcul, les

équations de mécanique quantique, utilisées pour représenter la fonction d'énergie de petites molécules, ne peuvent être résolues dans le cas de macromolécules. C'est pourquoi, les simulations de mécanique et dynamique moléculaire s'appuient sur une représentation simplifiée de la fonction d'énergie appelée « champ de force ». Selon ce principe, à chaque état conformationnel correspond une énergie potentielle empirique définie par le champ de force, et qui est fonction des interactions attractives et répulsives entre les atomes. La conformation la plus stable est alors associée à l'état pour lequel la fonction d'énergie est la plus basse. Cependant, et avec ce seul terme d'énergie potentielle, une protéine qui fait l'objet d'une simulation de mécanique moléculaire peut adopter une multitude de conformations qui correspondent à des minima énergétiques locaux. L'intégration de contraintes expérimentales dans les protocoles de modélisation moléculaire permet de restreindre l'espace conformationnel à explorer, et de favoriser des configurations qui sont en accord avec les données expérimentales. Pour prendre en compte ces données, le champ de force est alors constitué, d'un terme d'énergie potentielle empirique E_{pot} représentant les contraintes physiques internes à la molécule entre atomes liés et non liés, et d'un terme énergétique supplémentaire E_{cont} qui tient compte des contraintes expérimentales (2.7). C'est le cas du champ de force du programme CNS qui sera présenté succinctement dans le paragraphe 3.2.

$$E = E_{pot} + E_{cont} \qquad (2.7)$$

3.1.2) Les algorithmes de minimisation

Une fois le champ de force choisi, l'objectif de la modélisation moléculaire sous contraintes est de déterminer les conformations associées aux surfaces d'énergie les plus basses, et satisfaisant un maximum de contraintes RMN. Pour cela, il existe de nombreux algorithmes qui se différencient par leur efficacité et leur rapidité d'exécution.

Une minimisation d'énergie, par des algorithmes dits de mécanique moléculaire, est un processus itératif qui a pour but d'optimiser la géométrie d'une molécule à partir d'une conformation initiale. Tous les paramètres définissant la géométrie du système (degrés de libertés) sont systématiquement modifiés par petits incréments jusqu'à ce que l'énergie atteigne un minimum, ou pendant un nombre de pas fixé préalablement. Les algorithmes de minimisation les plus couramment utilisés recherchent un minimum énergétique en se basant sur le gradient de la surface d'énergie potentielle, c'est à dire sur sa dérivée première ou seconde par rapport aux coordonnées atomiques. Ce gradient indique la direction du

minimum, tandis que sa valeur renseigne sur la « pente » locale de la fonction d'énergie. C'est le cas de la méthode de la plus grande pente (*steepest descent* ; Arkfen, 1985), efficace lorsque la conformation est proche de la structure initiale, et de la méthode de gradient conjugué Powell (Powell, 1977), utilisée dans le protocole CNS, et plus adaptée aux systèmes dont le minimum énergétique est proche.

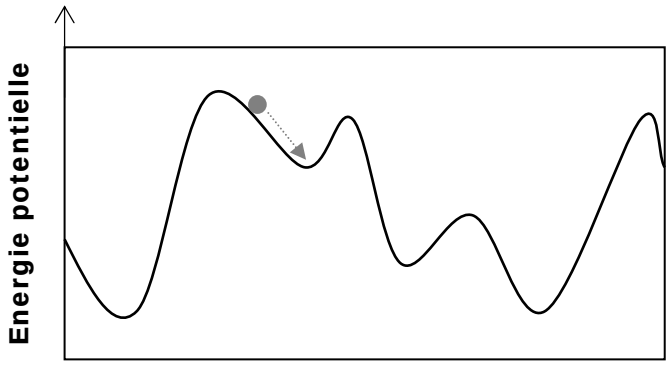


***Figure 3.11** : Illustration de l'inconvénient des algorithmes de minimisation par la représentation schématique d'une surface d'énergie potentielle. La boule grise représente l'énergie potentielle d'une conformation initiale. La minimisation de l'énergie en se basant sur des gradients de surface ne permet de déterminer qu'un minimum local proche de la structure de départ et souvent différent du minimum global.*

Même si les algorithmes de minimisation basés sur le gradient de l'énergie potentielle permettent d'optimiser rapidement la géométrie d'un édifice moléculaire, ils conduisent le plus souvent au minimum énergétique local, le plus proche de la structure de départ, et très souvent éloigné du minimum global (Figure 3.11). Par conséquent, ces méthodes de calcul ne constituent certainement pas l'outil principal pour déterminer la structure d'une protéine par modélisation sous contraintes. La solution idéale serait une méthode capable d'explorer efficacement l'espace conformationnel d'un composé, c'est-à-dire l'ensemble des conformations qui lui sont accessibles. La manière la plus simple et la plus sûre serait de générer et d'optimiser des modèles en combinant toutes les possibilités conformationnelles imaginables. Cette approche, appelée recherche systématique, est cependant difficilement envisageable dans le cas de l'étude de macromolécules, où les temps de calcul exigés constitueraient alors un facteur limitant.

3.1.3) La dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une des méthodes qui permet d'explorer l'espace conformationnel d'une structure complexe. Elle a pour objectif de simuler les mouvements

internes d'une molécule en fonction du temps par le calcul du déplacement de chacun des atomes. Elle repose sur les principes de la mécanique classique Newtonienne et la trajectoire de chaque atome est définie par la relation fondamentale de la dynamique (2.8), qui relie la force F_i s'exerçant sur chaque atome à sa masse m_i, son accélération a_i, et sa position r_i en fonction du temps t.

$$\vec{F_i} = m_i\vec{a_i} = m_i \frac{d^2\vec{r_i}}{dt^2} \qquad (2.8)$$

$$\vec{F_i} = -\frac{d\vec{E}_{pot}}{d\vec{r_i}} \qquad (2.9)$$

$$\vec{r}(t+\delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t-\delta t) + \delta t^2\,\vec{a}(t) \qquad (2.10)$$

$$\vec{v}(t+\delta t) = \vec{v}(t) + 0.5\delta t[\vec{a}(t) + \vec{a}(t+\delta t)] \qquad (2.11)$$

La force F_i étant reliée à la fonction d'énergie potentielle (2.9), il est donc possible de calculer à tout instant t l'accélération a_i s'exerçant sur chaque atome. Plusieurs algorithmes mathématiques sont proposés pour résoudre ces équations. Parmi ceux-ci, figure celui de Verlet (Verlet, 1967) dans lequel est utilisé un développement en série de Taylor du second ordre du vecteur position. Ainsi, connaissant la position à l'instant t, il est alors possible d'obtenir les positions $r(t+\delta t)$ (2.10) et les vitesses $v(t+\delta t)$ (2.11) des différents atomes. Cet algorithme implique un pas d'intégration δt très court de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s) afin de maintenir une trajectoire stable.

Dans une simulation de dynamique moléculaire, l'énergie cinétique totale d'un système de N atomes peut être reliée à la température T via la constante de Boltzman k_B :

$$E_{cinétique} = \sum_i \frac{1}{2} m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N k_B T \qquad (2.12)$$

Cette équation introduit la notion de température au sein des méthodes de dynamique moléculaire. Plus cette température est élevée, plus la vitesse communiquée aux atomes sera importante. Par l'intermédiaire d'une hausse « fictive » de température, il est alors possible de fournir au système une certaine quantité d'énergie cinétique qui lui permet de franchir les barrières d'énergie potentielle, et donc d'explorer un espace conformationnel beaucoup plus large. Si la température est suffisamment importante, une molécule est alors potentiellement capable d'adopter toutes les conformations possibles. Une simulation de dynamique moléculaire se réalise généralement en trois temps : après avoir attribué une vitesse initiale

aléatoire aux atomes par une distribution de type Maxwell-Bolzman, une augmentation de température est simulée afin d'atteindre rapidement une valeur finale choisie (thermalisation). La température est alors maintenue à cette valeur constante afin de répartir l'énergie cinétique sur toute la molécule (équilibration). Finalement, la configuration du système est enregistrée à intervalles de temps réguliers durant une phase de recueil de données (collecte).

3.1.4) Le recuit simulé

Le recuit simulé est une méthode de dynamique moléculaire couramment utilisée pour déterminer la structure d'une protéine par modélisation sous contraintes (Figure 3.12). Le nom de ce protocole s'inspire de la technique industrielle de « recuit » qui consiste à refroidir très lentement un matériau fondu, afin de lui permettre d'organiser au mieux sa structure moléculaire.

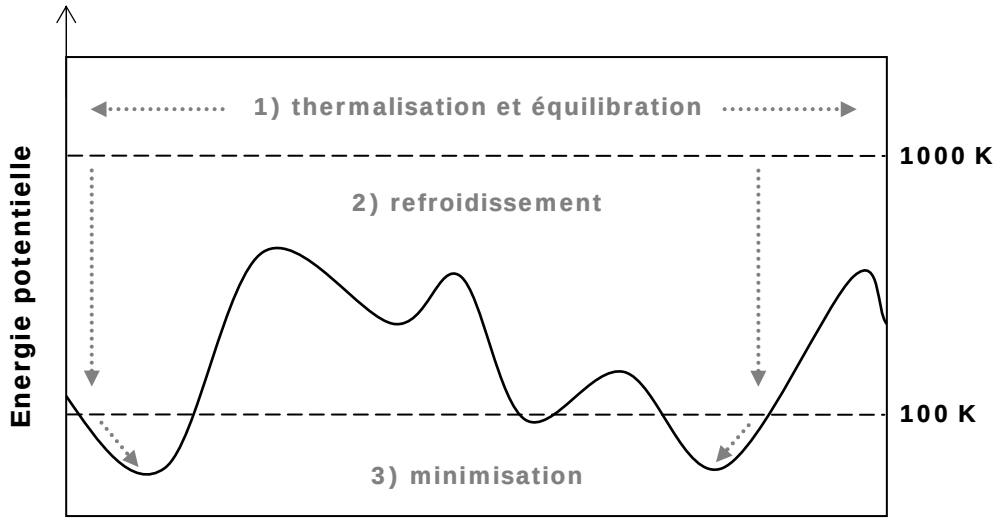


Figure 3.12 *: Illustration d'une procédure de recuit simulé par la représentation schématique d'une surface d'énergie potentielle. La dynamique à haute température permet d'explorer l'espace conformationnel et de s'éloigner de la structure initiale (non représentée). Les structures générées sont lentement refroidies de manière à occuper les zones stables de la surface d'énergie. Une dernière étape de minimisation permet d'optimiser les conformations et d'obtenir finalement des minima énergétiques plus profonds.*

La méthode du recuit simulé consiste dans un premier temps à mener une dynamique à haute température (de 100 à 1000 K) à partir d'une structure initiale aléatoire étendue préalablement minimisée. Cet apport d'énergie cinétique permet d'explorer l'espace conformationnel et de se dégager des minima locaux proches des structures initiales. Après une période d'équilibration, la température est lentement diminuée jusqu'à 100 K afin de réduire l'énergie cinétique et de contraindre le système à occuper les états de plus basse

énergie. On peut comparer schématiquement cette étape à la phase de refroidissement de la technique industrielle de « recuit » où une diminution très lente de la température conduit à l'obtention de l'espèce moléculaire la plus stable et qui possède une énergie libre minimale. Finalement, les dernières étapes du recuit simulé consistent à minimiser puis à collecter les structures ainsi calculées. Il est cependant important de noter que cette méthode ne garantit pas l'identification du minimum énergétique global, mais s'en approchera probablement dès lors que le jeu de contraintes expérimentales est optimisé (diminution cohérente des degrés de liberté), et qu'un ensemble suffisant de configurations est collecté.

3.2) Le logiciel CNS

Le logiciel CNS (Cristallography and NMR system ; Brünger et al., 1998) est dédié à la détermination et au raffinement de structures tridimensionnelles à partir de données expérimentales obtenues par RMN ou radiocristallographie. Il repose sur les principes de mécanique et dynamique moléculaire et notamment celui du recuit simulé.

3.2.1) Description du champ de force

Comme nous l'avons évoqué précédemment, pour tenir compte des contraintes expérimentales, les champs de force utilisés par le programme CNS sont composés d'un terme d'énergie potentielle empirique E_{pot}, et d'un terme supplémentaire E_{cont} qui permet de contrôler le respect de ces contraintes :

$$E = E_{pot} + E_{cont} \qquad (2.13)$$

a) La fonction d'énergie potentielle E_{pot}

L'énergie potentielle empirique d'une molécule est définie par l'ensemble des composantes qui décrivent sa géométrie. Elle est la somme de deux termes, l'un représentant les interactions entre atomes liés $E_{liés}$ et l'autre, les interactions entre atomes non liés $E_{non\_liés}$:

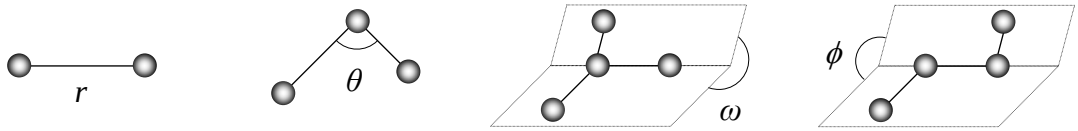
$$E_{pot} = E_{liés} + E_{non\_liés} \qquad (2.14)$$

La description succincte des différents termes de la fonction E_{pot} est réalisée à partir des composantes du champ de force CHARMM (Brooks, 1983) dont dérive le champ de force CHARMM22 utilisé pour le raffinement des structures finales sélectionnées.

Terme des atomes liés :

$$E_{liés} = E_{liaisons} + E_{angles} + E_{impropres} + E_{dièdres} \quad (2.15)$$

$$E_{liés} = \sum k_r (r - r_0)^2 + \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum k_\phi (1 + \cos n\phi)$$



Les termes énergétiques associés aux interactions entre atomes liés permettent en premier lieu de maintenir la géométrie covalente de la molécule. Ils rendent compte du coût énergétique de l'élongation des liaisons covalentes (r), des fluctuations, de l'angle θ formé par deux liaisons covalentes, de l'angle dièdre impropre ω pour maintenir la chiralité d'un groupe d'atomes, ou bien encore de l'angle de torsion ϕ formé par un groupe de quatre atomes (n correspondant à la période de la fonction cosinus). Les trois premiers termes de la fonction $E_{liés}$ sont des potentiels harmoniques centrés sur une position d'équilibre de géométrie idéale (r_0, θ_0, et ω_0). Ces valeurs de référence dérivent de modèles moléculaires obtenus, soit expérimentalement par diffraction des rayons X ou de neutrons, soit par des calculs théoriques de type *ab initio*. Les différentes valeurs des constantes de force k_r, k_θ, et k_ω sont quant à elles obtenues à partir d'analyses vibrationnelles de molécules en phase gazeuse. Ainsi, par cette représentation de la fonction d'énergie $E_{liés}$, la géométrie moléculaire peut être considérée comme une série d'oscillateurs composés de billes et de ressorts. La somme des contributions de ce terme traduit alors les écarts des structures calculées par rapport à des géométries de référence.

Terme des atomes non liés :

$$E_{non\_liés} = E_{van\_der\_Waals} + E_{électrostatique} \quad (2.16)$$

$$E_{non\_liés} = \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} \right) + \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi \varepsilon_r} \cdot \frac{q_i q_j}{\varepsilon_0 r_{ij}}$$

Le terme d'énergie des interactions entre atomes non liés $E_{non\_liés}$ est la somme des contributions correspondant aux interactions de type électrostatiques et de van der Waals entre couples d'atomes. En mécanique moléculaire, chaque atome est considéré comme une masse possédant une charge ponctuelle. Selon ce principe, l'interaction électrostatique entre deux charges partielles q_i et q_j distantes de r_{ij} est définie par un potentiel de type coulombien. L'intensité de l'interaction dépend notamment de la distance r_{ij}, et de la constante diélectrique du milieu ε_r. Le paramètre ε_r sert à reproduire les effets d'écran du solvant entre les charges. Aussi, un choix judicieux de la valeur ε_r permet de mimer de manière implicite l'effet du solvant et de prendre en compte sa présence dans le calcul des interactions électrostatiques.

Les interactions de van der Waals traduisent l'attraction et la répulsion entre deux atomes séparés par une distance r_{ij} et constituant un dipôle. Le terme d'énergie correspondant est un potentiel de Lennard-Jones qui contient une composante attractive en $1/r_{ij}^{6}$ due aux forces de dispersion de London, et une composante répulsive en $1/r_{ij}^{12}$ due aux couches électroniques des atomes les plus proches. Les coefficients A_{ij} et B_{ij} dépendent de la nature des atomes. Lorsque la distance r_{ij} est inférieure à la somme des rayons de van der Waals, c'est le terme répulsif qui prédomine et inversement pour une distance supérieure, c'est le terme attractif qui agit principalement.

Selon la description des termes de la fonction $E_{non\_liée}$, des interactions de type électrostatiques et de van der Waals peuvent en théorie être observées entre deux atomes très éloignés en distance. La prise en compte de l'ensemble des combinaisons possibles entre paires d'atomes d'une macromolécule impliquerait un temps de calcul considérable. Pour réduire la durée de ces calculs, il est possible de limiter la portée des interactions en définissant un « seuil de coupure ». Selon ce principe, seules les interactions entre atomes séparés par une distance inférieure à ce seuil seront prises en compte par le champ de force. Aussi, pour éviter des discontinuités d'énergie induites par l'introduction de ces seuils, la fonction d'énergie $E_{non\_liée}$ est multipliée par une fonction d'amortissement ou de « switch » (Brünger, 1992). Ce type de fonction permet de faire tendre progressivement les énergies électrostatiques et de van der Waals vers zéro, et donc d'éviter des coupures brusques pouvant générer des erreurs de calcul.

b) La prise en compte des contraintes RMN

Les contraintes expérimentales, introduites dans les protocoles de recuit simulé sous forme d'intervalles de valeurs permises, sont associées à des termes énergétiques supplémentaires dans le champ de force de CNS. Ces termes traduisent le degré de prise en compte de ces données. Le non respect d'une contrainte conduit à une pénalité énergétique, appelée violation, qui informe de l'écart entre une valeur de distance ou d'angle dièdre dans une structure calculée, et l'intervalle de valeurs autorisées correspondant.

Terme des contraintes de distance :

Le logiciel CNS propose plusieurs types de fonctions potentielles pour exprimer le terme énergétique des contraintes de distance E_{nOe}. Dans le cadre du calcul de la structure du domaine K2, nous avons utilisé les deux fonctions suivantes :

- Le potentiel carré (*square*) :

$$E_{nOe} = K_{nOe} \,.\, \delta^n \qquad \text{avec :} \quad \begin{cases} \delta = r_{min} - d & pour \;\; d < r_{min} \\ \delta = d - r_{max} & pour \;\; d > r_{max} \end{cases} \tag{2.17}$$

où r_{min} et r_{max} représentent les limites de l'intervalle de distances permises pour une contrainte donnée, d est la distance correspondante dans le modèle, K_{nOe} est la constante de force, et n est généralement égal à 2. Notons par ailleurs que le terme E_{nOe} est systématiquement nul lorsque la valeur de distance d est encadrée par les valeurs r_{min} et r_{max}.

- Le potentiel biharmonique adoucie (*softsquare*)

Lorsque la distance d mesurée dans un modèle se situe nettement en dehors de l'intervalle de valeurs permises, le potentiel carré conduit à une pénalité énergétique importante qui pénalise le système et ralentit la convergence des structures. Pour éviter que les énergies de contraintes ne soient trop élevées, le potentiel biharmonique adoucie est utilisé lorsque l'écart entre la distance d et l'intervalle de valeurs atteint un certain seuil. L'introduction d'une asymptote à la courbe (k_{asym}), et des constantes a et b qui assurent la continuité de potentiel, permet ainsi d'adoucir la fonction E_{nOe} dans les cas extrêmes (2.18).

$$E_{nOe} = a + b/\delta + k_{asym}.\delta \tag{2.18}$$

Terme des contraintes angulaires :

Le terme énergétique E_{dih} lié aux contraintes angulaires ϕ (ou ψ) est représenté par une fonction potentielle carrée comparable à celle définie ci-dessus et de la forme suivante :

$$E_{dih} = K_{dih} (\phi - \phi_x)^2 \qquad (2.19)$$

avec ϕ_x la limite minimum ou maximum de l'intervalle de valeurs autorisées pour une contrainte donnée, ϕ la valeur d'angle dans le modèle, et K_{dih} la constante de force associée.

3.2.2) Description du protocole de recuit simulé

Le paragraphe suivant décrit les différentes étapes de la simulation de dynamique moléculaire utilisée pour calculer la structure du domaine K2 de la protéine humaine KIN17.

a) Génération des structures initiales aléatoires

L'étape préalable aux calculs de dynamique moléculaire consiste à générer des structures initiales par tirage aléatoire des angles ϕ et ψ. La topologie de la protéine est obtenue à partir d'un champ de force simplifié défini par les paramètres standard des fichiers *parallhdg* et *topallhdg*. Le fichier *topallhdg* décrit tous les acides aminés avec le type d'atome, de liaison, et d'angle qui les constituent, ainsi que la charge partielle et la masse des atomes. Ce fichier est utilisé par CNS pour créer le fichier de topologie *PSF* spécifique à la séquence du domaine K2. Les paramètres du champ de force sont définis dans le fichier *parallhdg* qui contient toutes les valeurs d'équilibre des liaisons et des angles de valence dièdres et impropres relatives aux différents termes énergétiques. La fonction d'énergie potentielle E_{pot} de ce champ de force simplifié est de la forme suivante :

$$E_{pot} = E_{liaisons} + E_{angles} + E_{impropres} + E_{repel} \qquad (2.20)$$

Cette fonction exclue donc les termes $E_{dièdres}$ et $E_{électrostatique}$ uniquement pris en compte dans le champ de force CHARMM22 utilisé pour le raffinement des structures. Par ailleurs, le terme des interactions de van der Waals est remplacé par un potentiel continu purement répulsif (E_{repel}) similaire à la composante répulsive du potentiel de Lennard-Jones. Ce terme est associé à une constante de force k_{vd_Waals}, et à un facteur multiplicateur du rayon minimum de van der Waals k_{repel}.

b) Recuit simulé

Lors du recuit simulé, la fonction d'énergie du système est recalculée après chaque pas de simulation à partir de la position des atomes via les équations de Newton. Les positions des protons géminés sont régulièrement échangées pendant la procédure (coordonnées et vitesses) de manière à choisir la configuration dans laquelle l'énergie est minimum. Il en est de même pour les méthyles chiraux. Les valeurs des principaux paramètres utilisés pendant la simulation de dynamique moléculaire sont reportées dans le Tableau 3.2.

Recuit simulé	T° [K]	Nombre de pas	k_{vd_Walls}	k_{repel}	k_{nOe}	k_{dih}	k_r	k_θ k_ω
i) Minimisation	-	50						
ii) Chauffage	2000	1300	0.003	0.9	10→50	5	1000	500
iii) Echantillonnage	entre 1000 et 2000	2500	0.003→4	0.9→0.75	50	5	1000	500
iv) Refroidissement	1950→100	1000	4	0.75	50	200	1000	500
v) Minimisation	-	2500						

Tableau 3.2 *: Evolution des principaux paramètres au cours du recuit simulé. Les constantes de force sont exprimées en kcal.mol^{-1}.rad^{-2} à l'exception de k_r et k_{nOe} exprimé en kcal.mol^{-1}.Å^{-2}.*

Le protocole de recuit simulé peut être décomposé en 5 étapes distinctes :

i) La première étape consiste en une **minimisation** de la structure initiale étendue par un algorithme de type Powell.

ii) Le recuit simulé débute par une dynamique de type Verlet où le système est porté à une température de 2000 K. Les constantes de force relatives aux termes d'énergie des élongations de distance, des angles de valence, et des angles impropres sont maintenues à une forte valeur pendant toute la durée de la simulation afin de conserver la géométrie covalente de la protéine. A contrario, la valeur de constante de force k_{vd_Waals} est dans un premier temps choisie faible dans le but d'autoriser les atomes à s'interpénétrer, ce qui permet d'explorer l'espace conformationnel. Aussi, le facteur k_{repel} est fixé à 0.9 afin d'éviter le collapse de la protéine. Lors de cette première phase de **chauffage**, les contraintes expérimentales sont prises en compte par introduction des termes E_{nOe} et E_{dih}. Les contraintes de distance sont par ailleurs privilégiées via une valeur de k_{nOe} progressivement augmentée de 10 à 50.

iii) La troisième étape du protocole est une phase **d'échantillonnage** où la température oscille entre 1000 et 2000 K. La constante k_{vd_Waals} est progressivement augmentée de

0.003 à 4 pour restreindre la pénétration des atomes alors que le facteur k_{repel} est diminué de 0.9 à 0.75.

iv) La dernière étape de dynamique consiste en un **refroidissement** du système de 1950 à 100 K où les contraintes d'angles dièdres sont pleinement prises en compte via une valeur de constante de force fixée à 200.

v) La simulation s'achève par une **minimisation** des structures calculées par un algorithme de type Powell.

3.3) Le programme d'attribution automatique des pics nOe du LSP

Développé récemment au Laboratoire de Structure des Protéines du CEA de Saclay (LSP), le programme d'attribution automatique des nOe est un module de gestion de scripts et logiciels dédiés à la résolution de structures tridimensionnelles de biomolécules par RMN (Savarin et al., 2001). Outre l'attribution des pics nOe, les quatre autres principales fonctions du programme sont : la conversion des données expérimentales en contraintes, l'utilisation et le contrôle des calculs de CNS, l'exploitation des fichiers de sortie de CNS, et l'analyse des structures. La succession de ces différentes actions constitue un cycle de calcul.

L'attribution automatique des nOe est un processus qui n'est efficace que s'il est mené de manière itérative. De ce fait, le programme procède au début de chaque cycle à une nouvelle attribution qui dépend des modèles de plus basse énergie de l'itération précédente. La répétition des cycles de calcul permet d'optimiser l'attribution des pics au fil des itérations, et conduit à une convergence des structures vers un repliement unique. Les paragraphes suivants sont consacrés à la description des méthodologies utilisées par le programme pour attribuer et convertir les volumes des pics nOe en contraintes de distance.

3.3.1) Gestion des contraintes de distance

a) Notion de contrainte de distance ambiguë

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2.1.1, le volume d'un pic de corrélation dipolaire V_{ij} entre deux protons i et j peut être relié à la distance r_{ij} séparant les deux noyaux via un facteur de calibration (ou de référence) R_{cal} :

$$r_{ij} = R_{cal} \left(\frac{1}{V_{ij}} \right)^{1/6} \qquad (2.21)$$

La distance r_{ij} constitue alors une contrainte de distance non ambiguë. En revanche, lorsque plusieurs attributions sont possibles pour un même pic, le programme d'attribution automatique considère le volume de ce pic V_x comme la somme des contributions dipolaires entre plusieurs paires de protons :

$$V_x = \sum_{x=1}^{n} \frac{1}{r_x^6} \cdot R_{cal}^6 \qquad (2.22)$$

avec r_x l'ensemble des distances entre paires d'atomes *i* et *j* relatif au *n* nombre d'attributions possibles. Selon ce principe, la contrainte de distance ambiguë $\bar{r}$ introduite par Nilges en 1995 (Nilges, 1995) peut s'écrire de la manière suivante :

$$\bar{r} = \left(\sum_{x=1}^{n} \frac{1}{r_x^6} \right)^{-1/6} \cdot R_{cal} \qquad (2.23)$$

Cette notion de contrainte ambiguë est fondamentale car elle va permettre d'intégrer au calcul de la structure des informations nOe dont l'attribution est incertaine. La gestion des attributions ambiguës et non ambiguës est un des principes sur lequel repose la stratégie du programme d'attribution automatique.

b) Calibration des distances inter-atomiques

La conversion des volumes nOe en distance nécessite de déterminer préalablement la valeur du facteur de calibration R_{cal} relative à chaque expérience NOESY-HSQC. La méthode classique consiste à relever le volume de plusieurs pics référents V_{ref} qui correspondent à la corrélation de 2 protons géminés aliphatiques, ou de 2 protons aromatiques appartenant au même cycle, et dont la distance r_{ref} les séparant est connue et fixe. La valeur de R_{cal} peut alors être obtenue par la relation suivante :

$$R_{cal} = r_{ref} \cdot V_{moy}^{1/6} \qquad (2.24)$$

avec V_{moy} la moyenne des volumes V_{ref}. Cette méthode manuelle et simple permet une première estimation approximative de la valeur de facteur de calibration utilisée lors des premières itérations. Le programme d'attribution automatique offre la possibilité d'obtenir une calibration plus exacte à partir des premières structures repliées de la protéine. La procédure consiste à comparer les distances calculées à partir du volume nOe (r^{nOe}) avec ces mêmes distances mesurées dans les modèles (r^{obs}) (2.25). Selon ce principe, une valeur de rapport *C* proche de 1 indique que la valeur de facteur de calibration R_{cal} utilisée est adaptée à

la quantification des volumes nOe. Dans le cas contraire, le paramètre R_{cal} doit être réajusté selon que la valeur de C est inférieure ou supérieure à 1. Cette méthode est avantageuse car elle donne la possibilité d'affiner la calibration au fil des itérations.

$$C = \frac{\sum_{ij} r_{ij}^{nOe}}{\sum_{ij} r_{ij}^{obs}} \qquad (2.25)$$

c) Les intervalles de distances permises

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe 2.1.1, le rapport de proportionnalité entre le volume nOe et la distance inter-atomique ^{1}H repose sur l'approximation d'un mouvement isotrope de la molécule étudiée (τ_c moyenné). Aussi, la différence de τ_c résultant de mouvements internes de la protéine, et le phénomène de diffusion de spin, rendent la quantification du nOe approximative. Pour tenir compte de cette imprécision, les distances inter-protons sont classiquement introduites dans les protocoles de calcul CNS sous forme d'un intervalle de distances permises :

$$r_{ij} - \Delta < r_{ij} < r_{ij} + \Delta \qquad (2.26)$$

avec Δ représentant l'erreur sur la contrainte de distance r_{ij}. Le programme d'attribution automatique propose à l'utilisateur 3 expressions distinctes pour calculer le paramètre Δ :

$$\begin{aligned} &\text{mode 1 :} \quad \Delta = 0.25.r_{ij} \\ &\text{mode 2 :} \quad \Delta = 0.125.(r_{ij})^2 \\ &\text{mode 3 :} \quad \Delta = 0.15.r_{ij} \end{aligned} \qquad (2.27)$$

Ces expressions peuvent être utilisées pour définir l'erreur sur les contraintes de distance entre protons de la chaîne principale (variable *ER_MODE_SQE*), et sur les contraintes d'autre nature (variable *ER_MODE*). Dans le cas de l'étude du domaine protéique K2, l'incertitude Δ sur la distance r_{ij} séparant deux protons de la chaîne principale a été estimée à 25% de r_{ij} (*ER_MODE_SQE* = 1). L'amplitude des mouvements de chaîne latérale pouvant influer de manière significative sur l'intensité du nOe, l'erreur sur la distance séparant un proton de chaîne latérale avec un autre noyau est généralement plus importante et a été estimée à 12.5% du carré de la distance r_{ij} (*ER_MODE* = 2).

Par ailleurs, les intervalles de valeurs permises doivent tenir compte de la réalité physique du nOe. Ainsi, le programme tolère une limite maximale définie par la variable

DRMNMAX et contrôlée par le mode *DRMNMAX_MODE*. Le mode *suppression* conduit au rejet d'une contrainte dont la limite maximale est supérieure à la valeur de *DRMNMAX*. Pour notre part, la valeur de *DRMNMAX* a été fixée à 5.3 Å, et nous avons préféré utiliser le mode *truncature* qui réduit systématiquement la limite maximale d'une contrainte à la valeur de *DRMNMAX* lorsque celle-ci est supérieure à *DRMNMAX*.

3.3.2) Préparation des données initiales

L'utilisation du programme d'attribution automatique du LSP nécessite dans un premier temps de préparer un certain nombre de données initiales contenant :

- Une table des déplacements chimiques des noyaux ^{1}H, ^{15}N, et ^{13}C de la protéine pour chaque expérience NOESY-HSQC éditée ^{15}N, et ^{13}C.

- Une liste des pics nOe de chaque expérience où sont reportés le volume de chaque pic et ses coordonnées en déplacement chimique.

- Un fichier de contraintes de distances non ambiguës attribué manuellement et qui renseigne sur la topologie de la protéine (fichier *ss.cons*).

- Un fichier de contraintes dihédrales sur les angles ϕ et ψ

Le fichier de topologie, appelé *ss.cons*, contient des informations de distance qui renseignent sur la structure secondaire et tertiaire de la protéine. Ces éléments obtenus après analyse des paramètres structuraux RMN indiquent principalement, la topologie des feuillets β déduite des nOe caractéristiques inter-brins, et la formation de liaisons hydrogène déduites des expériences de spectroscopie d'échange. Il est à noter que les fichiers de contraintes dièdres et de topologie ne sont pas utilisés de manière directe pour attribuer les pics nOe dans le programme d'attribution automatique. Ces données sont converties au format CNS, et systématiquement introduites dans les protocoles de calcul CNS à chaque itération, et quelles que soient les attributions choisies. Par conséquent, un certain nombre d'informations de structure tertiaire sont dupliquées dans les fichiers de contraintes de CNS.

3.3.3) Stratégie d'attribution des pics

a) Collecte des possibilités d'attribution

La première phase du processus d'attribution automatique consiste à comparer les valeurs des tables de déplacements chimiques de la protéine aux déplacements chimiques des

pics nOe afin d'établir la liste de toutes les attributions possibles de chaque pic. Pour cela, un intervalle de tolérance est défini par l'utilisateur pour chacune des trois coordonnées des nOe. Les gammes de tolérance classiquement testées sont : ± 0.02 ppm dans la dimension ^{1}H d'acquisition, ± 0.25 ppm sur la fréquence de résonance de l'hétéroatome ^{15}N ou ^{13}C, et ± 0.04 ppm dans la dimension ^{1}H indirecte. Les nOe pour lesquels aucune possibilité d'attribution n'est déterminée constituent la liste des non attribués, et sont soumis à un nouveau processus d'attribution lors de l'itération suivante.

Par ailleurs, il est parfois constaté pour certains protons une légère différence entre la valeur de déplacement chimique définie dans les tables et la valeur réelle sur les spectres NOESY-HSQC. Aussi, le programme d'attribution automatique repère ces « décalages » systématiques afin que l'utilisateur puisse modifier en conséquence les tables de déplacements chimiques de la protéine en fin d'itération.

b) Le paramètre de seuil

Une fois établie la liste de toutes les possibilités d'attribution relatives à chaque pic, chacune des corrélations potentielles entre 2 protons *i* et *j* est associée à une valeur de distance d_x. Le paramètre d_x correspond à la distance moyenne qui sépare les 2 protons *i* et *j* dans les modèles de plus basse énergie de l'itération précédente (ou dans les structures initiales aléatoires pour la première itération). Il constitue la donnée principale utilisée par le programme pour choisir le nombre d'attributions de chaque pic. La méthode consiste à convertir chaque moyenne de distance d_x, relative à une possibilité d'attribution, en une intensité nOe théorique moyenne I_x selon la relation suivante :

$$I_x = \frac{1}{d_x^6} \qquad (2.28)$$

Par cette définition, la contribution I_x traduit véritablement le poids d'une attribution par rapport à une autre : plus la distance moyenne d_x entre 2 protons est courte, et plus la contribution moyenne associée I_x sera importante. Ainsi, à l'issue de cette seconde étape, chaque possibilité d'attribution d'un pic donné est associée à un poids différent.

A ce stade du traitement des données, le programme utilise un paramètre de seuil *p*, compris entre 10^{-4} et 0.3, pour déterminer le nombre d'attributions retenues pour chaque pic :

les contributions I_x sont classées par ordre décroissant, puis chacune d'entre elles est comparée à la précédente en commençant par la contribution la plus forte (systématiquement sélectionnée). Si pour une possibilité donnée, la valeur de son poids I_{x-1} est supérieure au produit pI_x, alors l'attribution est retenue et le poids I_{x-2} est ensuite comparé au produit pI_{x-1} de la même manière. Dans le cas contraire, si $I_{x-1} < pI_x$, alors l'attribution est rejetée ainsi que toutes les autres dont la valeur de contribution I_{x-n} est inférieure à I_{x-1}. Le processus de sélection du nombre d'attributions est alors terminé. Au final, ce nombre ne peut excéder 20 attributions par pic.

Prenons l'exemple d'un pic pour lequel 5 attributions sont possibles. Dans le cas le plus simple, considérons les corrélations potentielles d'un proton A avec respectivement, un proton B, C, D, E, ou F. A chacune de ces possibilités d'attribution correspond, une distance moyenne séparant chacun des 2 protons respectifs dans les modèles précédents (d_{AB}, d_{AC}, d_{AD}, d_{AE}, et d_{AF}), et une contribution moyenne associée (I_{AB}, I_{AC}, I_{AD}, I_{AE}, et I_{AF}). La figure 3.13 représente l'histogramme des contributions classées par ordre décroissant.

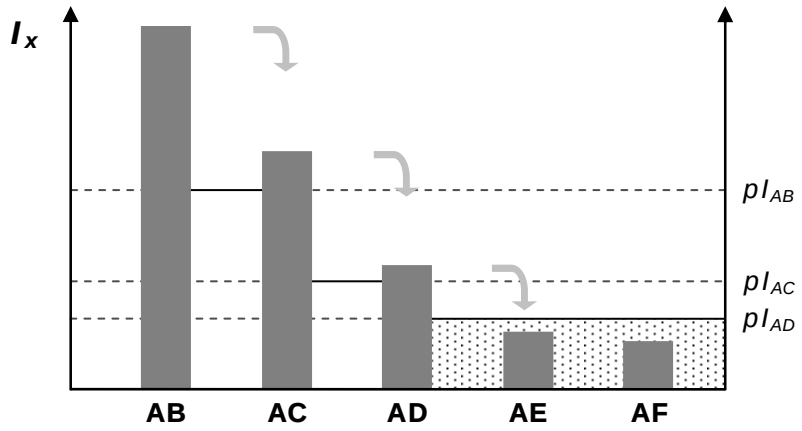


***Figure 3.13** : Principe de la sélection du nombre d'attributions d'un pic nOe en fonction du paramètre de seuil p. Les contributions sont dans un premier temps triées par ordre décroissant puis chacune d'elles est comparée à la précédente. Une possibilité d'attribution est sélectionnée si et seulement si $I_{x-1} > pI_x$.*

Dans notre exemple, le poids I_{AB} constitue la contribution la plus importante et sert donc de point de départ. La valeur de contribution I_{AC} étant supérieure au produit pI_{AB}, la possibilité d'attribution AC est par conséquent sélectionnée. La valeur de I_{AC} est ensuite utilisée pour définir le seuil d'attribution suivant et conduit à la sélection de la possibilité AD car $I_{AD} > pI_{AC}$. Chaque contribution est ainsi comparée à la précédente tant que la valeur de I_{x-1} est supérieure au produit pI_x. Dans notre exemple, ce n'est plus le cas pour la possibilité AE car

$I_{AE} < pI_{AD}$, ce qui amène à rejeter les attributions AE et AF. Finalement, seules les attributions AB, AC, et AD sont maintenues après application du paramètre de seuil.

Lors des premières itérations, l'utilisation d'une valeur faible de paramètre de seuil *p* favorise les attributions multiples et par conséquent, la constitution de contraintes ambiguës. Au fil des calculs, l'augmentation de la valeur de *p* permet de restreindre le nombre d'attributions possibles pour chaque pic, et donc de diminuer la quantité de contraintes ambiguës au profit des contraintes non ambiguës.

La sélection du nombre d'attributions par un paramètre de seuil présente plusieurs atouts. Le premier réside dans la capacité du programme à intégrer un maximum de possibilités d'attribution lors des premières itérations, et donc à explorer « l'espace conformationnel des nOe ». En effet, l'ajout d'attributions ambiguës à une contrainte de distance ne conduit pas à une violation énergétique tant que la véritable attribution figure dans les différentes possibilités. La multiplication des contraintes ambiguës ne pénalise donc pas le système lors des premières itérations, mais elle contribue à une dilution de l'information, et limite la convergence des modèles. C'est pourquoi, la valeur de paramètre de seuil est incrémentée au fil des calculs afin de réduire progressivement le nombre d'attributions de chaque pic. Par ailleurs, notons ici le rôle important du fichier de topologie *ss.cons* qui permet d'orienter le repliement de la protéine dès les premiers calculs et par conséquent, de guider indirectement le programme vers les attributions les plus probables d'un point de vue de la structure 3D. Finalement, l'augmentation progressive du paramètre de seuil conduit à la convergence des structures générées vers un repliement unique dont les distances intra-moléculaires ^{1}H correspondent le mieux à un jeu de données expérimentales nOe.

c) Nombre de structures contribuant à une attribution

Comme nous venons de l'évoquer, la sélection du nombre d'attributions par pic est obtenue à partir de l'analyse des 10 structures de plus basse énergie de l'itération précédente via le paramètre d_x. Aussi, la distance r_{ij} relative à une possibilité d'attribution peut être très variable d'un modèle à l'autre, et notamment lors des premières itérations où la convergence des structures est faible. C'est pourquoi, le programme utilise une valeur seuil *cut-off* de 20 Å pour considérer une possibilité d'attribution dans un modèle. Dès lors, seules les possibilités qui répondent à la condition $r_{ij} < 20$ Å dans un nombre suffisant de structures sont

sélectionnées. On parle ainsi de nombre de structures contribuant à une attribution. La valeur de ce paramètre est progressivement augmentée au fil des calculs (de 4 à 6), ce qui contribue à la convergence des attributions, et donc des structures au fil des itérations.

d) Gestion des pics intra-résiduels

Deux modes sont proposés par le programme d'attribution automatique pour traiter les nOe relatifs aux corrélations intra-résiduelles. En mode *intra*, chaque possibilité de type intra-résiduel est associée à un paramètre d_x de 1.0 Å, ce qui favorise considérablement ce type d'attribution par rapport aux autres possibilités via une valeur forte de I_x. En mode *non-intra*, le paramètre d_x est utilisé comme défini dans le paragraphe précédent, et quel que soit le type de corrélation. Le mode *intra*, utilisé pour la plupart des itérations, permet de limiter le nombre de contraintes ambiguës au profit d'attributions plus évidentes, ce qui conduit à une convergence plus rapide des structures. Ce mode favorise toutefois à outrance les attributions intra-résiduelles. Aussi, le mode *non-intra* est utilisé lors des 3 dernières itérations, lorsque la protéine est repliée, afin de tenir compte du repliement de la protéine de manière plus réaliste pour réaliser l'attribution automatique des pics.

e) Gestion des pics symétriques

Sur les spectres NOESY-HSQC éditée ^{13}C, la présence d'un pic de corrélation entre 2 protons aliphatiques *i* et *j* sur un plan $^{13}C_i$ peut être accompagnée d'un pic réciproque ou symétrique sur le plan $^{13}C_j$ lorsque la résolution spectrale le permet. Dans le cas d'une corrélation de type inter-résiduelle, l'identification de 2 pics réciproques est un argument supplémentaire qui conforte leur attribution. Aussi, lorsque 2 pics symétriques sont repérés par le programme, l'attribution de type « réciproque » est favorisée par rapport aux autres possibilités en recevant une valeur de paramètre d_x de 1.5 Å. Après application du paramètre de seuil, si ces 2 pics sont dotés de la même attribution, le programme supprime alors une des 2 informations et convertit la distance moyenne en contrainte.

3.3.4) Les filtres d'attribution

Une fois établie la liste des attributions sélectionnées, le programme met à disposition de l'utilisateur un certain nombre de filtres d'attribution dont l'objectif est d'améliorer la qualité des attributions, et donc des structures générées, en favorisant les conformations

vraisemblables. L'application de ces différents filtres conduit à une diminution du nombre d'attributions et constitue la dernière étape avant la conversion en contraintes de distance au format CNS.

a) Le filtre *dRMN trop grande*

Malgré la notion d'intervalle de distances permises introduite pour tenir compte de l'incertitude de la quantification du nOe, il est possible que les distances associées aux volumes de certains pics soient démesurées par rapports aux distances correspondantes dans les structures calculées. Ceci est notamment observé, pour des effets à longue distance, lors des premières itérations où la structure n'est encore que partiellement repliée. Aussi, l'intégration de ce type de contraintes peut conduire à des violations et pénalités énergétiques importantes. Le filtre *dRMN trop grande* repère et supprime ces pics trop intenses avant leur conversion en contraintes. Lors des itérations finales, l'application de ce filtre ne doit conduire qu'à rejeter un très faible nombre de pics pour lesquels la distance déduite du nOe apparaît trop courte en raison de problèmes d'homogénéité de la calibration ou de dynamique intra-moléculaire inhérents à la technique RMN.

b) Le filtre *DIAG*

Le filtre *DIAG* (pour *diagonal plot*) est utilisé pour éviter le calcul de conformations qui correspondent à un repliement inexact ou incohérent d'une partie de la protéine. Il recherche et supprime les attributions longue distance dites « isolées ». En pratique, lorsque l'attribution d'un nOe est associée à la corrélation entre 2 protons appartenant à 2 résidus éloignés dans la séquence primaire, si aucun autre pic ne correspond à un contact longue distance entre protons appartenant aux mêmes résidus ou à des résidus voisins, alors l'attribution est considérée comme suspecte. Le pic est alors filtré mais l'attribution n'est pas définitivement supprimée. Au fil des itérations, le pic peut être à nouveau considéré si l'évolution du repliement fait apparaître d'autres nOe longue distance qui impliquent les mêmes régions de la protéine.

c) Le filtre *SUPRES*

L'option *SUPRES* permet d'utiliser les informations de flexibilité des résidus non structurés des extrémités N- et C-terminales pour diminuer le nombre d'attributions. En effet,

ces résidus en échange conformationnel très rapide ne peuvent donner naissance à des nOe longue distance sur les spectres de type NOESY où l'information est moyennée sur l'ensemble de l'espace conformationnel. Par conséquent, à partir d'une liste de ces résidus fournie par l'analyse du nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (cf. § 2.2.4), l'option *SUPRES* rejette systématiquement chaque attribution de type longue distance qui corrèle un proton de résidu quelconque avec un autre appartenant à un résidu de cette liste.

d) Le filtre *SUPRES_LAT*

Selon le même principe, cette option supprime l'ensemble des attributions inter-résiduelles qui associent un proton de résidu quelconque avec un proton de chaîne latérale d'un résidu de la liste *SUPRES_LAT*. Ainsi, les filtres *SUPRES* et *SUPRES_LAT* permettent de tenir compte de données dynamiques obtenues par RMN, et par conséquent, d'éviter le calcul de structures incohérentes avec ces paramètres.

e) Le filtre *SUP2_ini*

Le fichier *SUP2_ini* est une liste arbitraire qui définit l'ensemble des attributions interdites pour chaque pic donné. Cette option offre à l'utilisateur la possibilité de contrôler partiellement l'attribution de certains pics nOe. Aussi, les filtres d'attribution ne sont utilisés qu'après application du paramètre de seuil *p*. Par conséquent, le filtre *SUP2_ini* ne permet pas d'influencer de manière directe l'attribution des nOe, mais conduit au rejet des pics dont une certaine attribution n'est pas souhaitée.

3.3.5) Gestion des violations

Les violations de distance systématiques retrouvées à chaque itération sont souvent dues à des erreurs d'attribution de résonance de la protéine, ou à l'intégration de pics qui correspondent en réalité à du bruit spectral. Aussi, les contraintes qui engendrent ce type de violations supportent une information erronée, qui peut ralentir la convergence du repliement au fil des itérations, ou conduire à des conformations inexactes. Pour pallier ce problème, le programme d'attribution exploite les fichiers de sortie du logiciel CNS à la fin de chaque cycle, et établit la liste *SUP2* des violations de distance supérieures à 0.5 Å communes à au moins 4 des 10 meilleures structures. Chaque attribution qui figure sur cette liste est alors supprimée lors de l'itération suivante après application du paramètre de seuil. Notons par

ailleurs que la composition du fichier *SUP2* est différente à chaque itération : aucune attribution n'est supprimée définitivement et c'est à l'utilisateur que revient cette tâche.

3.3.6) Analyse et validation des structures

Les ressources informatiques du Laboratoire de Structure des Protéines permettent le calcul d'un grand nombre de structures. Une sélection s'impose donc pour ne conserver que les meilleures, du point de vue de la géométrie covalente et du respect des contraintes expérimentales. Plusieurs critères sont classiquement utilisés pour évaluer leur qualité :

a) Le logiciel PROCHECK

Les valeurs des angles dièdres ϕ et ψ des modèles générés doivent occuper les zones permises du diagramme de Ramachandran qui définit les régions favorables de l'espace conformationnel (Ramachandran et al., 1971). Le logiciel PROCHECK (Laskowski et al., 1996) permet d'observer la répartition de ces couples d'angles, et facilite l'identification des structures secondaires. On considère généralement que les structures finales sont de bonne qualité lorsque moins de 1% des valeurs d'angles ϕ et ψ occupent les régions interdites.

b) Les termes énergétiques

La fonction d'énergie est un paramètre fondamental pour valider les structures calculées. Les valeurs des différents termes énergétiques reflètent la qualité de la géométrie covalente, et renseignent sur le degré de prise en compte des contraintes expérimentales. Aussi, l'objectif de la répétition des processus itératifs n'est autre que de générer des structures dont l'énergie associée est la plus basse possible. Selon ce principe, les structures finales doivent présenter une bonne géométrie covalente, des violations de distance inférieures à 0.5 Å, et des violations d'angles dièdres inférieures à 10°, pour être considérées comme étant de bonne qualité.

3.3.7) Description des cycles itératifs

La phase préliminaire du processus itératif consiste à générer 10 structures aléatoires à partir des fichiers de paramètres CNS qui définissent le champ de force et la géométrie de la protéine. L'attribution automatique de la première itération est réalisée à partir de ces structures aléatoires, et des différentes listes de déplacements chimiques et de pics nOe. Le nombre de structures contribuant à une attribution doit être supérieur à 4, et la valeur de *p* est fixée à 0.0001. Les facteurs de calibration sont dans un premier temps estimés à partir du volume de pics référents sur les différents spectres NOESY-HSQC. Après application des filtres d'attribution, le premier jeu de distances inter-atomiques ^{1}H est constitué. Les contraintes dièdres et de distance (dont les données de topologie) sont converties au format CNS, puis intégrées aux protocoles de dynamique moléculaire. Lors de la première itération, un premier jeu de 100 structures est généré par le logiciel CNS. Le programme d'attribution prend alors en charge le traitement de ces 100 modèles. Les 20 structures de plus basse énergie sont sélectionnées, triées par ordre croissant d'énergie, puis les 10 premières font l'objet d'analyses systématiques : bilan des énergies moyennes pour chaque terme du champ de force, analyse des angles ϕ et ψ par le logiciel PROCHECK, et calcul des écarts quadratiques moyens sur le squelette. Le programme permet également d'obtenir une synthèse des violations de distance systématiques sur ces 10 meilleurs modèles à partir des fichiers de sortie du logiciel CNS.

Après traitement des résultats de la première itération, le programme entre dans un processus itératif de 22 cycles où se succèdent l'attribution des nOe, le calcul des modèles, et l'analyse des 10 meilleures structures (Figure 3.14). A l'issue de chaque cycle, les 10 modèles de plus basse énergie, ainsi que la liste de leurs violations, sont utilisés pour réaliser l'attribution de l'itération suivante. Ces 10 meilleurs modèles constituent également les structures de départ des protocoles de dynamique moléculaire. Au fil des itérations, les valeurs de paramètre de seuil et de nombre de structures contribuant à une attribution sont progressivement augmentées (Figure 3.15). Il en est de même pour le nombre de structures calculées qui est fixé à 200 à partir du treizième cycle, puis à 300 à la vingtième itération.

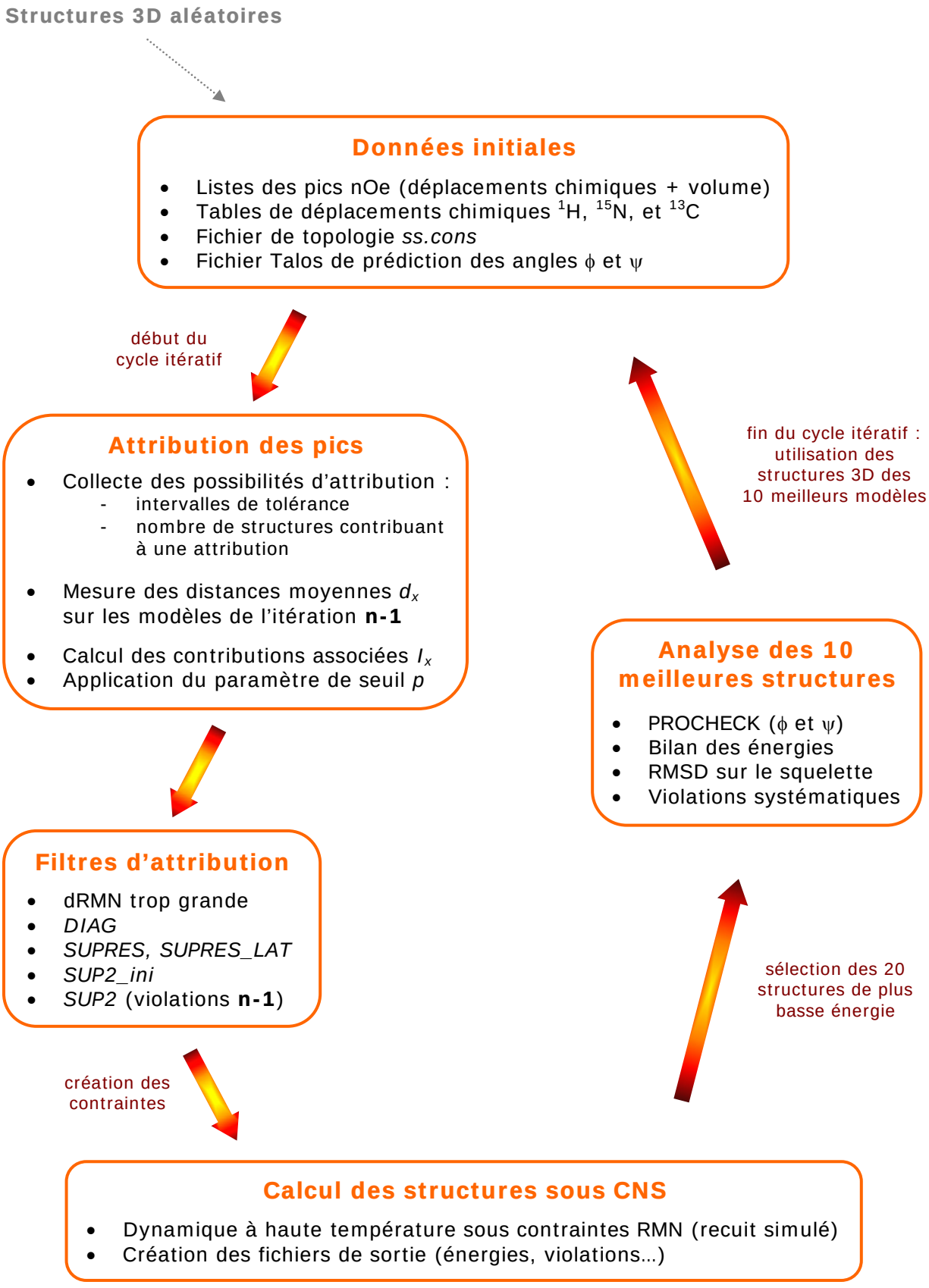


Figure 3.14 *: Description d'un cycle itératif du programme d'attribution automatique des nOe développé au Laboratoire de Structure des Protéines du CEA de Saclay (Savarin et al., 2001).*

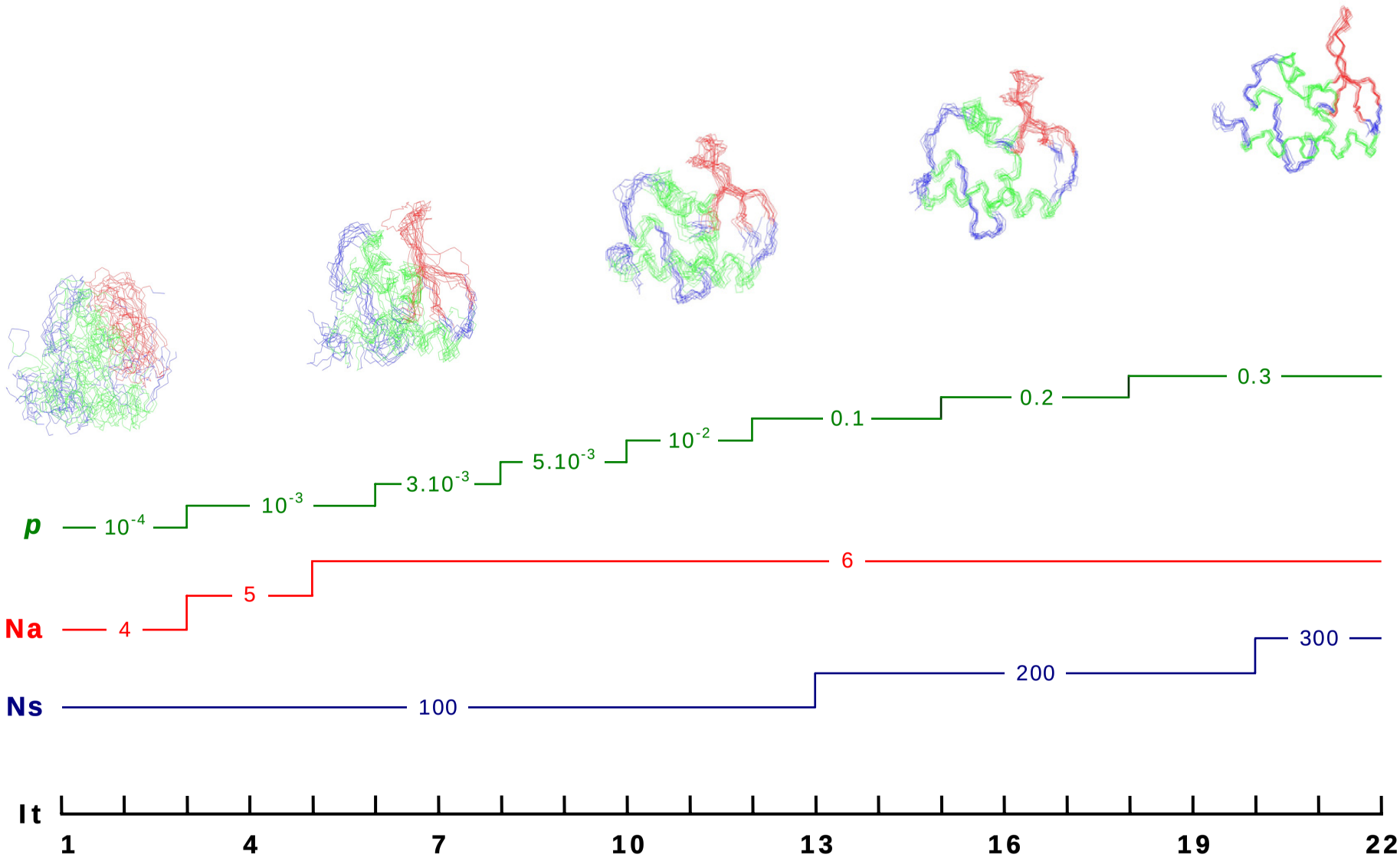


Figure 3.15 *: Evolution de paramètres du programme d'attribution au fil des 22 cycles (It) du processus itératif. Les différentes annotations correspondent au nombre de structures calculées (Ns), au nombre de structures contribuant à une attribution (Na), et au paramètre de seuil (p)*

Finalement, les 20 meilleures structures du dernier cycle sont soumises à une étape de raffinement dans le champ de force CHARMM22 en solvant implicite. Les structures convergentes obtenues lors des dernières itérations sont utilisées pour réajuster les valeurs de facteur de calibration via le calcul du rapport C. Ces valeurs pourront être appliquées lors des processus itératifs suivants, puis à nouveau optimisées en recalculant le rapport C.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les violations sont dans la plupart des cas dues à des erreurs d'attribution de résonance de la protéine, ou à des inexactitudes inhérentes à la spectroscopie de RMN (recouvrement spectral, dégénérescence du signal, bruit, dynamique interne…). L'analyse manuelle des violations en fin de chaque processus itératif de 22 cycles est par conséquent nécessaire afin d'identifier les informations erronées en contradiction avec le repliement de la protéine. La correction progressive du jeu de données expérimentales est alors concomitante avec la baisse des énergies, la convergence des structures, le respect du diagramme de Ramachandran, et l'élimination des violations.

CHAPITRE 4

Caractérisation structurale du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire

1) Détermination de la structure du domaine K2 de KIN17 humaine

1.1) Attribution des raies de résonance

L'attribution des raies de résonance des 111 acides aminés du domaine K2 a été réalisée selon la stratégie définie dans le chapitre précédent. Les différentes expériences 3D hétéronucléaires utilisées pour déterminer le déplacement chimique de chaque noyau, et recueillir les contraintes expérimentales, ont été enregistrées à 30°C et à pH 6.0 sur un spectromètre 600 MHz équipé d'une cryosonde triple résonance ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C.

Un échantillon unique de protéine doublement marquée ^{15}N / ^{13}C concentrée à 0.7 mM a suffi pour mener à bien l'attribution séquentielle du squelette peptidique. La combinaison des expériences HNCO, (HCA)CO(CAN)NH, HNCA, CBCANH, et CBCA(CO)NH a conduit à l'identification des valeurs de déplacement chimique des carbones ^{13}CO, $^{13}C_{\alpha}$, et $^{13}C_{\beta}$ des résidus i et i-1 relatifs à chaque groupement amide. Il est à noter que l'expérience (HCA)CO(CAN)NH, plus sensible que HN(CA)CO, a été préférée pour obtenir les corrélations des ^{13}CO intra- et inter-résidus. De plus, l'expérience HN(CO)CA, qui a également été enregistrée, n'a pu être exploitée en raison d'un problème d'artéfacts. L'interprétation de ces 5 expériences par paire a permis dans un premier temps de connecter les résidus deux à deux, puis de reconstituer l'ensemble de la séquence peptidique à partir des acides aminés facilement identifiables tels que les glycines, thréonines, sérines, alanines, et prolines. La Figure 4.1 présente un exemple d'attribution séquentielle de la région F23-L28. L'attribution de la chaîne principale a finalement été complétée par l'analyse des spectres HNHA et HBHA(CO)NH.

L'optimisation préalable des conditions d'analyse a permis d'obtenir des spectres de qualité qui contiennent une quantité d'information satisfaisante. Dès lors, la bonne dispersion des pics sur le spectre HSQC ^{15}N-^{1}H a facilité l'attribution de la totalité des résonances $^{1}H_{N}$, $1H_{\alpha}$, $^{15}N_{H}$, ^{13}CO, et $^{13}C_{\alpha}$ du domaine K2 à l'exception des résidus G1, Q2, et R53 dont les déplacements chimiques du groupement amide sont manquants. L'absence de corrélation ^{15}N-^{1}H de résidu appartenant à une extrémité flexible N- ou C-terminale est un phénomène classique qui s'explique par l'échange rapide du proton amide exposé au solvant avec les protons de l'eau. Aussi, en anticipant sur la résolution de la structure tridimensionnelle,

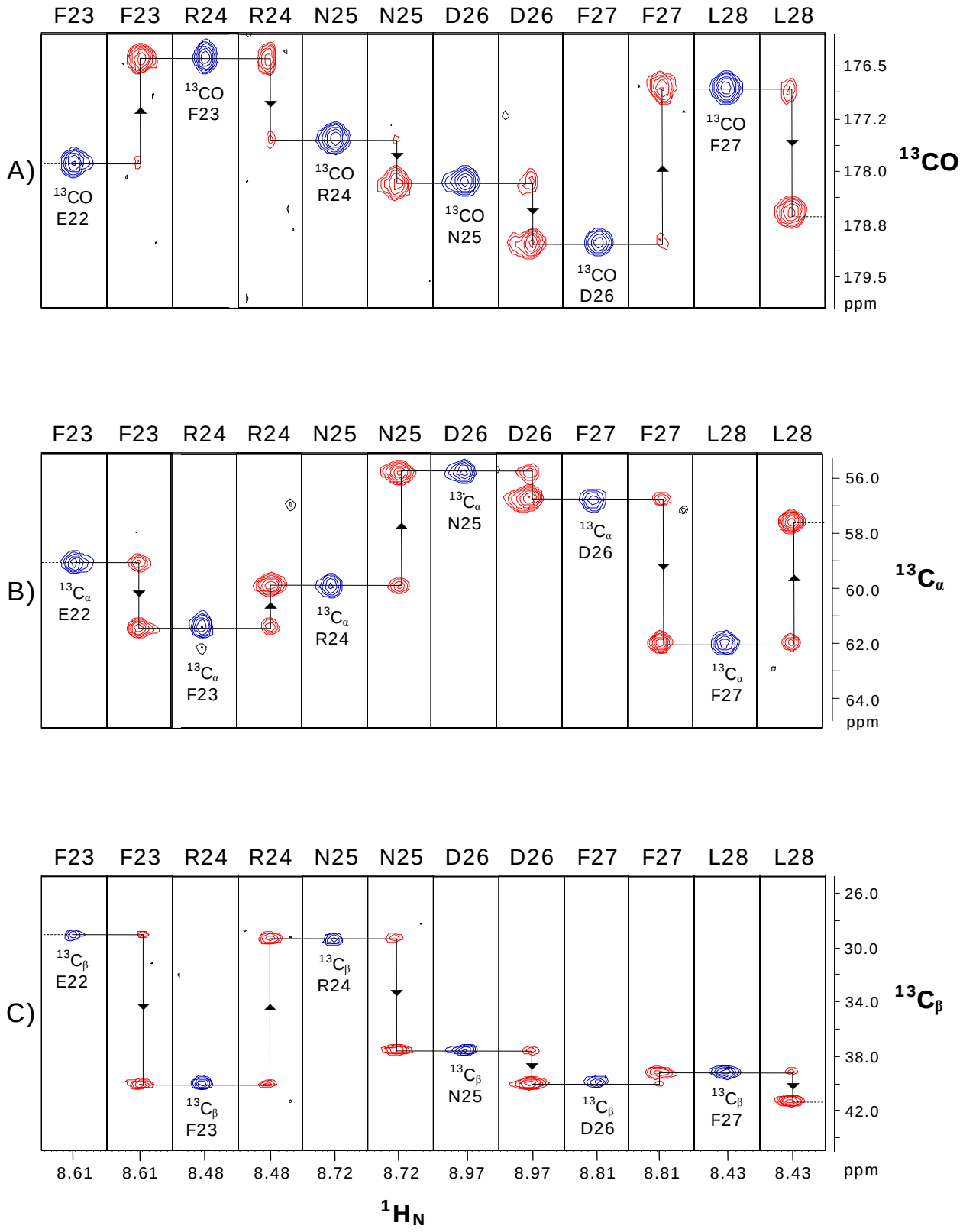


Figure 4.1 *: Attribution des fréquences ^{13}CO, $^{13}C_\alpha$, et $^{13}C_\beta$ de la région F23-L28 du domaine K2. Les bandes sont extraites des plans ^{15}N des spectres, A) HNCO (en bleu) et (HCA)CO(CAN)NH (en rouge), B) CBCA(CO)NH (en bleu) et HNCA (en rouge), et C) CBCA(CO)NH (en bleu) et CBCANH (en rouge) au déplacement chimique $^{1}H_N$ des résidus correspondants. Le chemin d'attribution est indiqué par des lignes horizontales fléchées.*

l'échange rapide du proton amide R53 peut être expliqué par son appartenance à un résidu situé dans une boucle, et à sa forte exposition au solvant.

Les fréquences de résonance des noyaux ^{1}H et ^{13}C des chaînes latérales ont été déterminées à partir des spectres HCCH-TOCSY, HCCH-COSY, et ^{13}C-NOESY-HSQC. Un échantillon unique de protéine doublement marquée ^{15}N / ^{13}C concentrée à 0.7 mM, préalablement lyophilisée, puis solubilisée dans du D_2O (99.9 %) a suffi pour enregistrer l'ensemble de ces expériences sur les régions aliphatiques et aromatiques. La totalité des noyaux des chaînes latérales aliphatiques des 111 acides aminés de K2 a été attribuée. En ce qui concerne les chaînes aromatiques, toutes les fréquences de résonance des résidus histidine, tyrosine, et tryptophane ont été identifiées à l'exception des proton et carbone Z2 du résidu W63. Le bilan de l'attribution est plus mitigé pour les phénylalanines, et seules 3 des 6 chaînes latérales ont été totalement attribuées (F19, F23, et F15). Par ailleurs, l'expérience ^{15}N-TOCSY-HSQC a été enregistrée sur un échantillon uniformément marqué ^{15}N afin de vérifier l'attribution. Cependant, compte tenu de la faible efficacité du transfert TOCSY ^{1}H notamment due à la taille de la protéine K2, moins de la moitié des valeurs de déplacement chimique aliphatique ^{1}H a pu être contrôlée. La dernière étape de l'attribution du domaine K2 a consisté à enregistrer le spectre ^{15}N-NOESY-HSQC sur l'échantillon ^{15}N, ce qui a permis d'attribuer la totalité des 13 groupements NH_2 de résidus asparagine et glutamine à l'exception de N42.

L'identification des fréquences de résonance du domaine K2 de la protéine KIN17 humaine a fait l'objet d'une note d'attribution soumise et acceptée dans la revue *Journal of Biomolecular NMR* (Carlier et al., 2006). Cet article, présenté dans les pages suivantes, est accompagné d'un supplément technique (*Supplemental Material*) disponible sur le site de *J.Biomol.NMR*. à l'URL suivante : http://dx.dio.org/10.1007/10858-006-0013-y.

Journal of Biomolecular NMR (2006)

Letter to the Editor

NMR assignment of region 51–160 of human KIN17, a DNA and RNA-binding protein
DOI 10.1007/s10858-006-0013-y

KIN17 is a 45 kDa nuclear protein which is remarkably conserved in eukaryotes, ubiquitously expressed in mammals, and forms intra-nuclear foci in proliferating cells. Major features of KIN17 are its ability to bind DNA and RNA and to be up-regulated in response to UV and irradiation, suggesting a role in DNA replication, the DNA damage response or RNA processing (Pinon-Lataillade et al., 2004; Miccoli et al., 2005). Human KIN17 comprises an N-terminal zinc finger (27–50) and a C-terminal KOW motif (335-373). Here we report the ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C assignments of the region 51–160 of human KIN17 as a preliminary step toward obtaining the atomic structure of this region and elucidating its biological function.
Residues corresponding to the KIN17 domain were all identified: 99% of the backbone chemical shifts, and for the side chains, all the aliphatic and 88% of the aromatic ^{1}H-^{13}C nuclei were assigned. BMRB deposit with accession number 6938.
References: Miccoli et al. (2005) Mol. Cell. Biol., **25**, 3814-3830; Pinon-Lataillade et al. (2004) *J. Cell. Sci.*, **117**, 3691–3702.

Ludovic Carlier[a], Albane le Maire[b], Sandrine Braud[b], Cedric Masson[b], Muriel Gondry[b], Sophie Zinn-Justin[a], Laure Guilhaudis[a], Isabelle Milazzo[a], Daniel Davoust[a], Bernard Gilquin[b] & Joël Couprie[b,*]
[a]*Equipe de Chimie Organique et Biologie Structurale, CNRS UMR 6014, IFRMP 23, Université de Rouen, France;* [b]*Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines, CEA Saclay, 91191, Gif-sur-Yvette, France*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: joel.couprie@cea.fr
Supplementary material is available in electronic format at http://dx.dio.org/10.1007/10858-006-0013-y.

Letter to the Editor (Supplemental Material)

NMR assignment of region 51-160 of human KIN17, a DNA and RNA-binding protein

Ludovic Carlier[a], Albane le Maire[b], Sandrine Braud[b], Cédric Masson[b], Muriel Gondry[b], Sophie Zinn-Justin[b], Laure Guilhaudis[a], Isabelle Milazzo[a], Daniel Davoust[a], Bernard Gilquin[b] and Joël Couprie[b,*]

[a] *Equipe de Chimie Organique et Biologie Structurale, IFRMP 23, CNRS UMR 6014, Université de Rouen*

[b] *Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.*

[*] To whom correspondence should be addressed: joel.couprie@cea.fr

Keywords: NMR assignments, KIN17, DNA-binding, RNA-binding, nuclear metabolism

Biological context

KIN17 is a 45 kDa nuclear protein conserved in eukaryotes and initially identified on the basis of its cross-reactivity with antibodies raised against bacterial RecA, a recombination-repair enzyme (Kannouche et al., 2000). In mammals, the KIN17 protein is ubiquitously expressed. It forms intranuclear foci in proliferating cells and is up-regulated after UV or γ irradiation (Biard et al., 2002; Kannouche et al., 1998). The other features of KIN17 are its ability to bind DNA and RNA *in vitro* and *in vivo* (Biard et al., 2002; Pinon-Lataillade et al., 2004), to associate with multiprotein DNA replication complexes (Miccoli et al., 2005), and to complement the functions of the bacterial transcriptional factor H-NS (Timchenko et al., 1996), suggesting a role in nuclear metabolism.

Human KIN17 is a modular protein comprising four motifs: a zinc finger (28-50) at the N-terminus, a core domain homologous to RecA protein (163-201), a nuclear localization signal (240-257), and a KOW motif (335-373) found in several bacterial transcription factors (Kannouche et al., 2000; Ponting et al., 2002). On the basis of sequence alignment and secondary structure prediction, we identified a globular region located between the zinc finger and the core domain. We here report the ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C assignments of the region 51-160 as a preliminary step toward obtaining the atomic structure of this KIN17 domain and elucidating its biological function.

Methods and experiments

The gene encoding the region 51-160 of human KIN17 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into several expression vectors using the Gateway system (Invitrogen). A protein expression screening using different strains and fusion partners was performed (Braud et al., *in press*) and highest levels of expression and solubility were obtained when transforming *E. coli* Rosetta(DE3) strain with plasmid pEXP-TH5 (Invitrogen). This vector encodes a 6xHis tag, the Z-domain from Staphylococcal Protein A (ZZ), a TEV protease (Tobacco Etch Virus) cleavage site, and the KIN17 51-160 domain. Protein expression was induced by the addition of 1 mM of isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) to the bacterial culture at a cell density of 1.2 absorbance units measured at 595 nm. The bacterial culture was further grown for 14 hours at 20°C.

The fusion protein was purified using IgG Sepharose Fast Flow (Amersham) in order to separate the fusion protein from other bacterial proteins and to remove the $(His)_6$-ZZ tag after an on-column cleavage using recombinant $(His)_6$-TEV protease. A second step of purification was performed using Ni-NTA column (Qiagen) to remove $(His)_6$-TEV protease and residual $(His)_6$-ZZ tag.

Uniformly labelled ^{15}N protein was produced in minimal medium M9 containing 1 $g.L^{-1}$ of $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (Boehringer) as the sole nitrogen source. Uniformly labelled $^{13}C/^{15}N$ protein was produced in a rich medium prepared from uniformly labelled $^{13}C/^{15}N$ *Spirulina maxima* cyanobacteria. NMR samples containing about 0.7 mM protein were prepared in 50 mM phosphate buffer pH 6.0 containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, a protease inhibitor cocktail (SIGMA), 1 mM TCEP, and 1 mM NaN_3 in either 90% H_2O/10% D_2O or in 100% D_2O. 3-(trimethylsilyl)[2,2,3,3-$^2H_4$] propionate (TSP) was added as an internal ^1H chemical shift reference. ^{13}C and ^{15}N chemical shifts were referenced indirectly to TSP, using the absolute frequency ratios (Wishart et al., 1995).

NMR experiments were performed at 303 K on Bruker AVANCE DMX-600 or Varian INOVA-800 spectrometers equipped with triple-resonance (^1H, ^{15}N, ^{13}C) cryoprobes. Spectra used for sequential backbone assignment were as follows: 2D ^{15}N-^1H HSQC, 3D HNCO, 3D HNCA, 3D CBCA(CO)NH, 3D CBCANH, 3D HNHA, 3D (HCA)CO(CAN)NH experiments. Aliphatic and aromatic ^1H and ^{13}C side chain assignments were obtained using 3D HBHA(CO)NH, 3D HCCH-TOCSY, 3D HCCH-COSY, and 3D ^{13}C-HSQC NOESY experiments. All NMR data were processed with NMRPipe software (Delaglio et al., 1995) and analysed with Felix software (Molecular Simulations).

Extent of assignments and data deposition

For cloning strategy reasons, this KIN17 domain contains the region 51-160 of human KIN17 plus an additional glycine residue at the N terminus. Figure 1 shows the ^{15}N-^1H HSQC spectrum of the 111 residues protein numbered from 1 to 111. All the amide ^1H and ^{15}N backbone resonances were assigned except for N-terminal amino acids G1 and Q2, and R53 whose NH is unobservable presumably due to loop mobility or chemical exchange since this residue is located between secondary structure elements.

Compared to the expected number of resonances, nine additional weakened cross-peaks were observed in the ^{15}N-^{1}H HSQC spectrum. However, backbone and side chain assignments, as well as 3D ^{15}N HSQC-NOESY patterns revealed that 6 spin systems split in two (R3, Q4, L5, L6, A8, S9). Those residues are located before the proline P12 and we suppose that the minor form is due to a partial isomerisation of P12. The observation of a characteristic strong NOE between H_δ of P12 and H_α of N11 indicated that the predominant form of this proline is in a *trans* conformation.

Finally, all residues corresponding to the region 51-160 of KIN17 were identified: the backbone assignment is complete for $^{1}H_\alpha$, $^{13}C_\alpha$ and ^{13}CO, and it reaches 98% for $^{1}H_N$ and ^{15}N nuclei. All the aliphatic side chain resonances were assigned and 88% of the aromatic ^{1}H and ^{13}C resonances were identified, including all Tyr and His aromatic rings, 3 Phe out of 6, and 2 Trp out of 3. Assignments of NH_2 side chain resonances of asparagines and glutamines were also completed except for N42. The ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N chemical shifts have been deposited in the BioMagResBank (http://www.bmrb.wisc.edu) under accession number 6938.

Acknowledgement

The Bruker DMX-600 spectrometer was supported by grants of the Conseil Regional de Haute-Normandie (France). We are grateful to Dr Adrien Favier who kindly recorded 3D HSQC NOESY experiments on Varian INOVA-800 spectrometer at I.B.S Jean-Pierre Ebel (Grenoble, France), and to Marie Courçon and Mireille Moutiez for the protein expression screening. We also thank the Centre de Ressources Informatiques de Haute-Normandie (France) for NMR software facilities.

References

Braud, S., Moutiez, M., Belin, P., Abello, N., Drevet, P., Zinn-Justin, S., Courçon, M., Masson, C., Dassa, J., Charbonnier, J.B., Boulain, J.C., Ménez, A., Genet, R., Gondry, M. (2005). *J. Proteome Res.*, In press.

Biard, DS., Miccoli, L., Despras, E., Frobert, Y., Creminon, C. and Angulo, JF. (2002) *J. Biol.Chem.*, **277**(21), 19156-19165.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer J. and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR.*, **6**, 277-293.

Kannouche, P., Mauffrey, P., Pinon-Lataillade, G., Mattei, MG., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L. and Angulo, JF. (2000) *Carcinogenesis*, **21**(9), 1701-1710.

Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Tissier, A., Chevalier-Lagente, O., Sarasin, A., Mezzina, M. and Angulo, JF. (1998) *Carcinogenesis*, **19**(5), 781-789.

Miccoli, , L., Frouin, I., Novac, O., Di Paola, D., Harper, F., Zannis-Hadjopoulos, M., Maga, G., Biard, D.S.F., Angulo, J.F. (2005). *Mol. Cell. Biol.*, **25**(9), 3814-3830.

Pinon-Lataillade, G., Masson, C., Bernardino-Sgherri, J., Henriot, V., Mauffrey, P., Frobert, Y., Araneda, S. and Angulo, JF. (2004) *J. Cell. Sci*., **117**(16), 3691-3702

Ponting, CP. (2002) *Nucleic Acids Res*., **30**(17), 3643-3652.

Timchenko, T., Bailone, A. and Devoret, R. (1996) *EMBO J*., **15**, 3986-3992.

Wishart, DS., Bigam, CG., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, HJ., Oldfield, E., Markley, JL. and Sykes, BD. (1995) *J. Biol. NMR*, **6**, 135-140

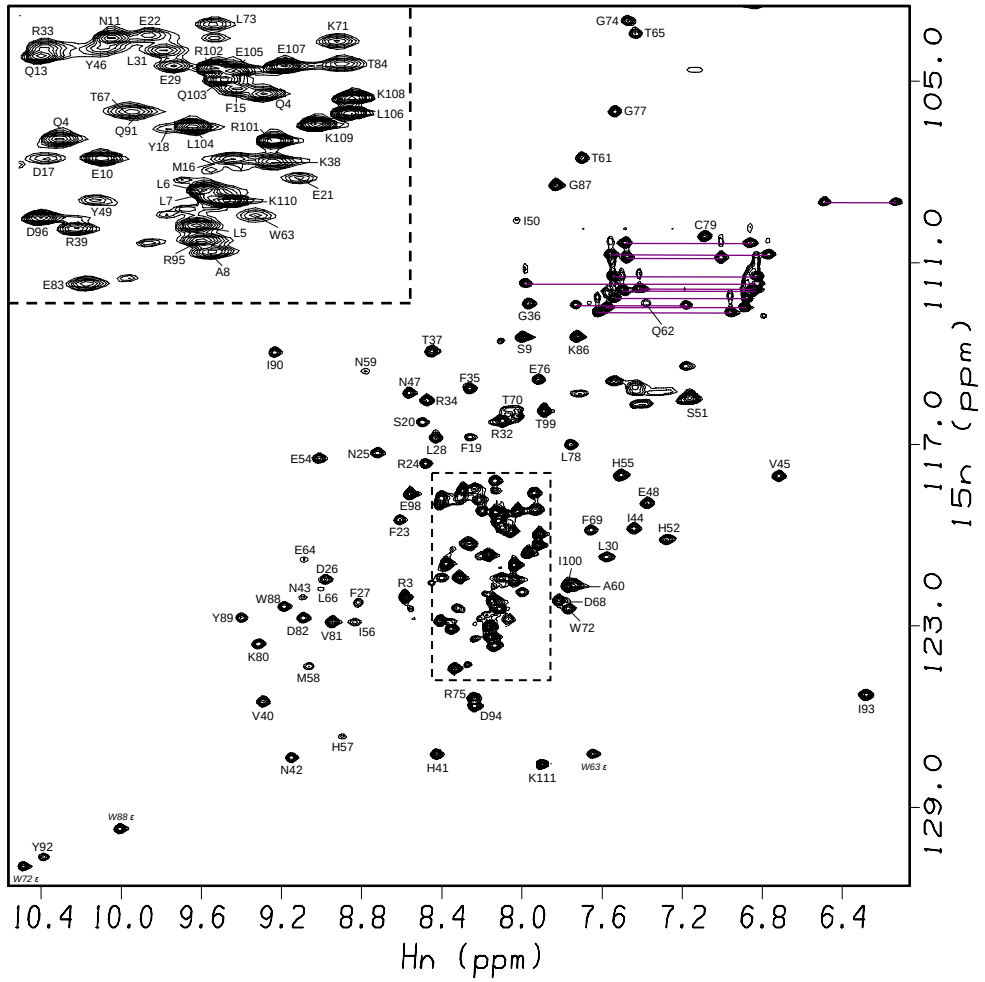


Figure 1: 2D ^{15}N-^{1}H HSQC spectrum of the region 51-160 of human KIN17. The assignments are indicated with the one-letter amino acid code. NH_2 side chain resonances of asparagines and glutamine are connected by purple horizontal lines.

1.2) Détermination de la topologie du domaine K2

La première étape de la caractérisation structurale du domaine K2 a consisté à déterminer les éléments de structure secondaire à partir de paramètres structuraux et dynamiques RMN afin d'établir la topologie de la protéine.

1.2.1) Analyse du nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N

Nous avons dans un premier temps réalisé une expérience de mesure des nOe hétéronucléaires ^{1}H-^{15}N dans le but d'identifier les résidus non structurés des extrémités N- et C-terminales. Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz sur un échantillon uniformément marqué ^{15}N concentré à 0.8 mM.

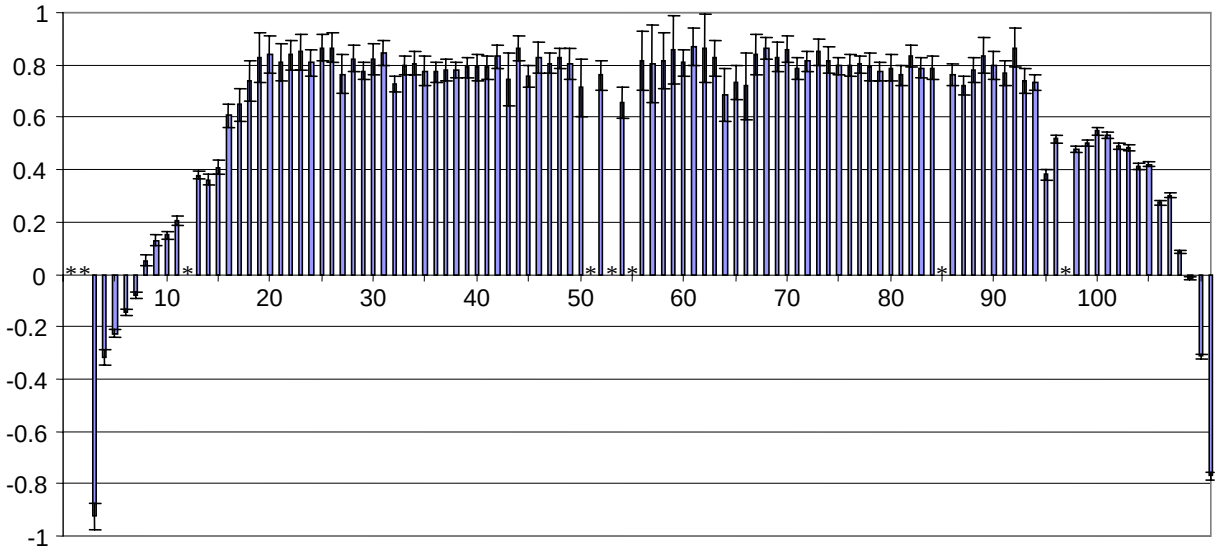


***Figure 4.2** : nOe hétéronucléaires ^{1}H-^{15}N du domaine K2 de la protéine humaine KIN17. Les astérisques correspondent aux résidus dont la valeur n'a pas été déterminée ou aux résidus proline.*

Les faibles valeurs de nOe hétéronucléaire (<0.25) observées au niveau des extrémités N- et C-terminales mettent en évidence que les régions R3-N11 et K108-K111 sont flexibles et déstructurées (Figure 4.2). L'échange rapide du proton amide de Q2 avec l'eau n'ayant pas permis de mesurer sa valeur de nOe ^{1}H-^{15}N, et le résidu 12 étant une proline, il semble raisonnable de conclure que les segments G1-P12 et K108-K111 sont déstructurés.

1.2.2) Analyse des paramètres structuraux classiques

La caractérisation des éléments de structure secondaire a été initiée en calculant les indices de déplacement chimique CSD à partir des valeurs de déplacements chimiques H_α et C_α, et des valeurs de référence correspondantes dans la *BioMagResBank*. La figure 4.3 montre le diagramme des indices $\Delta\delta C_\alpha$ et $\Delta\delta H_\alpha$ du domaine K2. La majorité des résidus présente une valeur positive de $\Delta\delta C_\alpha$ conjuguée à une valeur négative de $\Delta\delta H_\alpha$, ce qui suggère une structuration hélicoïdale importante. Pour être significatives, les valeurs de $\Delta\delta C_\alpha$ et $\Delta\delta H_\alpha$ doivent atteindre respectivement, 1, et 0.1 ppm. Sur la base de ces valeurs seuils, 4 hélices sont clairement identifiables au niveau des régions D17-R33, H41-S51, L66-R75, et P97-E107. A contrario, la région C79-Q91 se caractérise plutôt par des valeurs négatives de $\Delta\delta C_\alpha$ conjuguées à des valeurs positives de $\Delta\delta H_\alpha$, ce qui indique une conformation en feuillet β ou étendue. Cependant, le signe des indices CSD dans cette région est irrégulier, et l'amplitude des index $\Delta\delta C_\alpha$ négatifs est relativement faible.

Afin d'approfondir la caractérisation des structures secondaires, nous avons entrepris une analyse partielle du spectre ^{15}N-NOESY-HSQC enregistré à 600 MHz sur un échantillon uniformément marqué ^{15}N concentré à 0.8 mM. Selon la stratégie définie dans le chapitre 2, nous nous sommes contentés de collecter 3 types de nOe non ambiguës facilement identifiables. Il s'agit des corrélations caractéristiques de type dαN(i, i+1), dαN(i, i+2), et dαN(i, i+3). Nous avons également estimé les constantes de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ à partir des expériences 3D HNHA et 2D HMQC_J enregistrées sur l'échantillon ^{15}N. L'analyse combinée des nOe caractéristiques et des constantes de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ (Figure 4.4) permet de préciser la nature des éléments de structure secondaire mis en évidence précédemment :

L'observation de contacts dαN(i, i+3) consécutifs associés à de faibles intensités de nOe dαN(i, i+1), et à une absence d'effets dαN(i, i+2), caractérise une structuration des 4 régions D17-L31, N42-S51, L66-G77, et P97-Q103 en hélice α. En ce qui concerne l'hélice C-terminale, la forte similarité des valeurs de déplacement chimique H_α dans la région L104-K110 ne permet pas de relever d'effets supplémentaires non ambiguës au delà du résidu 103. Les valeurs consécutives de $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ inférieures à 5.5 Hz au niveau des régions F15-R33, H41-Y49, D68-R75, et D96-E105 confirment l'existence de ces 4 hélices. Notons toutefois que 3 des valeurs de constante $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ du segment H41-Y49 (I44, V45, et E48) se situent entre 5.5 et 6 Hz.

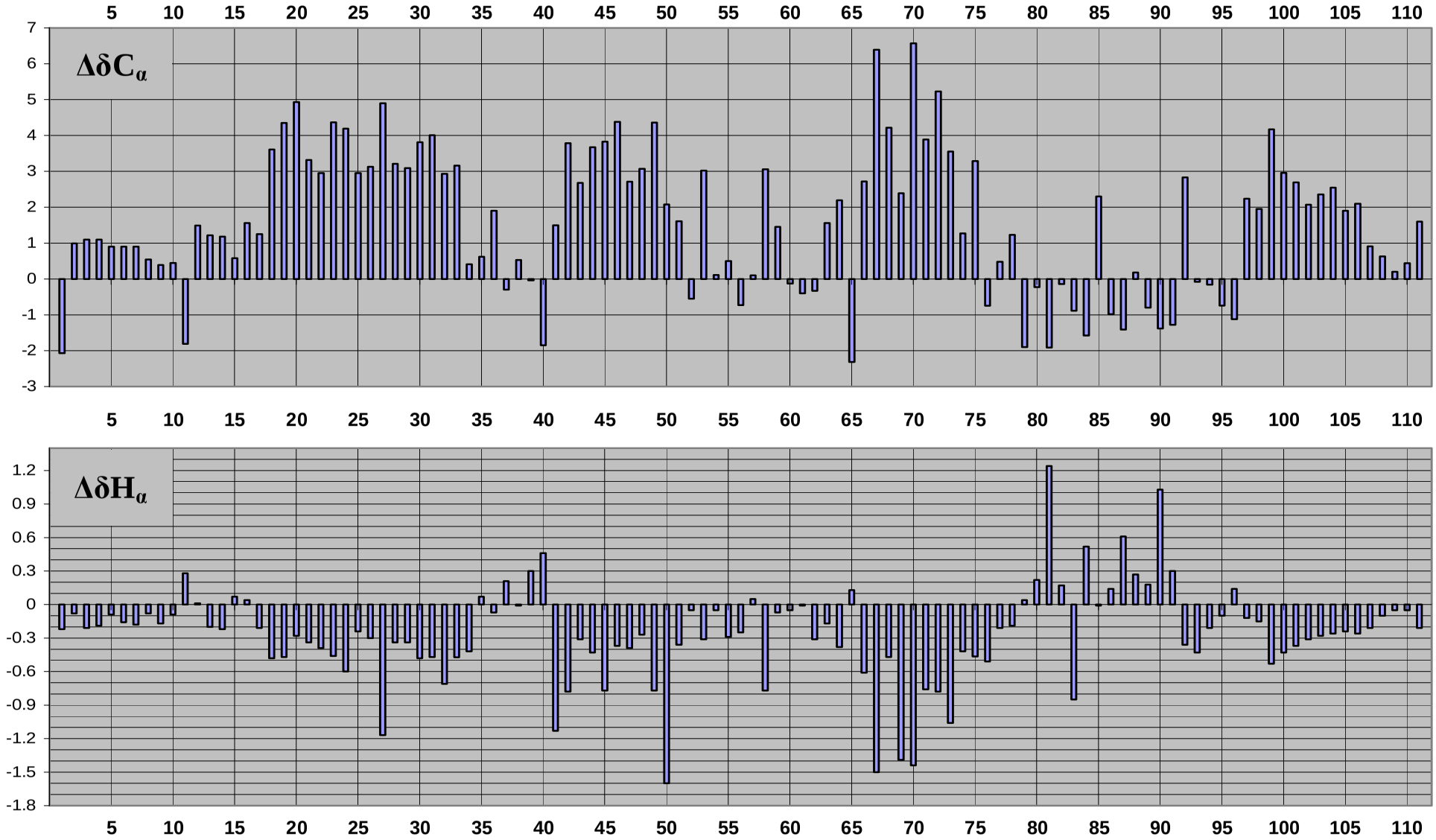


Figure 4.3 *: Déplacements chimiques secondaires du domaine K2 de la protéine KIN17 humaine calculés à partir de valeurs de référence de la BioMagResBank (http://www.bmrb.wisc.edu/)*

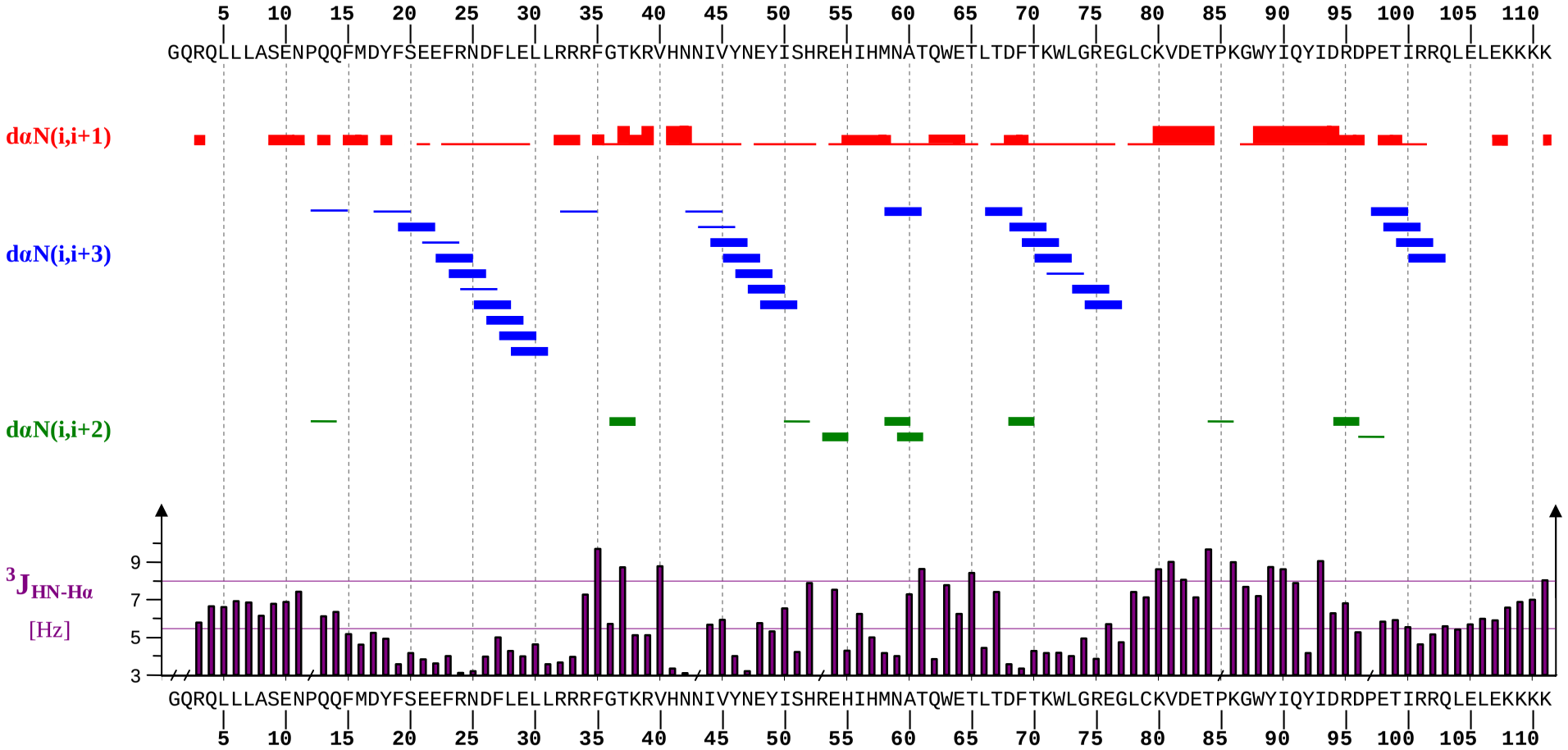


Figure 4.4 *: Diagramme récapitulatif de 3 effets Overhauser caractéristiques et des constantes de couplage $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ du domaine K2 de KIN17 humaine. L'épaisseur des traits rouges, bleus, et verts indique respectivement, l'intensité des effets à courte et moyenne distance de type dαN(i, i+1), dαN(i, i+3), et dαN(i, i+2) relevés sur le spectre NOESY-HSQC édité ^{15}N. Les lignes horizontales violettes représentent les valeurs seuil de constante de couplage $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ dans les structures secondaires (<5.5 Hz dans l'hélice α ou 3_{10}, >8 Hz dans le feuillet β). Les traits inclinés correspondent aux résidus dont la valeur de $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ n'a pas été déterminée.*

De manière générale, peu de connexions non ambiguës de type dαN(i, i+2) ont été relevées sur le spectre ^{15}N-NOESY-HSQC. Ces effets sont caractéristiques d'une structuration en hélice 3_{10} ou en coude. L'observation de 2 contacts consécutifs de moyenne intensité de type dαN(i, i+2) et d'un effet dαN(i, i+3) au niveau du segment M58-T61 suggère l'existence potentielle d'un tour d'hélice 3_{10}. Cette hypothèse est consolidée par une faible valeur de $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ (<4.5 Hz), et une valeur significative d'indice $\Delta\delta C_\alpha$ des résidus M58 et N59.

La succession d'effets dαN(i, i+1) de forte intensité associés à une absence quasi-totale d'effets dαN(i, i+3) et dαN(i, i+2) au niveau des régions C79-T84 et W88-D94 confirme la présence d'une zone étendue ou structurée en feuillet β dans la région C79-D94. Les fortes valeurs de constante $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ (>8 Hz) au niveau des résidus K80 à D82, T84, K86, Y89 à Q91, et I93 sont en accord avec ce résultat. D'autre part, le diagramme de la Figure 4.4 fait apparaître 4 fortes intensités dαN(i, i+1), un contact dαN(i, i+2), et 3 valeurs de $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$ supérieures à 8 Hz dans la région T35-N42. Ce profil laisse présager la présence d'un ou plusieurs types conformationnels : coude(s), brin β, ou zone étendue. Aussi, il est difficile de caractériser la structure secondaire de cette zone à partir de ces seules données. Les valeurs significatives d'indice $\Delta\delta H_\alpha$ des résidus T37, R39 et V40 (> +0.2 ppm), et la forte valeur de $\Delta\delta C_\alpha$ du résidu V40 (-1.9 ppm) supportent l'hypothèse de l'existence d'un brin β.

1.2.3) Prédiction des angles ϕ et ψ

Le déplacement chimique des noyaux $^{13}C_\alpha$, $^{13}C_\beta$, ^{13}CO, $^{1}H_\alpha$, et $^{15}N_H$ a été utilisé pour estimer les angles dièdres ϕ et ψ caractéristiques des structures secondaires à l'aide du logiciel TALOS. Dans le cas du domaine K2, 68 des 111 valeurs de couple d'angles ϕ et ψ prédites sont considérées comme fiables. Une grande partie de ces valeurs se situe dans la région spécifique aux hélices α du diagramme de Ramachandran, ce qui confirme une structuration hélicoïdale importante. Sur la base de cette prédiction, 4 hélices α sont identifiables au niveau des régions Y18-R34, N42-I50, T67-R75, et E98-L106. Le programme TALOS prédit également la présence de 3 zones étendues ou structurées en brin β au niveau des segments R39-H41, C79-T84, et W88-Y92. De plus, les valeurs d'angles dièdres prédites pour les résidus M58 et N59 sont caractéristiques d'une hélice 3_{10}, ce qui conforte l'hypothèse de la présence d'un tel motif dans cette région du domaine K2. Par ailleurs, les valeurs particulières d'angles ϕ et ψ créditées aux résidus isolés R53 et E54, ainsi qu'aux résidus E76, P85, et K86, suggèrent une implication de ces acides aminés dans un coude régulier.

1.2.4) Identification et organisation des brins β

Afin de préciser la structure secondaire des régions qui présentent une préférence conformationnelle étendue, nous avons entrepris une recherche d'effets spécifiques à longue distance de type H_N-H_N, H_N-H_α, et H_α-H_α sur les spectres ^{15}N- et ^{13}C-NOESY-HSQC. L'analyse de ces effets met en évidence l'existence d'un feuillet β anti-parallèle triple brin dans lequel le brin central G87-I93 est encadré par un second de même taille qui le précède dans la séquence (L78-T84), et par un troisième beaucoup plus court (V40-N42) (Figure 4.5). Les résultats de l'expérience de spectroscopie d'échange ^{1}H ↔ ^{2}D menée sur un échantillon ^{15}N / ^{13}C solubilisé dans 100% D_2O sont en accord avec une telle organisation : le ralentissement constaté de la vitesse d'échange des protons amides T84, Y89, I90, Q91, et I93 suggère une implication de ces protons dans une liaison hydrogène, et confirme leur appartenance à une structure secondaire régulière (Figure 4.5).

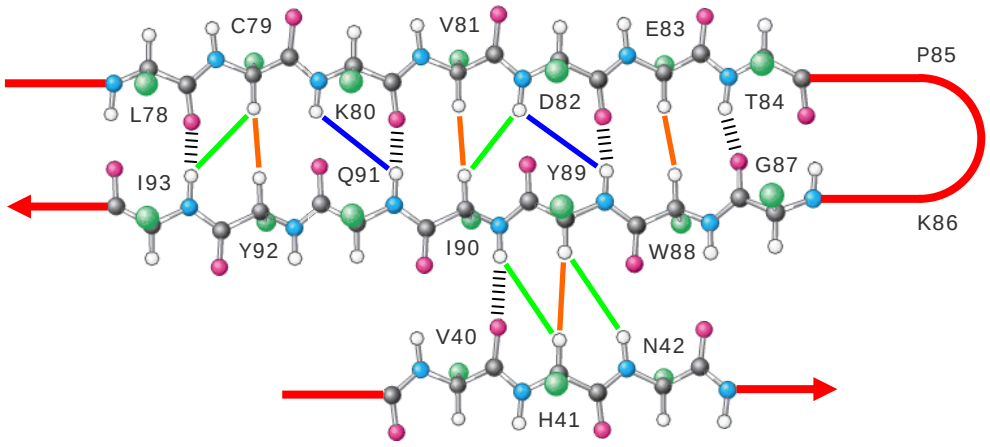


Figure 4.5 *: Reconstitution de la topologie du feuillet β anti-parallèle du domaine K2 à partir de l'analyse des nOe longue distance H_α-H_α (traits oranges), H_N-H_N (traits bleus), et H_N-H_α (traits verts). Les lignes hachurées correspondent aux liaisons hydrogène déduites de l'analyse des vitesses d'échange des protons amides et des nOe inter-brins.*

1.2.5) Conclusions : structure secondaire du domaine K2

La prise en compte de l'ensemble des informations structurales obtenues à partir des indices CSD, des constantes $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$, des nOe ^{1}H caractéristiques, des nOe hétéronucléaires, de l'échange des protons amides, et de la prédiction des angles ϕ et ψ, permet finalement de caractériser la topologie des structures secondaires (Figure 4.6). Le consensus réalisé à partir de toutes ces informations met clairement en évidence l'existence de 4 hélices α (H1 à H4) et de 3 brins β (S1 à S3). De plus, comme nous l'avons suggéré dans les paragraphes précédents,

plusieurs éléments sont en faveur de l'existence d'un tour d'hélice 3_{10} dans la région M58-T61. A ce stade de l'étude structurale, la présence de ce motif demeure une simple hypothèse qui doit être confirmée par le calcul de la structure par modélisation moléculaire. Il en est de même pour l'orientation et la délimitation précise des structures secondaires, uniquement accessibles par la détermination de la structure tridimensionnelle à l'échelle atomique.

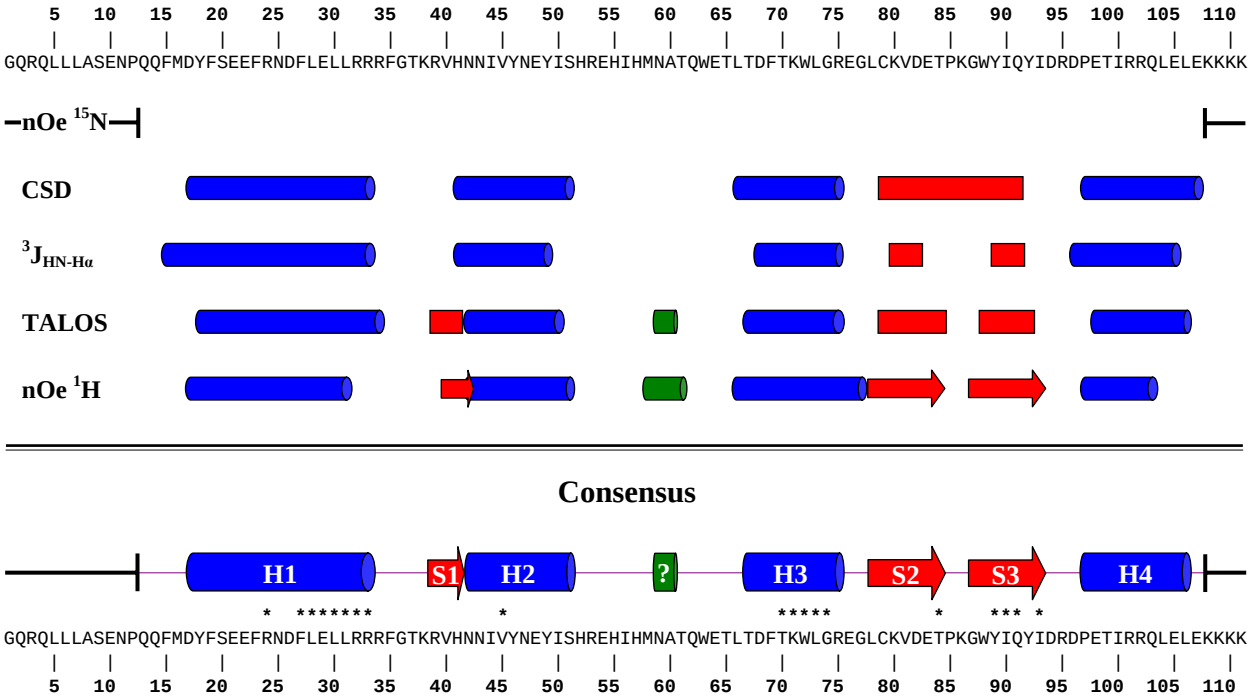


Figure 4.6 *: Caractérisation de la structure secondaire du domaine K2 par RMN. Un cylindre bleu correspond à une hélice α, un cylindre vert à une hélice 3_{10}, une flèche rouge à un brin β, et un rectangle rouge à une région étendue ou à un brin β. Les traits noirs prononcés indiquent l'étendue des extrémités flexibles et déstructurées et une étoile correspond à un résidu dont la vitesse d'échange de proton amide est ralentie.*

1.3) Calcul de la structure par Modélisation Moléculaire sous contraintes RMN

La structure du domaine K2 de la protéine KIN17 humaine a été calculée avec le logiciel CNS couplé au programme d'attribution automatique des nOe du Laboratoire de Structure des Protéines. Les méthodes et principes sur lesquels reposent ces logiciels sont exposés dans le chapitre 3 de cette seconde partie.

1.3.1) Préparation des contraintes expérimentales RMN

Les spectres NOESY-HSQC utilisés pour déduire les contraintes de distance ont été enregistrés à l'IBS de Grenoble sur un spectromètre 800 MHz équipé d'une cryosonde triple résonance, avec un temps de mélange de 80 ms pour l'expérience éditée ^{15}N, et de 100 ms pour l'expérience éditée ^{13}C. Les pics de corrélation dipolaire ont été sélectionnés, intégrés, puis collectés à l'aide du logiciel *Felix* (Accelrys). Aucun de ces pics n'a été attribué manuellement à l'exception des 9 effets à longue distance de type H_N-H_N, H_N-H_α, et H_α-H_α qui définissent la topologie du feuillet β de K2.

Les 136 valeurs d'angles ϕ et ψ prédites par le logiciel TALOS ont été utilisées pour former les contraintes d'angle dièdre. Les intervalles de valeurs permises associés à ces angles ont été établis en multipliant l'écart type estimé par TALOS pour chaque prédiction par un coefficient d'une valeur de 1.5. Trois contraintes supplémentaires d'angle ϕ ont été ajoutées dans les protocoles de calcul sur la base d'une valeur de constante de couplage $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ caractéristique des résidus F35, H55, et D96. Les intervalles de valeurs permises correspondants ont été déduits de la courbe de Karplus lissée en utilisant les coefficients de Pardi (Pardi et al., 1984).

Enfin, l'expérience de spectroscopie d'échange $^1H \leftrightarrow {}^2D$ et la caractérisation des éléments de structure secondaire ont permis de mettre en évidence l'existence de 18 liaisons hydrogène principalement localisées dans les hélices α (Figure 4.6). Ces informations ont été interprétées en contrainte de distance ($d_{HN\text{-}O}$ ~ 2.3 Å et $d_{N\text{-}O}$ ~ 3.3 Å) et introduites dans les protocoles de calcul.

1.3.2) Bilan de l'attribution automatique des pics nOe

Le calcul de la structure du domaine K2 a nécessité la répétition de 21 processus itératifs de 22 cycles où chaque itération a fait l'objet d'une attribution des pics nOe et d'un calcul de 200 structures. L'analyse conjointe des violations de distance et d'angles dièdres, ainsi que de la liste des pics nOe non attribués en fin de chaque processus a permis d'identifier, puis de corriger, les informations erronées. Ainsi, les pics qui correspondent à du bruit spectral ont été progressivement supprimés, et les erreurs d'attribution des fréquences de résonance de la protéine ont été rectifiées. Le jeu final de données expérimentales RMN retenu a conduit à l'attribution de 3347 pics nOe par le programme d'attribution automatique. Moins de 2% des pics de ce jeu final n'ont pas été attribués. Après application des différents filtres et suppression des nOe redondants, une liste de 2716 contraintes de distance contenant, 2192 contraintes non ambiguës, et 524 contraintes ambiguës, a finalement été établie, ce qui représente une vingtaine de contraintes de distance par résidu (Tableau 4.1).

Attribution automatique des pics nOe :	
Nombre de pics du jeu final	3413
Nombre de pics attribués	3347
Nombre de pics non attribués	66
Nombre de contraintes expérimentales :	
Contraintes de distance	2743
Non ambiguës	2219
nOe attribués par le programme	2192
nOe de topologie attribués manuellement	9
Distances déduites de l'échange $^{1}H \leftrightarrow {}^{2}D$	18
Ambiguës (générés par le programme)	524
Contraintes dihédrales ϕ et ψ	139
Prédictions TALOS	136
Angles ϕ déduits de la constante de couplage $^{3}J_{HN\text{-}H\alpha}$	3

Tableau 4.1 *: Contraintes expérimentales utilisées pour le calcul final de la structure.*

1.3.3) Evaluation de la qualité des structures calculées

Les 20 structures de plus basse énergie de l'itération finale ont été sélectionnées et soumises à un protocole de raffinement dans le champ de force CHARMM22. A l'issue de cette dernière étape, les 12 meilleurs modèles ont été retenus et constituent l'ensemble final de la structure du domaine K2 résolue par modélisation moléculaire sous contraintes RMN. Le tableau 4.2 présente un résumé des statistiques structurales de ces 12 meilleures structures.

Dans l'ensemble, les faibles valeurs des différents termes de la fonction d'énergie suggèrent que les modèles générés sont de bonne qualité. Aucune violation de distance supérieure à 0.5 Å ou d'angle dièdre ϕ et ψ supérieure à 10° n'est observée, ce qui indique une bonne prise en compte des contraintes expérimentales RMN. Ces structures présentent également une bonne géométrie covalente avec de faibles valeurs de déviation par rapport à la géométrie idéale des longueurs de liaisons, des angles de valence, et des angles dièdres impropres.

Contraintes expérimentales :	
Contraintes de distance	2743
Contraintes dihédrales ϕ et ψ	139
Nombre de violations de distance > 0.5 Å	0
Nombre de violations d'angle ϕ et ψ > 10°	0
Energies (kcal/mol) :	
Liaisons	141 ± 6
Angles	599 ± 15
Impropres	20 ± 2
Van der Waals	146 ± 15
Electrostatique	-671 ± 25
nOe	143 ± 10
Dièdres ϕ et ψ	5.6 ± 0.7
Totale	258 ± 5
Déviations à la géométrie idéale :	
Liaisons (Å)	0.0159
Angles (°)	3.35
Impropres (°)	2.74
nOe (Å)	0.032
Analyse du diagramme de Ramachandran*	
Résidus dans les régions favorables	88.6 %
Résidus dans les régions additionnelles permises	10.1 %
Résidus dans les régions généreusement permises	0.8 %
Résidus dans les régions interdites	0.5 %

** réalisée avec le logiciel Procheck dans la région 13-107*

***Tableau 4.2** : Statistiques structurales de l'ensemble des 12 structures finales de K2.*

La répartition des angles ϕ et ψ sur le diagramme de Ramachandran confirme la qualité des structures. Plus de 99 % des valeurs de ces angles occupent les régions énergétiquement favorables ou permises, et seules 0.5 % sont situées dans les régions interdites. La distribution des angles dièdres ϕ et ψ pour chaque résidu est présentée en Figure 4.8A. Les éléments de structure secondaire également reportés ont été définis à partir de ces valeurs d'angle.

La convergence des modèles générés constitue également un critère de qualité. La superposition des 12 structures finales sur les atomes de la chaîne principale (N, CO, et C_α) montre la bonne définition du squelette peptidique entre les résidus F15 et L106 (Figure 4.7). Pour les acides aminés situés entre ces 2 résidus, la moyenne des écarts quadratiques « rmsd » calculée sur le squelette de l'ensemble final par rapport à une structure moyenne est de 0.43 Å. Cette faible valeur indique une bonne convergence des modèles vers une structure tridimensionnelle unique entre les résidus F15 et L106.

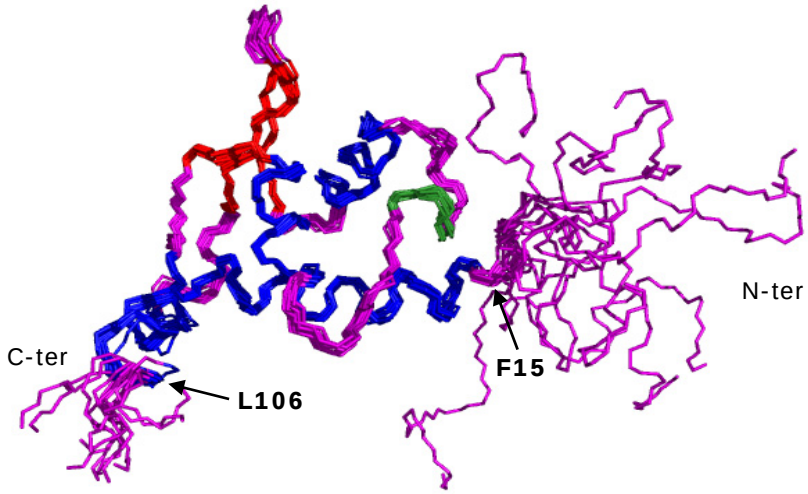


***Figure 4.7** : Superposition des 12 structures finales du domaine K2 sur les atomes du squelette (N, CO, et Cα) entre les résidus Q13 et E107. Les hélices α sont représentées en bleu, les feuillets β en rouge, l'hélice 3_{10} en vert pastel, et les régions déstructurées en violet.*

La Figure 4.8B montre les valeurs des écarts rmsd calculés sur le squelette et les atomes lourds de chaîne latérale pour chaque résidu. On constate une dispersion des angles ϕ et ψ associée à de fortes valeurs de rmsd au niveau des extrémités N- et C-terminales G1-P12 et K109-K111. Ceci est en accord avec l'analyse du nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (cf. § 1.2.1) qui indique que ces 2 extrémités sont flexibles et déstructurées. A contrario, la bonne convergence des angles dièdres et les faibles valeurs de rmsd sur les atomes du squelette (< 1 Å) des résidus F15 à L106 suggèrent que ces acides aminés constituent le corps globulaire de la protéine. Ainsi, on observe une bonne définition du squelette peptidique dans les régions structurées en hélice et feuillet, mais également dans les boucles. D'autre part, la majorité des valeurs de rmsd calculées sur les atomes lourds de chaîne latérale sont inférieures à 1.5 Å, ce qui démontre une orientation privilégiée de la plupart des chaînes latérales dans la région F15-L106. La moyenne des écarts rmsd sur les atomes lourds entre les résidus F15 et L106 est de 1.03 Å.

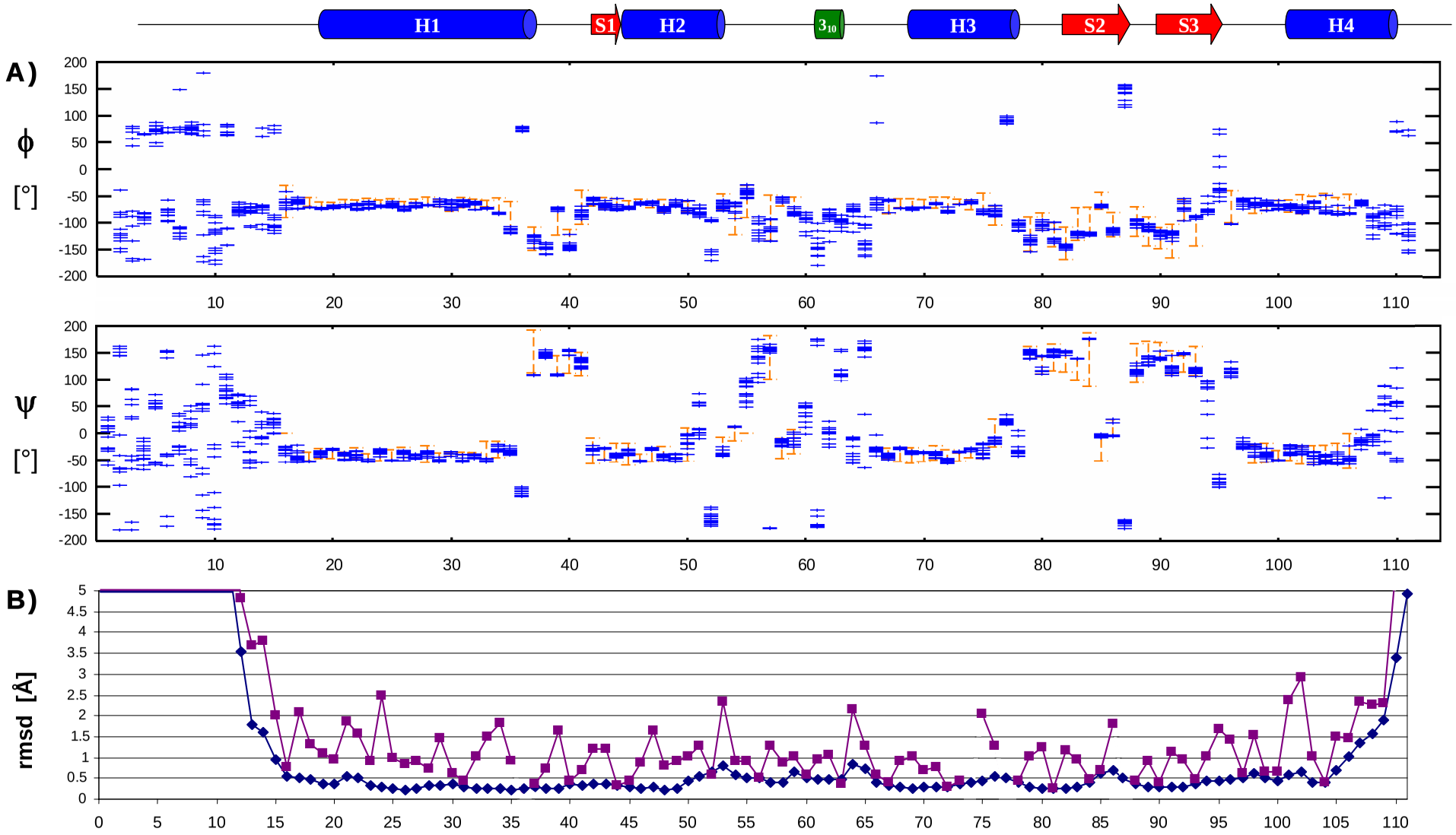


Figure 4.8 *: Analyse de la convergence des 12 structures finales sélectionnées. A) Distribution des angles dièdres ϕ et ψ pour chaque acide aminé de ces 12 structures. Les traits oranges correspondent aux intervalles de contrainte d'angle définis dans CNS. B) Déviation quadratique moyenne rmsd pour chaque résidu calculée par rapport à la structure moyenne des 12 modèles sélectionnés (en bleu : superposition sur les atomes N, C_α, et CO du squelette ; en violet : sur tous les atomes lourds de chaîne latérale). Les résidus 36, 74, 77, et 87 sont des glycines.*

2) Description de la structure tridimensionnelle du domaine K2

Le bilan de l'analyse des écarts rmsd et des angles dièdres ϕ et ψ montre une convergence des structures finales vers une structure unique dans la région F15 à L106. Par conséquent, nous avons choisi le modèle raffiné de plus basse énergie (E_T = 196.1 kcal.mol^{-1}) comme le plus représentatif de la structure du domaine K2 de la protéine KIN17 humaine.

2.1) Structure secondaire

Le calcul de la structure du domaine K2 par modélisation moléculaire confirme l'existence de l'ensemble des éléments de structure secondaire mis en évidence précédemment par l'analyse des paramètres RMN. K2 adopte un repliement de type α/β constitué de 4 hélices α (H1: F15-R34, H2: N42-I50, H3: L66-R75, H4: E98-E107), de 3 brins β (S1: R39-H41, S2: C79-T84, S3: G87-Y92), et d'un tour d'hélice 3_{10} (H2.5: M58-A60) situé dans une large boucle entre H2 et H3 (Figure 4.9). La topologie du domaine est de la forme H1-S1-H2-H2.5-H3-S2-S3-H4. La partie N-terminale de K2 est donc principalement hélicoïdale alors que la région C-terminale est dominée par 2 brins β anti-parallèles (S2 et S3) reliés par un coude β de type I (T84-G87).

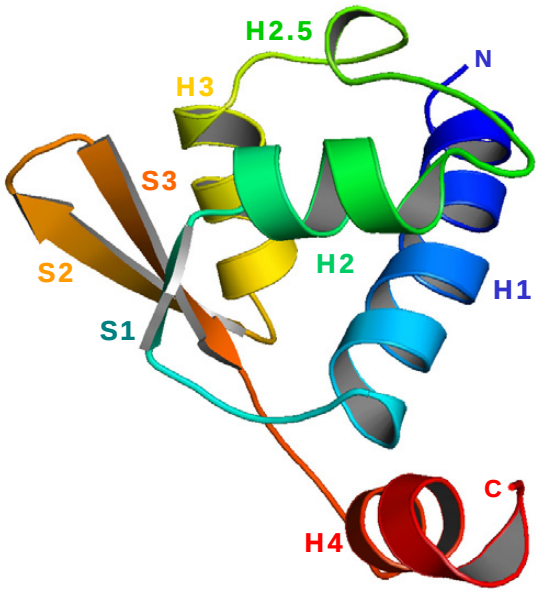


***Figure 4.9** : Structure tridimensionnelle du domaine K2 de la protéine humaine KIN17 résolue par RMN et Modélisation Moléculaire. Les hélices sont représentées par des rubans et les brins β par des flèches.*

2.2) Les éléments qui composent le cœur hydrophobe

Les hélices H1, H2, et H3 constituent la zone centrale de la protéine. Elles forment un « tonnelet orthogonal » compact où la valeur d'angle entre chacune d'entre elles est proche de 90°. Avec une longueur de 20 résidus, l'hélice H1 est l'élément de structure secondaire le plus imposant du domaine K2. Elle contient 5 tours réguliers d'hélice α, soit deux fois plus que les hélices H2 et H3 (respectivement 9 et 10 résidus, soit environ 2.5 tours). Chacune de ces hélices est stabilisée par un réseau régulier de liaisons hydrogène qui se forment entre l'oxygène du CO d'un résidu *i* et le proton amide d'un résidu *i+4*. Ces 3 hélices canoniques présentent un caractère amphipatique : elles projettent la quasi-totalité de leurs chaînes latérales polaires vers l'extérieur du domaine et la majorité de leurs chaînes latérales hydrophobes sont orientées vers l'intérieur et définissent ainsi une poche hydrophobe qui stabilise le tonnelet. Cette poche dense et riche en acides aminés aromatiques est composé des résidus M16, F23, F27, L28, L30, et L31 de H1, des résidus V45, Y46, et Y49 de H2, et des résidus L66, F69, W72, et L73 de H3 (Figure 4.10).

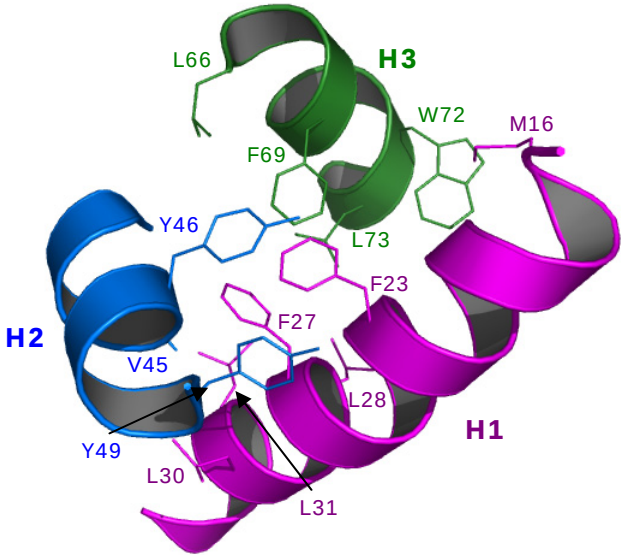


Figure 4.10 *: Description de la poche hydrophobe du tonnelet orthogonal du domaine K2. Les chaînes latérales des résidus qui forment cette poche sont représentées par des sticks violets pour l'hélice H1, bleus pour l'hélice H2, et verts pour l'hélice H3.*

Les 3 brins S1, S2, et S3 forment un feuillet β anti-parallèle à la périphérie du tonnelet orthogonal dans lequel le brin central S3 est stabilisé par 8 liaisons hydrogène régulières de type CO_i – HN_j. Le brin S1 qui ne compte que 3 résidus est principalement maintenu au feuillet β via le résidu V40 qui forme 2 liaisons hydrogène et plusieurs contacts hydrophobes

avec l'isoleucine 90 de S3. Le brin S2 est relié à l'hélice H3 par un coude β de type I entre les résidus G74 et G77. L'analyse de cette région du domaine fait également apparaître une seconde interface d'interactions hydrophobes entre les brins S2 et S3, et les hélices du tonnelet. Cette interface est principalement constituée des résidus F27, L28 et L31 de H1, et des résidus L66, T70, L73, et G74 de H3 qui établissent des contacts avec la face hydrophobe du feuillet β (C79, et V81 de S2, et W88, I90, et Y92 de S3) (Figure 4.11).

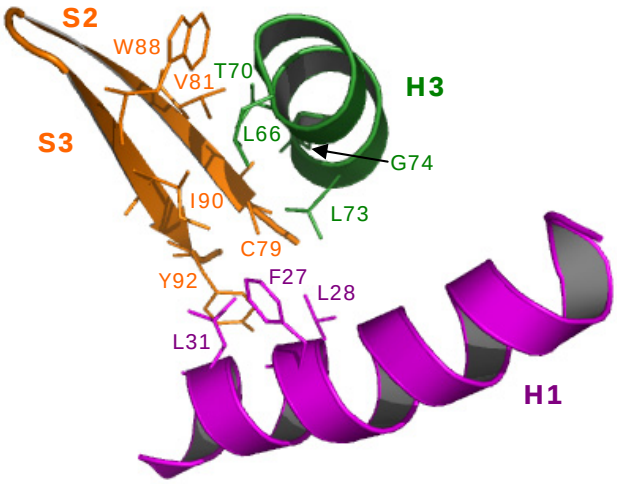


Figure 4.11 *: Description de la seconde interface hydrophobe du domaine K2. Les chaînes latérales des résidus qui forment cette interface sont représentées par des sticks violets pour l'hélice H1, verts pour l'hélice H3, et oranges pour les brins S2 et S3.*

Les valeurs de nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N obtenues au niveau des brins β et des hélices du tonnelet sont pour la plupart des résidus proches de 0.8 (Figure 4.2 du paragraphe 1.2.1). Cet ordre de grandeur montre que le feuillet β et le tonnelet orthogonal constituent un ensemble rigide et stable au sein du domaine K2.

2.3) La boucle entre les hélices H2 et H3

A l'opposé du feuillet β anti-parallèle, le domaine K2 présente une large boucle de 15 acides aminés (S51-T65) située entre les hélices H2 et H3. Cette région peu encombrée est très exposée au solvant, ce qui explique probablement la faible intensité des pics de corrélation ^{1}H-^{15}N des résidus I56, H57, M58, N59, et E64 due à un échange rapide de leur proton amide avec l'eau. Aussi, le proton amide du résidu R53, dont le pic de corrélation est absent sur l'HSQC ^{15}N-^{1}H, est orienté vers l'extérieur de la protéine et se situe dans une zone très fortement exposée. La boucle S51-T65 n'est pas dénuée de structure secondaire. Elle comporte en effet un tour d'hélice 3_{10} canonique de 3 résidus (H2.5) stabilisée par une liaison

hydrogène entre le proton amide de A60 et l'oxygène du carbonyle de H57. La thréonine T61 joue un rôle majeur dans le maintien de cette hélice via le groupement $O_\gamma H$ de sa chaîne latérale qui forme 2 liaisons hydrogène avec le proton H_N de W63 et l'oxygène du CO de M58 (Figure 4.12). L'existence de ce réseau de liaisons hydrogène est en accord avec les résultats de l'étude par RMN où le proton du groupement $O_\gamma H$ de T61 est observable sur le spectre ^{15}N-NOESY-HSQC à un déplacement chimique caractéristique de 5.6 ppm. Les chaînes latérales hydrophobes des résidus I56, M58, et W63 sont orientées vers l'intérieur de la protéine et établissent des contacts avec plusieurs acides aminés du cœur hydrophobe (F23, L66, et F69). Ces 3 résidus contribuent ainsi au positionnement de l'hélice 3_{10} H2.5 à proximité du tonnelet orthogonal.

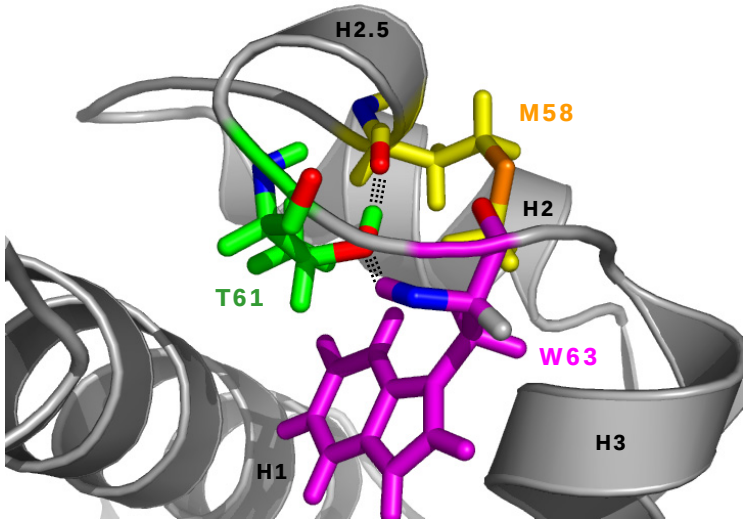


Figure 4.12 *: Rôle de la thréonine T61 dans la stabilisation de l'hélice 3_{10} H2.5. Les atomes et liaisons des résidus M58, T61, et W63 sont respectivement représentés par des sticks jaunes, verts, et roses. Les hétéroatomes O, N, et S sont différenciés et sont respectivement représentés en rouge, bleu, et orange. Les liaisons hydrogène apparaissent en pointillés.*

L'analyse de la structure tridimensionnelle de K2 par l'algorithme *Stride* (Frishman & Argos, 1995) met également en évidence la présence de 2 coudes β de type IV et VIII (respectivement I50-R53 et W63-L66) au niveau des extrémités de la boucle S51-T65. Ces 2 coudes ne présentent pas de liaison hydrogène de type CO-H_N entre le résidu *i* et le résidu *i+3*, ce qui est fréquemment observé dans ces types de coude non classiques (Hutchinson & Thornton, 1994). Il apparaît cependant 2 liaisons hydrogène dans la région Y49-H55 qui semblent stabiliser le motif I50-R53. La première implique l'oxygène du CO de E54 et le proton du groupement OH de chaîne latérale de Y49, et la seconde relie l'oxygène du CO de R53 au proton amide de H55.

Le bilan de l'analyse des structures secondaires de la région S51-T65 fait apparaître un bon niveau de structuration de cette boucle avec la présence d'un coude de type IV entre I50 et R53, d'une hélice 3_{10} entre M58 et T60, et d'un coude de type VIII entre W63 et L66. De plus, le nOe homonucléaire ^{1}H correspondant à une moyenne de l'espace conformationnel en solution, les nombreux effets observés entre les résidus I56, M58, T61, et W63 et plusieurs résidus participant au cœur hydrophobe de la protéine suggèrent une faible flexibilité de la boucle S51-T65. Ainsi, dans le cas de l'isoleucine I56 située entre le coude I50-R53 et l'hélice 3_{10}, près d'une quinzaine de nOe de moyenne intensité témoignent de la proximité des protons de sa chaîne latérale avec les protons du résidu F23 impliqué dans la poche hydrophobe du domaine K2. De manière intéressante, les valeurs de nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N relevées dans la région S51-T65 sont globalement comprises entre 0.7 et 0.85. Ces valeurs caractéristiques de régions rigides sont tout à fait comparables à celles obtenues dans les hélices du tonnelet orthogonal et dans les brins β. Ces résultats indiquent donc que la région S51-T65 incorpore le corps rigide de la protéine.

2.4) L'hélice C-terminale H4

L'hélice H4 C-terminale s'étend du résidu E98 à E107. Elle est constituée de 9 résidus, soit environ 2.5 tours d'hélice α régulière, et présente un réseau régulier de liaisons hydrogène qui contribuent à sa stabilité. Dans la structure de K2, l'hélice H4 se positionne à la périphérie du domaine au niveau de l'extrémité C-terminale de l'hélice H1 et de manière quasi perpendiculaire à H1. L'interface d'interactions entre H4 et le tonnelet orthogonal est constituée des résidus I100, Q103, et L104 de H4, des résidus R32 et R33 de H1, et du résidu G36 de la boucle entre H1 et S1 (Figure 4.13). Cette interface exclusivement hydrophobe apparaît comme relativement fragile en raison du faible nombre de contacts observés entre ces acides aminés. De plus, sur les spectres NOESY-HSQC, seule une dizaine d'effets à longue distance de faible ou moyenne intensité ont été collectés dans la région E98-E107. Avec ce faible nombre de nOe, le programme d'attribution automatique a rencontré quelques difficultés pour attribuer de manière reproductible les nOe longue distance de l'hélice H4 au fil des itérations. Ainsi, ce n'est que lors des derniers processus itératifs que l'hélice H4 dans les modèles générés a adopté une position préférentielle unique autour de la partie C-terminale de H1.

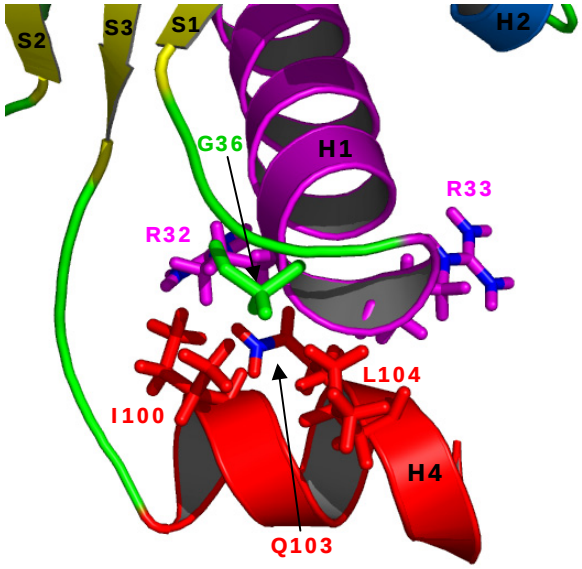


Figure 4.13 *: Description de l'interface d'interactions entre l'hélice H4 et l'hélice H1. Les résidus impliqués sont représentés par des sticks rouges pour l'hélice H4, roses pour l'hélice H1, et verts pour la boucle entre H1 et S1. Les noyaux azote des chaînes latérales sont différenciés et apparaissent en bleu.*

De manière intéressante, les valeurs de nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N relevées dans la région E98-E107 sont globalement comprises entre 0.4 et 0.5 (Figure 4.2 du paragraphe 1.2.1). Ces valeurs mettent en évidence des mouvements rapides (sur une échelle de temps de la picoseconde à la nanoseconde) au niveau de l'hélice H4 et suggèrent un équilibre conformationnel entre une forme structurée et une forme déstructurée autour d'une conformation moyenne. Les valeurs de déplacements chimiques secondaires CSD dans cette région sont globalement inférieures à celles rencontrées au niveau des hélices du tonnelet orthogonal. Ceci confirme l'hypothèse de l'existence d'un échange conformationnel rapide et explique probablement le peu de nOe ^{1}H longue distance observés dans cette région. Par conséquent, l'hélice H4 du domaine K2 présente un caractère flexible et n'intègre pas le corps rigide de la protéine.

CHAPITRE 5

Relations structure-activité : quel est le rôle du domaine K2 de KIN17 humaine ?

Comme je l'ai exposé dans le premier chapitre, la protéine KIN17 présente plusieurs caractéristiques fonctionnelles qui suggèrent son implication dans la régulation et la maintenance du génome. Ses fonctions précises, ses partenaires biologiques, et ses modes d'action sont toujours inconnus en ce début d'année 2006. A présent, la connaissance de la structure tridimensionnelle de la région 51-160 de KIN17 humaine (domaine K2) apporte des informations supplémentaires qui pourraient nous aider à identifier une (ou plusieurs) de ses fonctions biologiques. Ceci nécessite dans un premier temps de répondre à un certain nombre de questions : quelle est la nature du repliement du domaine K2 ? Quels sont les fonctions, les partenaires, et les mécanismes d'action des protéines qui présentent ce type de repliement ? Dans le cas où les bases moléculaires de ces modes d'action seraient connues, le domaine K2 possède-t-il les propriétés structurales nécessaires à la fonction de ces protéines structuralement homologues ? Ce paragraphe a pour objet d'apporter des éléments de réponse à ces questions. La recherche de fonction d'une protéine par une approche purement structurale présente cependant un caractère spéculatif. Aussi, parallèlement à cette étude, une recherche des partenaires biologiques du domaine K2 a été entreprise au Laboratoire de Structure des Protéines par une approche biochimique. Ces résultats seront également présentés dans ce paragraphe dans le but d'approfondir la connaissance des relations structure-activité de la région 51-160 de KIN17 humaine.

1) Le domaine K2 de KIN17 adopte un repliement de type *Winged Helix*

Nous avons recherché les homologues structuraux du domaine K2 à l'aide du programme DALI disponible sur le web (Holm & Sander, 1993) afin de caractériser la nature de son repliement. Le serveur DALI compare la structure tridimensionnelle d'une protéine cible avec chacune des structures enregistrées dans la *Protein Data Bank* (www.rcsb.org), puis établit un score en fonction du degré d'homologie. Dans le cas du domaine K2, des scores significatifs ont été obtenus avec des protéines qui appartiennent à une famille structurale unique : la famille des *Winged Helix*.

Le motif *Winged Helix* est une sous-classe de la superfamille des domaines « hélice-coude-hélice » de liaison à l'ADN (Pour revue : Gajiwala & Burley, 2000). Ce motif, commun aux organismes procaryotes et eucaryotes, a été découvert pour la première fois en

1993 chez le facteur de transcription eucaryote HNF-3 (Clark et al., 1993). La topologie canonique d'un domaine *Winged Helix* est de la forme H1-S1-H2-T-H3-S2-W1-S3-W2 où S1, S2, et S3 forment un feuillet β anti-parallèle situé en périphérie du motif « hélice-coude-hélice » H2-T-H3 (Figure 5.1). W1 et W2 sont deux boucles situées en région C-terminale et dont la disposition autour de l'hélice H3 évoque les ailes d'un papillon, ce qui explique le nom *Winged Helix*.

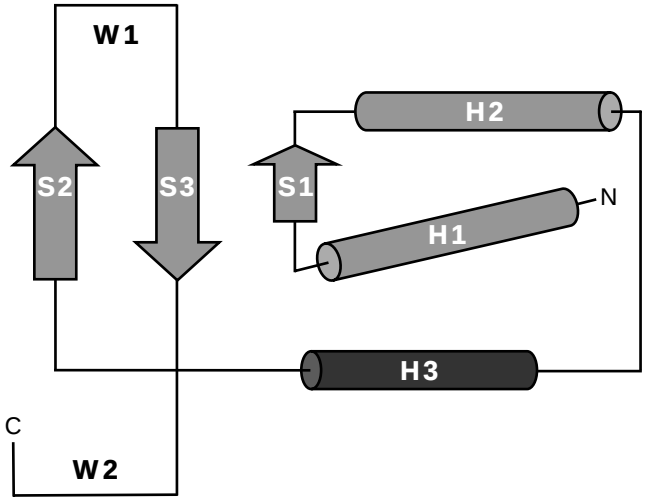


***Figure 5.1** : Description de la topologie d'un motif Winged Helix canonique.*

Au-delà de la présence du feuillet β, la longueur de la région contenant le coude qui relie H2 et H3 différencie les motifs *Winged Helix* des motifs « hélice-coude-hélice » classiques. Ainsi, cette longueur est très variable dans les *Winged Helix*, alors qu'elle se limite généralement au nombre de résidus qui forment le coude T dans les motifs « hélice-coude-hélice » (Brennan & Matthews, 1989). D'autre part, la topologie d'un repliement de type *Winged Helix* se révèle très différente d'une protéine à l'autre. Les éléments N-terminaux H1 et S1 sont fréquemment absents du motif. C'est le cas par exemple des facteurs de transcription TorI (Elantak et al., 2005) et MuR (Wojciak et al., 2001) dont la structure a été résolue par RMN en solution et où l'hélice H1 est manquante. La longueur du brin S1 dépasse rarement 4 acides aminés et dans de nombreux cas, comme dans la structure du domaine C-terminal du facteur de transcription TFIIEβ résolue par RMN (Okuda et al., 2000), seul un résidu hydrophobe de la région reliant H1 et H2 est en contact avec les brins S2 et S3 du feuillet β. La topologie de la région contenant le coude qui relie les hélices H2 et H3 est également variable et peut comporter des éléments de structure secondaire additionnels. C'est notamment le cas des facteurs de transcription AphA (De Silva et al., 2005) et Genesis

(Marsden et al., 1997) qui contiennent une hélice α supplémentaire dans cette région. Sur la base de ces observations, il apparaît que le motif minimum qui caractérise un repliement de type *Winged Helix* est constitué du motif « hélice-coude-hélice » H2-T-H3 et de la région C-terminale contenant les 2 brins β.

Au vu de l'homologie de topologie existante entre le domaine K2 et le motif *Winged Helix* canonique, il apparaît que la région 51-160 de la protéine humaine KIN17 adopte un repliement de type *Winged Helix*. Le domaine K2 contient un tour d'hélice 3_{10} atypique dans la région du coude entre les hélices H2 et H3, ainsi qu'une hélice H4 supplémentaire à la périphérie du motif. De plus, chez K2, la boucle W1 est très courte et se limite aux résidus P85 et K86 qui forment un coude β de type I entre les brins S2 et S3. D'après l'analyse DALI, le domaine structural le plus proche de K2 est le motif *Winged Helix* Zα de la protéine ADAR1 (Schwartz et al., 1999). La figure 5.2 représente dans la même orientation les structures de K2 et de ce domaine, et illustre bien la forte homologie structurale entre ces deux protéines.

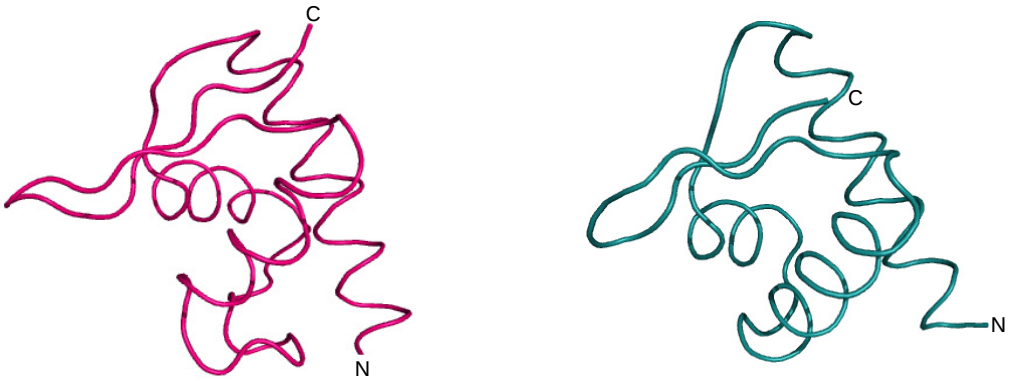


***Figure 5.2** : Représentation du squelette Cα des domaines K2 de KIN17 en rose et Zα de ADAR1 en bleu (PDB : 1QBJ). L'hélice H4 de K2 n'est pas représentée.*

Un alignement de séquence primaire mené sur une quarantaine de séquences de KIN17 appartenant à des espèces eucaryotes met en évidence que 9 des 13 résidus qui forment le cœur hydrophobe de K2 sont conservés (non montré). Cet alignement fait également apparaître que 8 des 15 acides aminés qui appartiennent à la région entre H2 et H3 contenant l'hélice 3_{10} sont très conservés. Par conséquent, il est raisonnable d'affirmer que toutes les protéines KIN17 eucaryotes adoptent en région N-terminale un repliement de type *Winged Helix* similaire à celui du domaine K2 de KIN17 humaine.

Lorsque la caractérisation structurale de la protéine KIN17 a été entreprise, la prédiction bio-informatique menée par le programme *SMART* suggérait la présence d'un domaine FF de liaison aux peptides phosphorylés dans la région 50-150 de KIN17. De manière intéressante, la topologie canonique d'un motif FF de type H1-H2-H2.5-H3 (avec H2.5 une hélice 3_{10}) est très proche de la topologie de la région N-terminale du domaine K2 (H1-S1-H2-H2.5-H3). Ces 2 domaines sont constitués d'un tonnelet orthogonal central formé par les hélices H1, H2, et H3. Nous avons soumis la région N-terminale de K2 au serveur DALI afin de rechercher les domaines qui présentent une homologie structurale avec cette région. Malgré l'absence du double brin β C-terminal, les résultats obtenus montrent que les domaines les plus structuralement proches de cette région de K2 sont tous des motifs *Winged-Helix*. L'analyse DALI ne fait apparaître aucun domaine FF comme homologue structural de cette région N-terminale de K2. La région 51-160 de KIN17 adopte donc un repliement divergent des domaines FF.

2) Le motif Winged Helix de KIN17 est-il capable de lier l'ADN ou l'ARN ?

L'étude préliminaire bio-informatique de la protéine KIN17, qui a été présentée dans le premier chapitre, suggère la présence d'un motif de liaison aux acides nucléiques de type « doigt de zinc » entre les résidus 28 et 50 en amont du domaine K2. Les chercheurs du Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité (LGR) du CEA de Fontenay-aux-Roses ont confirmé l'existence de ce motif en démontrant sa capacité à lier l'ADN, et notamment l'ADN courbe, de manière dépendante aux ions Zn^{2+} (Mazin et al., 1994). Au cours de cette étude, les auteurs ont également montré qu'il existe un second domaine de liaison à l'ADN situé dans la région N-terminale de KIN17 entre les résidus 71 et 281. De manière intéressante, cette région de KIN17 comporte le motif *Winged Helix* du domaine K2 (65 à 157). Récemment, de nouvelles investigations menées par les chercheurs du LGR ont mis en évidence la capacité de KIN17 à lier l'ARN et notamment l'ARN riche en bases guanine et uracile (Pinon-Lataillade et al., 2004). Dans l'optique d'améliorer la connaissance des fonctions précises et des mécanismes d'action de KIN17, il serait intéressant de déterminer quelle est l'implication du motif *Winged Helix* du domaine K2 dans la liaison à l'ADN et l'ARN. Aussi, d'un point de vue structural et fonctionnel, ce motif a-t-il la capacité de lier l'ADN ou l'ARN ?

2.1) Approche structurale

2.1.1) Reconnaissance de l'ADN par les protéines à motif *Winged Helix*

Les principales fonctions des domaines protéiques à motif *Winged Helix* sont la reconnaissance et la fixation de l'ADN. En 1999, près d'une dizaine de structures de complexe *Winged Helix*-ADN résolues par radiocristallographie ou par RMN étaient disponibles dans la *Protein Data Bank*. A partir de ces structures, Gajiwala *et* Burley ont proposé deux modes de reconnaissance de l'ADN par les protéines à motif *Winged Helix* (Gajiwala & Burley, 2000) :

- Le premier mode dit « classique » est à ce jour le plus rencontré dans les complexes *Winged Helix*-ADN. Il a été découvert pour la première fois à partir de la structure cristallographique de la protéine HNF-3 liée à un fragment d'ADN (Clark et al., 1993). Dans ce modèle, l'hélice de reconnaissance H3 plonge dans le sillon majeur de l'ADN et établit plusieurs contacts avec les bases nucléotidiques (contacts spécifiques) et le squelette phosphate (contacts non spécifiques). La boucle W1 située entre les brins S2 et S3 participe également à la liaison à l'ADN en établissant quelques contacts non spécifiques avec le squelette phosphate et le ribose dans le petit sillon de l'ADN (Figure 5.3). L'hélice H3 constitue donc l'élément majeur de ce mode de reconnaissance en assurant la spécificité de l'interaction, alors que la boucle W1 a pour principale fonction d'augmenter l'affinité de la liaison (Huffman & Brennan, 2002). Dans certains cas, des résidus de l'hélice H2 ou de la région N-terminale de H1 interagissent également avec l'ADN et contribuent à améliorer l'affinité de l'interaction. La plupart des interactions *Winged Helix*-ADN dans ce mode d'action impliquent des résidus à chaîne latérale polaire et notamment chargée positivement. Par conséquent, les domaines *Winged Helix* qui adoptent ce mode de reconnaissance classique présentent une surface d'interaction H3-W1 largement positive.

- Le second mode dit « atypique » n'a été identifié à ce jour qu'à une seule reprise dans la structure cristalline de la protéine RFX1 liée à un fragment d'ADN (Gajiwala et al., 2000). Il implique également les éléments H3 et W1 mais leur rôle est inversé. Ainsi, la spécificité de l'interaction est ici assurée par la boucle W1, riche en résidus basiques, et qui établit plusieurs contacts avec les bases du grand sillon de l'ADN (Figure 5.3). La

surface de l'hélice H3 apparaît comme neutre et interagit principalement avec le squelette phosphate du sillon mineur. De manière intéressante, plusieurs domaines *Winged Helix* capables de lier l'ADN comme par exemple ORC2 (Singleton et al., 2004), ou SmtB (Cook et al., 1998), présentent une surface neutre au niveau de l'hélice H3 et un amas de résidus basiques dans la boucle W1. Il est donc fort probable que ces domaines utilisent le mode de reconnaissance atypique pour lier l'ADN.

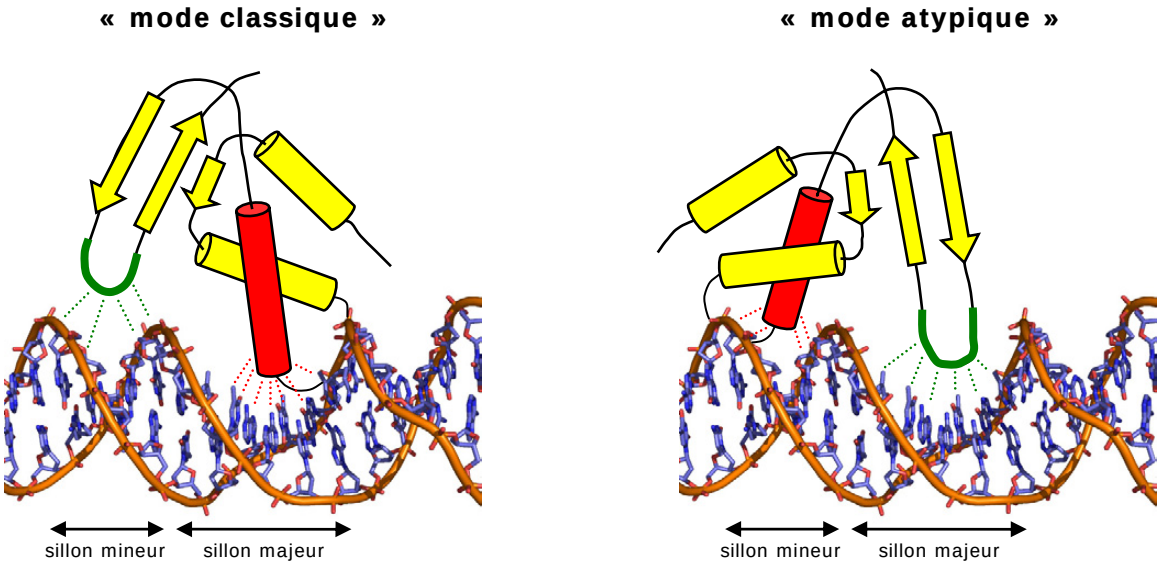


Figure 5.3 *: Illustration des modes de reconnaissance de l'ADN par les motifs Winged Helix. L'hélice H3 est représentée en rouge et la boucle W1 en vert.*

2.1.2) Comparaison structurale du domaine K2 avec des motifs Winged Helix de liaison à l'ADN

L'analyse de la structure du domaine K2 par l'algorithme DALI fait apparaître une homologie de structure importante entre K2 et les protéines ORC2 (Singleton et al., 2004), PA-Fur (Pohl et al., 2003), TFIIEβ (Okuda et al., 2000), BlaI (Safo et al., 2005), MecI (Garcia-Castellanos et al., 2004), et DP2 (Zheng et al., 1999). Ces protéines sont des régulateurs de la transcription des gènes impliqués dans des mécanismes variés comme le contrôle de l'incorporation du fer (PA-Fur), la résistance bactérienne aux antibiotiques (BlaI et MecI), la régulation du cycle cellulaire (ORC2 et DP2), et l'initiation de la transcription (TFIIEβ). Pour toutes ces protéines, le domaine *Winged Helix* homologue à K2 est un domaine de liaison à l'ADN. Parmi ces domaines structuralement proches, figure le motif *Winged Helix* des protéines BlaI, MecI, et DP2 dont la structure en complexe avec un fragment d'ADN a été

résolue par cristallographie des rayons X. Aussi, il est à noter que la structure de la protéine BlaI a été initialement déterminée par RMN en solution par les chercheurs de l'IBS Jean-Pierre Ebel de Grenoble (Van Melckebeke et al., 2003). Ces trois motifs adoptent un mode de reconnaissance de l'ADN de type classique. Nous avons superposé la structure du domaine K2 avec celle de ces 3 protéines en complexe afin d'évaluer les potentialités du *Winged Helix* de K2 à fixer l'ADN selon ce mode de reconnaissance.

La topologie du domaine *Winged Helix* de la protéine MecI liée à un double brin d'ADN de 25 paires de bases est du type H1-H2-T-H3-S1-S2. Le programme DALI a été utilisé pour identifier les régions structuralement proches de K2 et MecI. Malgré une absence d'homologie de séquence entre ces 2 protéines (< 10 %), la déviation moyenne « rmsd » atteint 2.7 Å sur 66 carbones α. Comme le montre la Figure 5.4, les 2 structures se superposent de manière quasi parfaite au niveau du feuillet β, de la boucle W1, et de l'hélice H2 (en arrière plan). L'hélice H1 du domaine K2 comporte 2 tours de plus que son homologue de MecI et son orientation est un peu moins ouverte par rapport au reste de la structure. La plus grande différence structurale entre ces 2 protéines se situe au niveau de l'hélice de reconnaissance H3 et de la région du coude entre H2 et H3. En effet, l'hélice H3 du domaine K2 est d'une part, plus courte que son homologue de MecI d'un peu moins de 2 tours et d'autre part, son orientation sensiblement plus ouverte ne lui permet pas de pénétrer le sillon majeur de la même manière que H3 de MecI. Il apparaît ainsi en superposant ces 2 structures que la large boucle entre H2 et H3, et notamment l'hélice 3_{10} H2.5, sont dans une position beaucoup plus favorable pour interagir avec les bases du grand sillon de l'ADN.

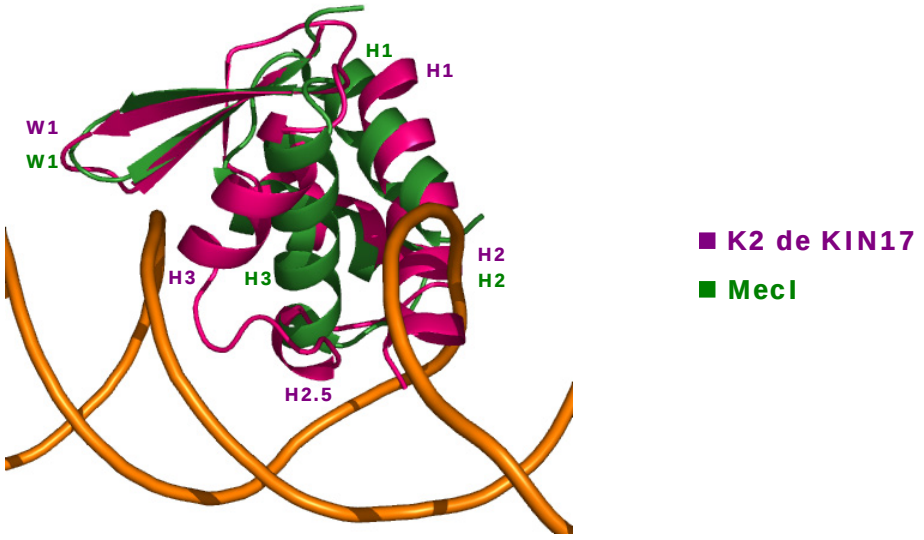


Figure 5.4 *: Vue d'ensemble de la superposition de structure du domaine K2 avec la protéine MecI en complexe avec un double brin d'ADN de 25 paires de bases (PDB : 1SAX). Le squelette phosphate de l'ADN est représenté en orange.*

Dans la structure cristallographique du complexe MecI-ADN, 7 résidus de l'hélice de reconnaissance H3 sont impliqués dans la liaison avec l'ADN et parmi ceux-ci, les 3 résidus K43, T47, et R51 établissent des contacts majeurs et spécifiques avec 4 bases nucléotidiques. Ces trois résidus, mis en évidence dans la Figure 5.5, appartiennent à la région N-terminale de H3 qui ne se superpose pas avec l'hélice H3 de K2. A la place de l'arginine R51 de MecI qui forme 2 liaisons hydrogène avec une guanidine, on trouve dans la même orientation le tryptophane W72 de K2, d'une part plus volumineux et hydrophobe, et d'autre part qui n'a pas la capacité à former 2 liaisons hydrogène. La lysine K43 de MecI qui forme une liaison hydrogène avec une thymine se superpose quasi parfaitement à l'asparagine N59 de l'hélice 3_{10} de K2. Cette asparagine pourrait également former cette liaison hydrogène mais ne possède pas la basicité d'une lysine. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le domaine K2 ne présente quasiment aucun résidu basique dans la région contenant la large boucle et l'hélice H3. Aussi, l'orientation des chaînes latérales négatives des résidus E64 et D68 vers le double brin d'ADN n'est pas très favorable à l'approche du squelette phosphate chargé négativement.

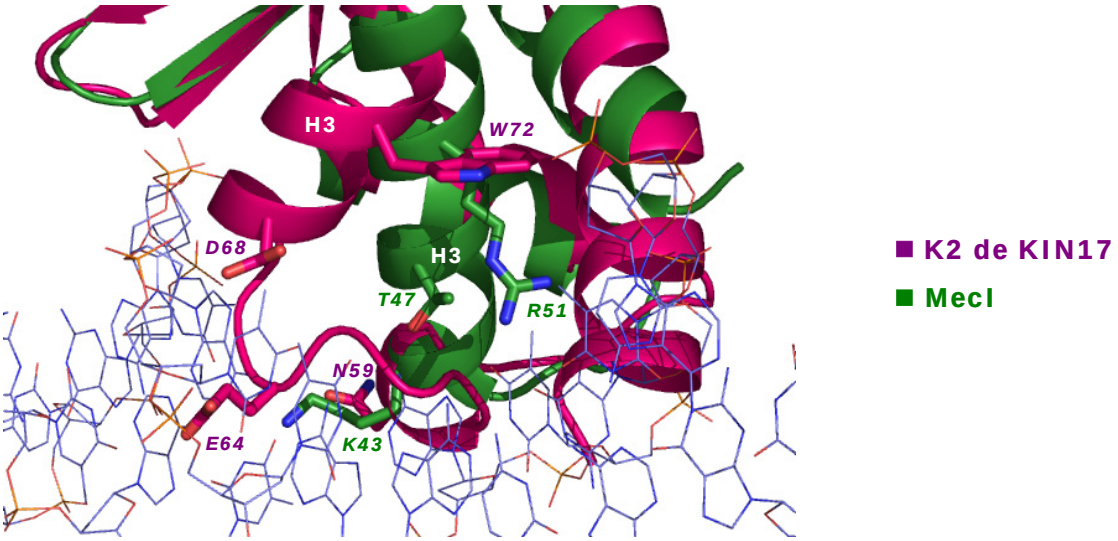


Figure 5.5 *: Comparaison structurale des hélices H3 de K2 et MecI. Les 2 protéines sont superposées comme dans la Figure 5.4. Les chaînes latérales des résidus mis en évidence sont représentées par des sticks violets pour K2, et verts pour MecI. Les hétéroatomes N, et O sont différenciés et sont respectivement représentés par des sticks bleus, et oranges. Le double brin d'ADN est représenté par des traits bleus et oranges pour le squelette phosphate.*

Nous avons également superposé la structure de K2 avec celle des protéines BlaI et DP2 en complexe avec un fragment d'ADN. Ces 2 domaines présentent une forte homologie de structure avec le domaine K2 : la déviation moyenne rmsd est de 2.5 Å sur 62 carbones α

pour DP2, et de 2.9 Å sur 67 carbones α pour BlaI. De manière très analogue à MecI, la structure de K2 est très proche de celle de BlaI et DP2 au niveau de l'hélice H2, du feuillet β, de la boucle W1, et aussi au niveau de l'hélice H1 pour DP2 (Figure 5.6). La plus grande divergence structurale se situe au niveau de l'hélice H3 dont la longueur dans K2 (10 résidus) est plus courte que dans BlaI et DP2 (respectivement 15 et 21 acides aminés). De plus, l'orientation plus ouverte de l'hélice H3 de K2 ne semble pas très favorable à une interaction avec les bases du sillon majeur de l'ADN et comme précédemment, celui-ci apparaît principalement occupé par la large boucle entre H2 et H3 de K2. Ainsi, les résidus majeurs de l'hélice H3 de BlaI et DP2 qui établissent des contacts spécifiques avec les bases de l'ADN appartiennent à une région qui ne se superpose pas avec l'hélice H3 de K2, mais plutôt avec l'hélice 3_{10} H2.5.

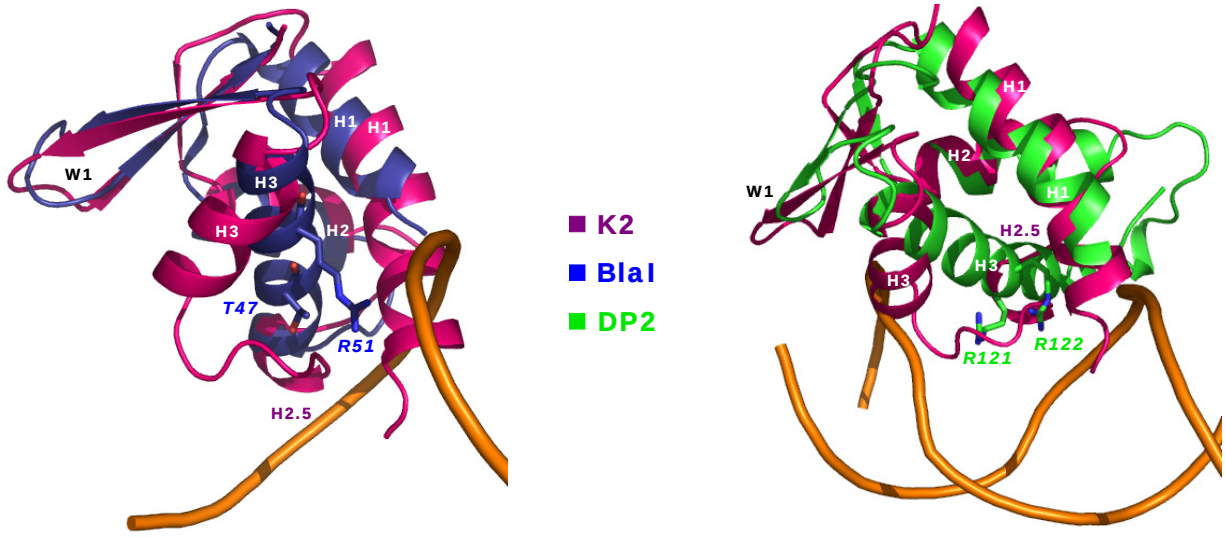


Figure 5.6 *: Superposition de structure du domaine K2 avec le motif Winged Helix des protéines BlaI et DP2 en complexe avec l'ADN. Les chaînes latérales des résidus de l'hélice H3 qui interagissent avec les bases du grand sillon sont représentées par des sticks. Le squelette phosphate de l'ADN est coloré en orange. A) Superposition de K2 avec BlaI liée à un double brin de 25 paires de bases (PDB : 1XSD). Seul un des deux brins est représenté. B) Superposition de K2 avec la protéine DP2 du complexe hétérodimère DP2-E2F4-ADN contenant un fragment de 15 paires de bases (PDB : 1CF7).*

La superposition de structure du domaine K2 avec les motifs *Winged Helix* des protéines MecI, BlaI, et DP2 fait donc apparaître des divergences structurales significatives au niveau de l'hélice de reconnaissance H3. Contrairement à ces 3 motifs, K2 présente une large boucle de 15 résidus entre H2 et H3 (Figure 5.7) dont la présence semble réduire la taille de l'hélice H3 et ne lui permet pas d'adopter une orientation favorable pour interagir avec le grand sillon de l'ADN selon le mode de reconnaissance classique des *Winged Helix*. Pour de

nombreux motifs *Winged Helix*, la liaison à l'ADN s'accompagne d'une déformation ou d'une réorientation de l'hélice H3 qui peut atteindre une quinzaine de degrés (Gajiwala & Burley, 2000). Dans le cas du domaine K2, la réorientation de l'hélice H3 dans une position plus favorable nécessiterait une modification majeure de l'organisation de la boucle et de la position de l'hélice 3_{10} H2.5. Or, il apparaît, d'après les données RMN, que cette hélice 3_{10} est stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène et qu'elle incorpore le corps rigide de la protéine tout autant que la boucle. Par conséquent, la réorientation de l'hélice H3 pour adopter le mode de reconnaissance classique nécessiterait une modification structurale importante du domaine K2 dont l'envergure, à notre connaissance, n'a jamais été observée dans un motif *Winged Helix*. Il est toutefois important de noter que ce n'est pas la présence même d'une hélice additionnelle dans la boucle entre H2 et H3 qui compromet l'interaction potentielle de H3 avec le sillon majeur. La protéine Genesis, dont la structure en complexe avec un fragment d'ADN a été résolue par RMN (Jin et al., 1999), contient une hélice α additionnelle H4 de 5 résidus entre H2 et H3 (Figure 5.7). Dans la structure, cette hélice est positionnée à l'extérieur du sillon majeur et l'hélice de reconnaissance H3, dont l'orientation et la longueur sont comparables à H3 de MecI et BlaI, pénètre et interagit avec le sillon majeur de manière classique. Par conséquent, il s'agit bien de la position de l'hélice 3_{10} de K2, et non de sa présence, qui distingue le plus le motif *Winged Helix* du domaine K2 du *Winged Helix* de BlaI, MecI, DP2, et Genesis. Il est d'ailleurs intéressant de noter que Genesis n'apparaît pas comme un homologue structural de K2 d'après l'analyse DALI, et ceci en dépit d'une certaine homologie de topologie dans la région H2-H3.

```
BlaI :      SANEIVVEIQKYKEVSDKTIRTLITRLYKKEII
DP2 :       SYNEVADELVSEFTNSNNHLAADSAYDQKNIRRRVYDALNVLVAMN
MecI :      SANNIIEEIQMQKDWSPKTIRTLITRLYKKGFI
Genesis :   LSGICEFISNRFPYYREKFPAWQNSIRHNLSLNDC
K2 :        HNNIVYNEYISHREHIHMNATQWETLTDFTKWLGREG
```

***Figure 5.7** : Définition des éléments de structure secondaire entre les hélices H2 et H3 du motif Winged Helix des protéines BlaI, DP2, MecI, Genesis, et K2 (KIN17). Les résidus de l'hélice H2 sont surlignés en vert, et de l'hélice H3 en orange. Les hélices additionnelles de K2 (H2.5) et Genesis (H4) apparaissent en rouge.*

Le calcul des potentiels électrostatiques de surface met également en évidence des différences majeures entre le domaine K2 et les motifs *Winged Helix* structuralement proches

capables de lier l'ADN. Comme le montre la Figure 5.8, le potentiel électrostatique de la surface H3-W1 est largement positif chez les protéines MecI, BlaI, et DP2. C'est également le cas pour la protéine Genesis. Cette caractéristique structurale est typique des protéines à motif *Winged Helix* qui adoptent un mode de reconnaissance de l'ADN de type classique.

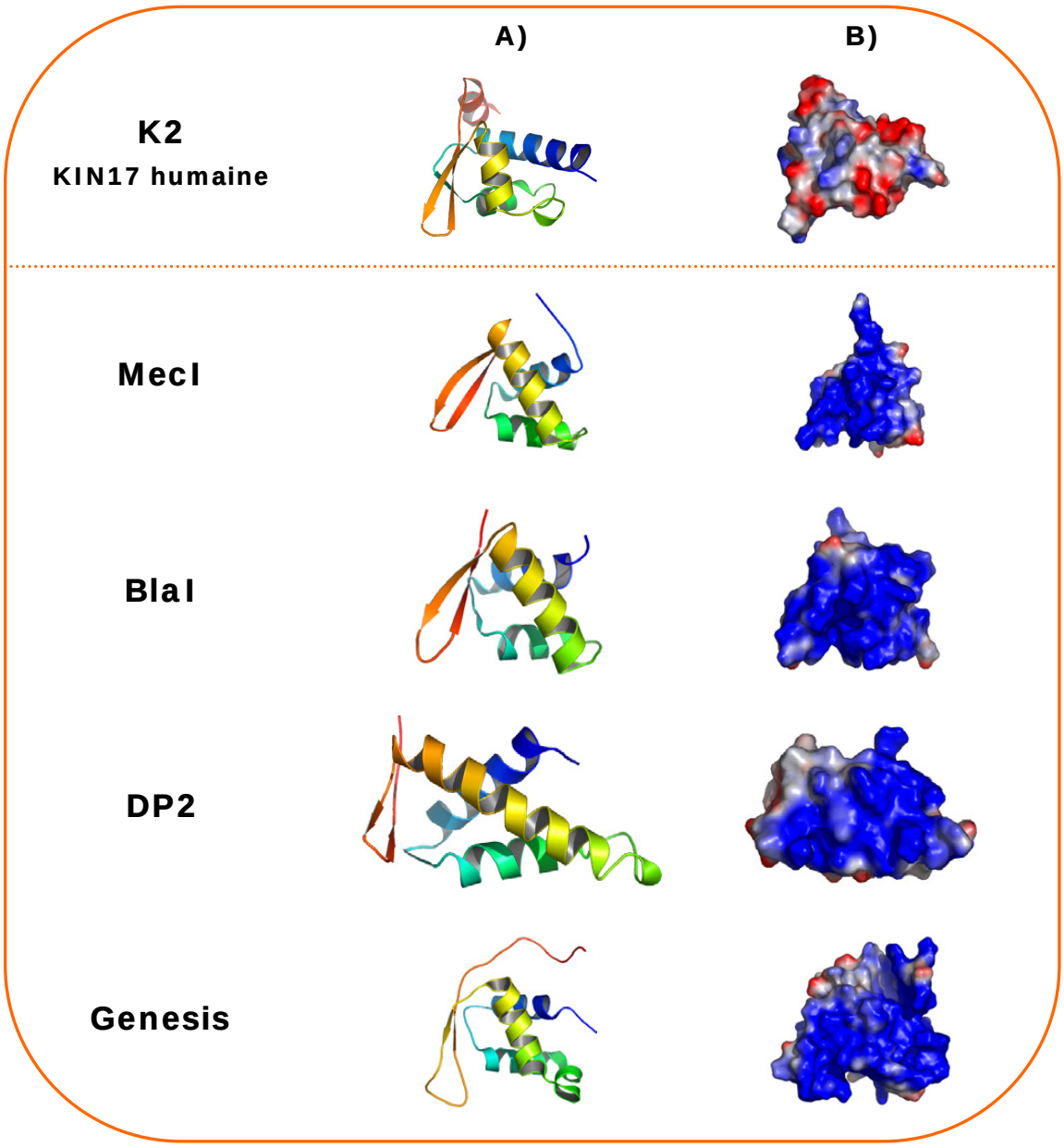


Figure 5.8 *: Comparaison des potentiels électrostatiques de surface des protéines K2 (KIN17), MecI, BlaI, DP2 (du complexe E2F4-DP2) et Genesis. A) Représentation de la structure de ces protéines. L'hélice H1 apparaît dans les tons bleus, H2 dans les tons verts, H3 dans les tons jaunes, et la boucle W1 et les brins S2 et S3 dans les tons oranges. B) Représentation du potentiel électrostatique de surface calculé avec le programme APBS (Baker et al., 2001) dans la même orientation que A). Les régions chargées négativement sont en rouge et celles chargées positivement en bleu. Les régions blanches correspondent à des régions peu chargées ou hydrophobes.*

Dans ces protéines, l'hélice H3 et la boucle W1 contiennent plusieurs résidus lysine et arginine dont les chaînes latérales positives sont projetées vers l'extérieur du domaine et établissent de nombreux contacts électrostatiques avec le squelette phosphate de l'ADN chargé négativement. Dans le cas du domaine K2, seuls 2 résidus lysine et arginine sont dénombrables au niveau de l'hélice H3, ainsi qu'une lysine dans la boucle W1. Il en résulte une surface électrostatique H3-W1 peu polaire et très faiblement chargée positivement.

2.1.3) Comparaison avec la protéine ADAR1

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la protéine qui présente la plus forte homologie structurale avec K2 est le domaine Zα de ADAR1 humaine. La protéine ADAR1, impliquée dans la régulation de l'ARN (Herbert et al., 1995), est capable de lier l'ADN de type Z via son domaine *Winged Helix* Zα. L'ADN Z est une forme rare de l'ADN dont la fonction est encore mal connue. Ce polymère de bases nucléotidiques se structure en une double hélice gauche riche en bases guanine et cytosine, et dont l'alternance de conformation *anti* et *syn* a pour conséquence la formation d'un sillon unique et profond. De manière intéressante, les bases moléculaires de la reconnaissance de l'ADN Z par le domaine Zα sont très différentes de celles de la reconnaissance de l'ADN B (forme classique) par les motifs *Winged Helix*, mais elles impliquent les mêmes éléments de structure secondaire (Schwartz et al., 1999). Ainsi, Zα utilise principalement son hélice de reconnaissance H3 et sa boucle W1 pour établir des contacts avec le squelette phosphate et le cycle furanose des sucres. Cependant, cette protéine n'établit aucun contact direct avec les bases nucléotidiques. Par conséquent, la reconnaissance de l'ADN Z par le domaine Zα de ADAR1 n'est pas spécifique de la séquence mais plutôt de la conformation Z. Aussi, à l'image des motifs *Winged Helix* qui lient l'ADN classique de type B, la majorité des interactions avec l'ADN Z sont de nature électrostatique et impliquent des résidus à chaîne latérale chargée positivement. Il en résulte que les domaines *Winged Helix* qui lient l'ADN Z comme ADAR1 présentent un potentiel de surface H3-W1 largement positif (Figure 5.9B), ce qui n'est pas le cas du domaine K2.

La superposition de structure de K2 avec Zα de ADAR1 fait apparaître une très forte homologie de structure entre ces 2 protéines : la déviation moyenne rmsd est de 2.0 Å sur 61 carbones α (Figure 5.9C). Les hélices H1 et H2 sont d'une longueur quasiment identique et s'alignent presque parfaitement l'une sur l'autre. Zα contient une boucle W1 un peu plus longue et 2 brins β S2 et S3 un peu plus courts, mais le nombre de résidus dans la région S2-

W1-S3 est sensiblement identique dans les 2 domaines (une quinzaine de résidus). La plus grande différence structurale concerne une nouvelle fois la région de l'hélice H3 et de la boucle entre H2 et H3. L'hélice H3 de K2 est plus courte d'environ un tour et la plupart des résidus de Zα qui interagissent avec l'ADN Z appartiennent à une région de H3 qui ne se superpose pas sur H3 de K2 mais plutôt sur la boucle ou l'hélice 3_{10}.

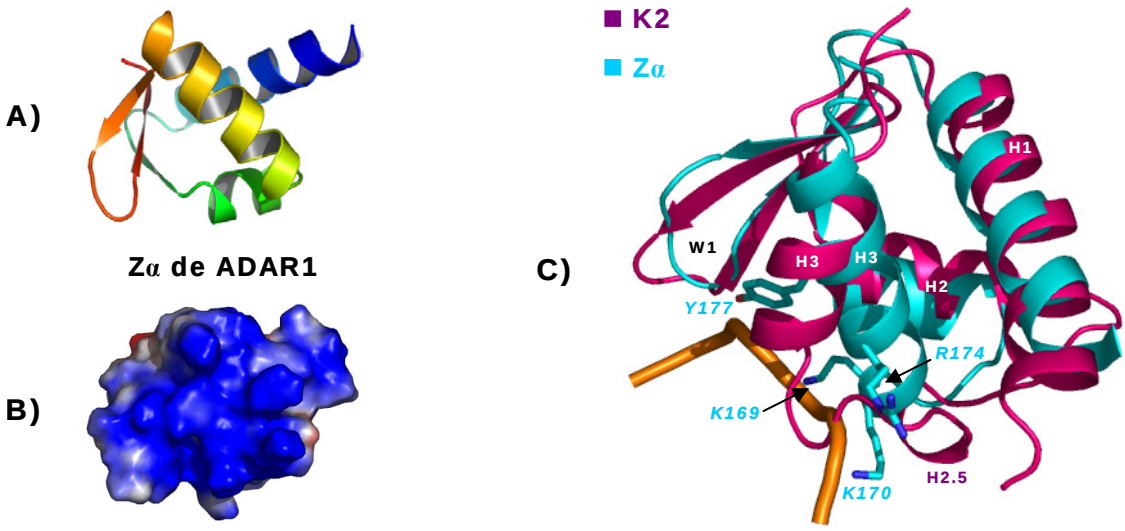


Figure 5.9 *: Comparaison structurale du domaine K2 de KIN17 et de Zα de ADAR1 en complexe avec un fragment d'ADN Z de 6 paires de bases. A) Structure tridimensionnelle de Zα. Le code couleur des éléments de structure secondaire est relatif à la figure précédente. B) Surface électrostatique de Zα calculée avec le programme APBS dans la même orientation que A). C) Superposition de structure de K2 avec Zα. Les chaînes latérales des résidus de l'hélice H3 de Zα qui interagissent avec l'ADN de type Z sont représentées par des sticks. Le squelette phosphate de l'ADN est coloré en orange. Seul un brin est représenté.*

La protéine ADAR1 humaine comporte un second domaine *Winged Helix* (Zβ) situé en aval de Zα à environ 80 acides aminés dans la séquence primaire et dont la fonction est inconnue. La récente résolution de structure de ce domaine par radiocristallographie (Athanasiadis et al., 2005) montre une très forte homologie structurale entre Zβ et Zα (rmsd de 1.3 Å sur 62 résidus). Par conséquent, la structure de Zβ est également très proche de K2 de KIN17 et les résultats de l'analyse DALI font apparaître que ce domaine présente la seconde plus forte homologie structurale avec K2 (rmsd de 2.7 Å sur 67 résidus). De manière intéressante, contrairement à Zα, le *Winged Helix* de Zβ n'est pas capable de lier l'ADN de type Z. En comparant ces 2 structures de manière fine, Athanasiadis *et al.*, ont mis en évidence des divergences structurales au niveau de l'hélice de reconnaissance H3 qui expliquent cette différence fonctionnelle. Ainsi, les 3 résidus conservés K169, R174, et Y177

de Zα qui établissent des contacts majeurs avec l'ADN ne sont ni présents, ni conservés, chez Zβ, et sont respectivement remplacés par A327, A332, et I335 qui n'ont pas la capacité de former de liaison hydrogène avec leur chaîne latérale. Aussi, les résidus K169 et R174 de Zα appartiennent à une région de l'hélice H3 qui ne se superpose pas avec H3 du domaine K2. De plus, le potentiel de surface H3-W1 de Zβ est similaire à celui de K2 et apparaît peu chargé et plutôt neutre contrairement à Zα qui présente un potentiel de surface largement positif. Par conséquent, en se basant sur les relations structure-activité des motifs *Winged Helix* de ADAR1, il apparaît que le domaine K2 de KIN17 n'a pas la capacité structurale pour lier l'ADN de type Z selon le mode de reconnaissance de Zα, et cela en dépit d'une très forte homologie structurale. Aussi, il n'existe à ce jour aucune donnée fonctionnelle qui suggère que la protéine KIN17 est capable de lier l'ADN de type Z.

2.1.4) Reconnaissance de l'ARN par les protéines à motif *Winged Helix*

La publication récente de nouvelles structures de motif *Winged Helix* a élargi l'horizon des fonctions adoptées par ce type de domaine. Ainsi, il a été montré en 2002 par Selmer *et al.*, que le domaine de liaison à l'ARN du facteur d'élongation SelB est un motif *Winged Helix* de topologie canonique (Selmer & Su, 2002). Trois années plus tard, l'institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette a caractérisé pour la première fois les bases moléculaires de la reconnaissance de l'ARN par un motif *Winged Helix* en cristallisant le domaine de liaison à l'ARN de la protéine SelB avec un fragment de 16 bases (Yoshizawa et al., 2005). Dans cette structure, plusieurs résidus des hélices H2, H3, et de la boucle W1 forment une surface conservée qui interagit de manière quasi exclusive avec les groupements phosphate de l'ARN chargés négativement. Ce mode de reconnaissance des acides nucléiques tout à fait unique implique par conséquent une surface H2-H3-W1 fortement chargée positivement, ce qui n'est absolument pas le cas du domaine K2 de la protéine KIN17 dont la structure n'apparaît pas homologue à celle de SelB d'après l'algorithme DALI.

A ce jour, la structure du complexe SelB-ARN est la seule structure connue d'un motif *Winged Helix* lié à l'ARN. Cependant, il existe à notre connaissance au moins 2 autres domaines capables de lier l'ARN qui adoptent un repliement de type *Winged Helix*. Il s'agit du domaine N-terminal LM de la phosphoprotéine La (Dong et al., 2004) et du domaine U2AF du facteur d'épissage U2 (Kielkopf et al., 2004). La topologie du domaine LM, de type H1-H1'-H1''-B1-H2-H2'-H3-B2-B3, est très différente de celle des motifs *Winged Helix*

canoniques, et donc de celle de K2. H1', H1'', et H2' sont des hélices additionnelles insérées entre les hélices du tonnelet orthogonal ancestral formé par H1, H2, et H3. Des expériences de mutagenèse montrent que des résidus des hélices H1, H1', et H1'' et de la boucle entre H2 et H2' forment une surface conservée, aromatique, et hydrophobe susceptible d'interagir avec l'ARN. Il apparaît donc qu'il existe au moins 2 modes de reconnaissance de l'ARN par des motifs *Winged Helix* radicalement différents. La découverte de ces nouveaux modes de reconnaissance montre la grande versatilité avec laquelle ce type de repliement est capable de reconnaître les acides nucléiques. Toutefois, la capacité des domaines *Winged Helix* à lier l'ARN reste à ce jour une fonction atypique de ce genre de motif. Il est donc difficile d'émettre une hypothèse quant à la capacité structurale du domaine K2 à lier l'ARN.

2.2) Approche fonctionnelle

Parallèlement à l'étude structurale par RMN, des études fonctionnelles d'interaction et de recherche de partenaires biologiques ont été menées pour les domaines K2 et K3 de KIN17 humaine par Albane le Maire du Laboratoire de Structure des Protéines. Comme je l'ai évoqué dans le premier chapitre, le domaine K3 correspond aux 160 premiers résidus de la protéine KIN17 humaine. Il est donc principalement constitué du domaine K2 (51-160) et du motif prédit structuré en « doigt de zinc » (28-50). Deux techniques ont été utilisées pour tester l'interaction *in vitro* de K2 et K3 avec l'ADN et l'ARN : il s'agit de l'hybridation *Southwestern* et *Northwestern*.

2.2.1) Interaction avec l'ADN par hybridation *Southwestern*

La technique de *Southwestern* consiste à incuber des protéines avec un fragment d'ADN radiomarqué sur une membrane de nitrocellulose afin de révéler les protéines qui fixent le ligand marqué. Les protéines d'intérêt sont dans un premier temps séparées sur un gel d'acrylamide de type SDS-PAGE, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La coloration au rouge Ponceau de la membrane permet de vérifier la présence et les quantités des protéines déposées sur le gel. La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée avec une solution d'hybridation contenant 50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM d'EDTA, du tampon Denhardt 1X, et le fragment d'ADN cible marqué radioactivement au phosphore ^{32}P. Après plusieurs lavages de la membrane, les protéines qui lient la cible radioactive sont révélées sur plaques radiosensibles phosphorescentes (*phosphoimager*).

Pour tester l'interaction de K2 et K3 avec l'ADN, la cible utilisée est une sonde d'ADN double brin de 500 nucléotides provenant d'une origine de réplication reconnue par la protéine KIN17 humaine. La Figure 5.10 présente les résultats obtenus par *Southwestern* de l'interaction de cette sonde avec K2, K3, et KIN17 humaine.

La révélation de la membrane de nitrocellulose sur plaques radiosensibles fait apparaître un signal au niveau des bandes protéiques de KIN17 entière et du domaine K3. Cette expérience confirme donc dans un premier temps la capacité de la protéine KIN17 humaine à lier l'ADN cible de 500 paires de bases *in vitro*. La forte intensité de la bande correspondant à K3 met en évidence le rôle important de ce domaine dans la liaison à cette sonde d'ADN. En revanche, aucun signal de radioactivité n'est détecté au niveau de la bande protéique relative au domaine K2. Par conséquent, il semble d'une part, que la région 1-50 de KIN17 humaine contenant le « doigt de zinc » joue un rôle majeur dans cette liaison à l'ADN et d'autre part, que le motif *Winged Helix* de KIN17 n'a pas la capacité, ou n'est pas suffisant, pour lier ce fragment d'ADN de manière autonome.

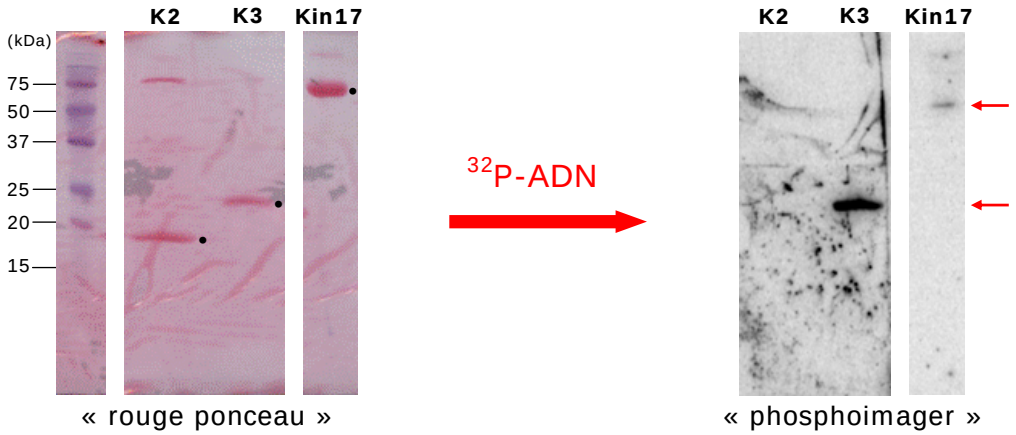


Figure 5.10 *: Test d'interaction de K2, K3, et KIN17 avec une sonde d'ADN de 500 paires de bases par Southwestern. Sur la membrane colorée au rouge ponceau, les bandes correspondant à K2, K3, et KIN17 sont indiquées par des points. Les bandes révélées par le phosphoimager sont mises en évidence par des flèches.*

2.2.2) Interaction avec l'ARN par hybridation *Northwestern*

Le principe de l'hybridation *Northwestern* est tout à fait similaire à celui de l'hybridation *Southwestern* et permet de tester l'interaction d'une protéine avec un fragment d'ARN radiomarqué au phosphore ^{32}P. Les trois protéines KIN17 ont été séparées sur gel

SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose, puis incubées avec une sonde d'ARN radiomarquée de 1200 nucléotides.

Les résultats de cette expérience d'hybridation *Northwestern* sont tout à fait comparables à ceux obtenus précédemment. La révélation de la membrane de nitrocellulose sur plaques photosensibles fait apparaître les bandes protéiques correspondant à KIN17 entière et au domaine K3, mais pas à celle de K2 (Figure 5.11). Par conséquent, ce test d'interaction *in vitro* montre une implication de la région 1-50 contenant le motif « doigt de zinc » dans la liaison à l'ARN. Cette expérience suggère également que le motif *Winged Helix* de KIN17 humaine n'est pas suffisant pour lier l'ARN de manière autonome dans ces conditions d'analyse.

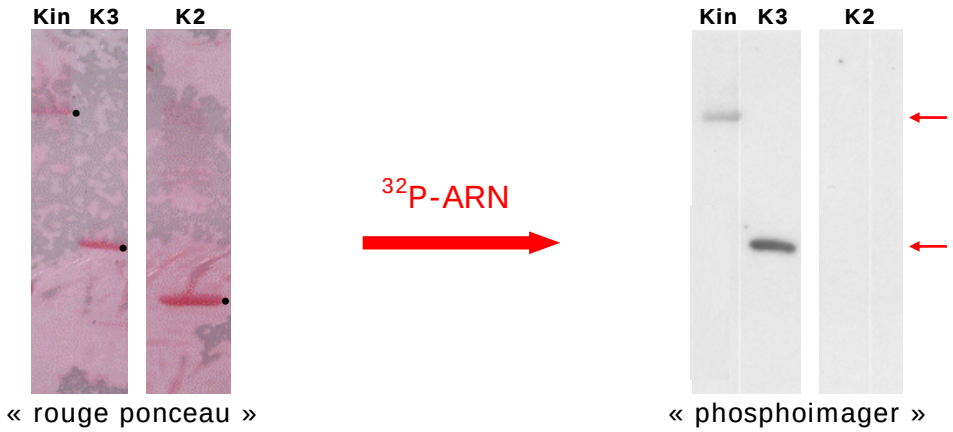


Figure 5.11 *: Test d'interaction de K2, K3, et KIN17 avec une sonde d'ARN de 1200 nucléotides par Northwestern. Sur la membrane colorée au rouge ponceau, les bandes correspondant à K2, K3, et KIN17 (Kin) sont indiquées par des points. Les bandes révélées par le phosphoimager sont mises en évidence par des flèches.*

3) Le motif Winged Helix du domaine K2 présente une surface ultra conservée

Nous avons utilisé le logiciel CONSURF (http://consurf.tau.ac.il/) disponible sur le web afin de déterminer s'il existe une ou plusieurs surfaces conservées durant l'évolution du domaine K2 de KIN17. A partir d'un alignement de séquences issues d'organismes différents et de la structure de K2, CONSURF permet de visualiser grâce à un code couleur l'état de conservation phylogénétique des surfaces de la protéine.

Nous avons vu précédemment que les domaines à motif *Winged Helix* capables de lier l'ADN utilisent leur hélice H3 et leur boucle W1 pour interagir avec les acides nucléiques, et ceci quel que soit le mode de reconnaissance adopté ou le type d'ADN reconnu. Aussi, ces domaines présentent une surface fonctionnelle H3-W1 généralement très conservée qui maintient leur fonction au cours de l'évolution. De manière générale, KIN17 est une protéine remarquablement conservée chez les organismes eucaryotes et notamment au niveau de sa région N-terminale contenant le motif *Winged Helix*. L'analyse de la structure de K2 humaine par le logiciel CONSURF fait apparaître que les résidus exposés de l'hélice H3 semblent peu conservés au vu de l'état de conservation général du domaine, alors que ceux qui forment la surface de la boucle W1 et du brin S2 sont relativement bien conservés (Figure 5.12).

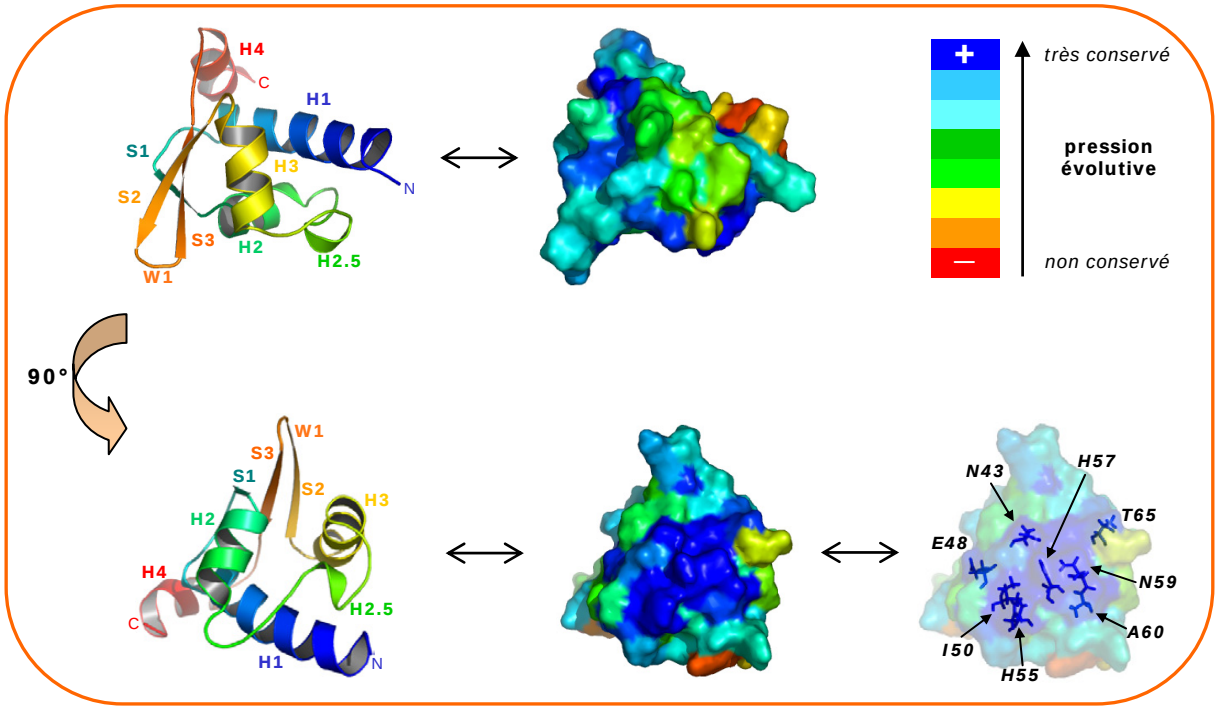


Figure 5.12 *: Mise en évidence d'une surface ultra conservée du domaine K2 de KIN17. Les vues du dessus sont dans la même orientation et mettent en évidence la surface H3-S2-W1 de K2. De la même manière, les vues du dessous correspondent à la surface H2-H2.5 (soit une rotation d'environ 90°). Les surfaces représentées à gauche sont colorées en fonction de l'état de conservation des résidus au cours de l'évolution (d'après CONSURF).*

De manière intéressante, l'analyse CONSURF met également en évidence une surface ultra conservée située sur la face perpendiculaire et adjacente à la surface S2-W1. Cette surface que nous nommerons H2-H2.5 est formée par les chaînes latérales de 8 résidus qui appartiennent à l'hélice H2, à la boucle entre H2 et H3, et à l'hélice 3_{10} H2.5. Le calcul du

potentiel électrostatique de surface avec le programme APBS montre que cette face H2-H2.5, qui comporte 4 résidus hydrophobes (2 histidines, une isoleucine, et une alanine), est peu polaire et plutôt neutre. Ce type de surface relativement hydrophobe est tout à fait favorable à une interaction de type protéine-protéine. Que signifie d'un point de vue fonctionnel la présence d'une telle surface ultra conservée ? Le motif *Winged Helix* de K2 serait-il capable d'interagir avec un partenaire protéique via cette surface ?

Les domaines à motif *Winged Helix* sont principalement connus pour leur capacité à lier et fixer l'ADN. Cependant, il existe des exemples de motif impliqué dans des interactions de type protéine-protéine. Jusqu'au début des années 2000, les seules interactions protéine-protéine connues des *Winged Helix* se limitaient à des interactions d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation avec d'autres motifs *Winged Helix* (Littlefield & Nelson, 1999 ; Zheng et al., 1999). Ces domaines, qui présentent une interface de dimérisation, sont également capables de lier l'ADN et possèdent une surface H3-W1 positive et très conservée au cours de l'évolution, ce qui n'est pas le cas de cette surface dans le domaine K2.

A ce jour, il existe à notre connaissance 2 structures de domaine *Winged Helix* capables de se lier à un partenaire protéique de nature différente, et qui ne lient pas l'ADN. Il s'agit du domaine C-terminal de la sous-unité RPA32 de la protéine de réplication A (Mer et al., 2000), et du domaine RAP74 de la sous-unité TFIIF du facteur de transcription TFII (Nguyen et al., 2003). RPA32 fixe le peptide 73-88 de la protéine UNG2 via une surface négative et hydrophobe composée de résidus de l'extrémité C-terminale de H3 et des brins S2 et S3. L'interface d'interaction de RAP74 avec le peptide 944-961 de FCP1 est différente : elle implique des résidus des hélices H2 et H3 qui forment une surface positive et hydrophobe. De manière intéressante, RAP74 contient une hélice α additionnelle de 4 résidus entre H2 et H3. Cette hélice H2.5 n'est cependant pas impliquée dans l'interaction avec FCP1. Les bases moléculaires de la reconnaissance du partenaire protéique sont donc différentes chez RPA32 et RAP74. Cependant, ces 2 protéines possèdent plusieurs caractéristiques structurales communes au domaine K2 : elles présentent une surface H3-W1 peu polaire et peu conservée, et leur surface d'interaction avec leur partenaire protéique est conservée et plutôt hydrophobe, ce qui est également le cas de la surface ultra conservée de K2 de KIN17.

La surface hydrophobe conservée du motif *Winged Helix* de KIN17 pourrait donc être impliquée dans une interaction avec un partenaire protéique. Elle pourrait également servir à interagir avec un autre domaine au sein même de la protéine, et ainsi contribuer à l'organisation intramoléculaire des domaines de KIN17. De manière intéressante, le module prédit en « doigt de zinc » est très proche du motif *Winged Helix* dans la séquence primaire de KIN17. Ceci laisse supposer l'existence d'interactions entre ces 2 domaines.

4) Caractérisation de la position du motif prédit en « doigt de zinc » autour du domaine *Winged Helix*

Dans l'optique d'approfondir notre recherche des fonctions de KIN17, et notamment du motif *Winged Helix*, nous avons abordé l'étude structurale en solution du domaine K3 (région 1-160). Comme le montre l'alignement de la Figure 5.13, le motif prédit en « doigt de zinc » par le programme SMART n'est séparé du motif *Winged Helix* que par un segment de taille conservée d'environ 15 résidus dans les séquences primaires eucaryotes. Avant d'entreprendre à terme une étude structurale complète du domaine K3 par RMN, nous avons dans un premier temps voulu caractériser les relations structurales qui existent entre ces deux modules, et notamment la position du motif prédit en « doigt de zinc » autour du module *Winged Helix*.

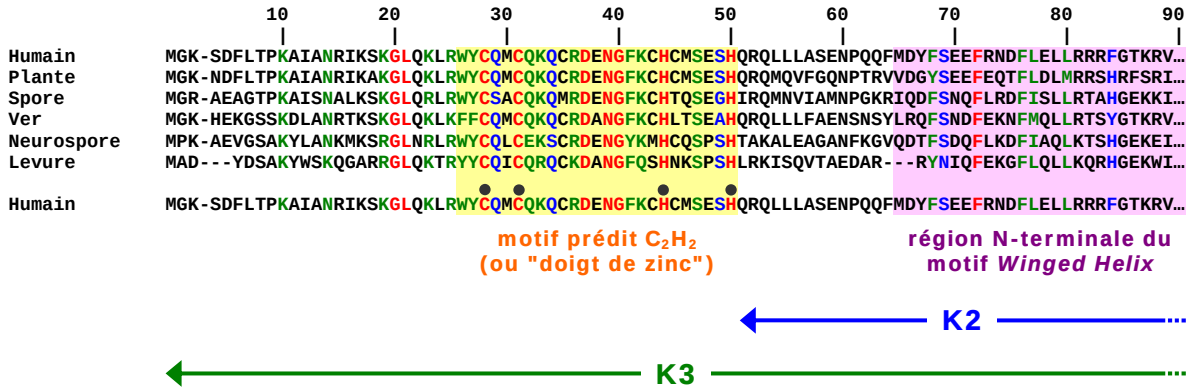


Figure 5.13 *: Alignement de la région N-terminale de KIN17 réalisé avec les séquences de l'Homme, de la plante Arabidopsis Thaliana, du ver Caenorhabditis elegans, du spore Emericella Nidulans, du neurospore Neurospora Crassa, et de la levure Saccharomyces Cerevisiae. Les résidus sont colorés en rouge lorsqu'ils sont conservés, en vert lorsqu'ils sont fortement similaires, et en bleu lorsqu'ils sont faiblement conservés. Les 4 résidus cystéine et histidine ultra conservés et caractéristiques du motif C_2H_2 prédit (ou « doigt de zinc ») sont indiquées par des points noirs.*

4.1) Stratégie employée

Par RMN, l'interaction entre deux partenaires peut être facilement caractérisée à partir de la connaissance des fréquences de résonance de l'un des deux partenaires. La méthode généralement employée consiste à réaliser une titration du partenaire enrichi en isotope ^{15}N, et dont les déplacements chimiques $^{1}H_N$ et $^{15}N_H$ sont connus, par l'autre partenaire non marqué. Le suivi de l'évolution des pics de corrélation sur un spectre HSQC ^{1}H-^{15}N permet alors d'identifier les résidus dont les noyaux de groupement amide ont changé d'environnement chimique, et ainsi de caractériser une surface d'interaction du partenaire marqué ^{15}N avec le partenaire non marqué.

Nous avons adapté le principe de cette méthode, appelée cartographie des variations de déplacement chimique, pour déterminer la position du « doigt de zinc » autour du *Winged Helix*. Le domaine K3 (région 1-160) étant constitué de la totalité des acides aminés de K2 (région 51-160), la démarche consiste à rechercher les pics de corrélation ^{1}H-^{15}N des résidus du *Winged Helix* de K2 sur le spectre HSQC de K3 enregistré dans des conditions identiques ou très proches. Pour cela, nous avons enregistré en parallèle une expérience 3D ^{15}N-NOESY-HSQC sur l'échantillon de K3 afin de distinguer les pics du *Winged Helix* des pics de la région 1-50 sur l'HSQC de K3 (par comparaison avec l'expérience 3D ^{15}N-NOESY-HSQC de K2). La comparaison des fréquences de résonance des noyaux $^{1}H_N$ et $^{15}N_H$ du *Winged Helix* permet alors de mettre en évidence l'influence de la région N-terminale de K3 sur l'environnement électronique des noyaux amides du *Winged Helix*. Une absence totale de modification significative de déplacement chimique et/ou d'intensité signifierait alors que le « doigt de zinc » n'adopte aucune position préférentielle autour du *Winged Helix*, ou qu'il ne se positionne pas à sa proximité.

4.2) Préparation de l'échantillon de protéine K3 simplement marquée ^{15}N

Pour préparer l'échantillon de protéine K3 simplement marquée ^{15}N, nous avons eu recours aux mêmes stratégies et méthodologies que celles utilisées pour produire, purifier, et isoler le domaine K2 (cf. chapitre 2). La région 1-160 de KIN17 humaine a été exprimée en fusion avec le partenaire ZZ, purifiée sur résine d'amylose, et le partenaire ZZ a été clivé sur colonne avec la protéase TEV. Cependant, pour des raisons inhérentes à la présence du « doigt de zinc » dans le domaine K3, il n'a pas été possible d'utiliser les mêmes

compositions de solutions tampons pour purifier la protéine et préparer l'échantillon RMN. En effet, la présence de réducteurs de type DTT ou TCEP, ou d'agent chélateur comme l'EDTA, pourrait décrocher l'ion Zn^{2+} lié aux 2 cystéines et 2 histidines du motif C_2H_2, ou réduire le pont disulfure formé par les 2 cystéines impliquées dans la chélation du métal. D'autre part, le phosphate de zinc étant insoluble, il est préférable d'utiliser un tampon Tris-HCl plutôt qu'un tampon phosphate qui pourrait favoriser l'agrégation de la protéine (Vallee & Auld, 1995). La composition finale des échantillons RMN marqués ^{15}N des protéines K2 et K3 est indiquée dans le Tableau 5.1. Afin de limiter les différences de composition entre les 2 échantillons, les valeurs de pH et de force ionique de l'échantillon K3 ont été choisies identiques à celles de l'échantillon K2.

K2 (C=0.7 mM) région 51-160 de KIN17 humaine	**K3** (C=0.2 mM) région 1-160 de KIN17 humaine
• 50 mM phosphate (pH 6.0) • 150 mM NaCl • 1 mM EDTA • 1 mM TCEP	• 50 mM Tris-HCl (pH 6.0) • 150 mM NaCl

***Tableau 5.1** : Composition des échantillons RMN marqués ^{15}N des protéines K2 et K3.*

4.3) Résultats de la cartographie des variations de déplacement chimique

Nous avons dans un premier temps relevé le nombre de pics de corrélation ^{1}H-^{15}N sur le spectre HSQC de K3. Ce nombre de pics est difficile à comptabiliser en raison de la présence de recouvrement dans la zone centrale du spectre. On peut toutefois estimer sa valeur proche de 130 sachant que le nombre de groupements amides attendu s'élève à 156 (161 résidus dont 4 prolines et une glycine N-terminale). Aussi, près de 90 % des pics correspondant aux résidus du domaine K2 ont été retrouvés sur le spectre HSQC de K3. Par déduction, il apparaît donc que près de la moitié des résonances ^{1}H-^{15}N correspondants aux groupements amides de la région N-terminale 1-50 de K3 sont absentes sur le spectre. A ce stade de l'étude structurale, il est difficile d'expliquer la dégénérescence partielle du signal dans cette région. Il est toutefois possible que l'extrémité 1-25 en amont du motif prédit en « doigt de zinc » soit en échange conformationnel entre une forme structurée et une forme déstructurée, ce qui expliquerait l'absence de près de 25 pics de corrélation. D'autre part, la séquence humaine prédite en « doigt de zinc » comporte 3 cystéines supplémentaires non conservées et différentes des 2 cystéines ultra conservées qui caractérisent le motif C_2H_2.

(Figure 5.13). Ces 3 cystéines pourraient être responsables de sites d'interaction non spécifique avec l'ion Zn^{2+}, ce qui induirait un échange de la position de cet ion entre les 5 cystéines de cette région, accompagné d'échange conformationnel.

Comme le montre la superposition des spectres HSQC ^{1}H-^{15}N de K2 et K3 (Figure 5.14), la grande majorité des pics relatifs aux résidus du motif *Winged Helix* n'ont subi qu'une faible modification de déplacements chimiques ^{15}N et ^{1}H. Le domaine K3 comporte donc un motif *Winged Helix* de repliement similaire à celui du domaine K2. Toutefois, comme nous nous y attendions, la présence de la région N-terminale de KIN17, contenant le « doigt de zinc », en amont du motif *Winged Helix* induit une modification importante de l'environnement électronique des résidus de l'extrémité N-terminale 1-18 du domaine K2. En effet, les changements de déplacements chimiques dans cette région sont tels que l'expérience ^{15}N-HSQC-NOESY ne permet pas de retrouver les pics de corrélation ^{1}H-^{15}N correspondants sur l'HSQC de K3. Cette région 1-18 comporte le segment 1-15 qui sépare le *Winged Helix* du « doigt de zinc » potentiel, et les 3 premiers résidus de l'hélice H1 du *Winged Helix*.

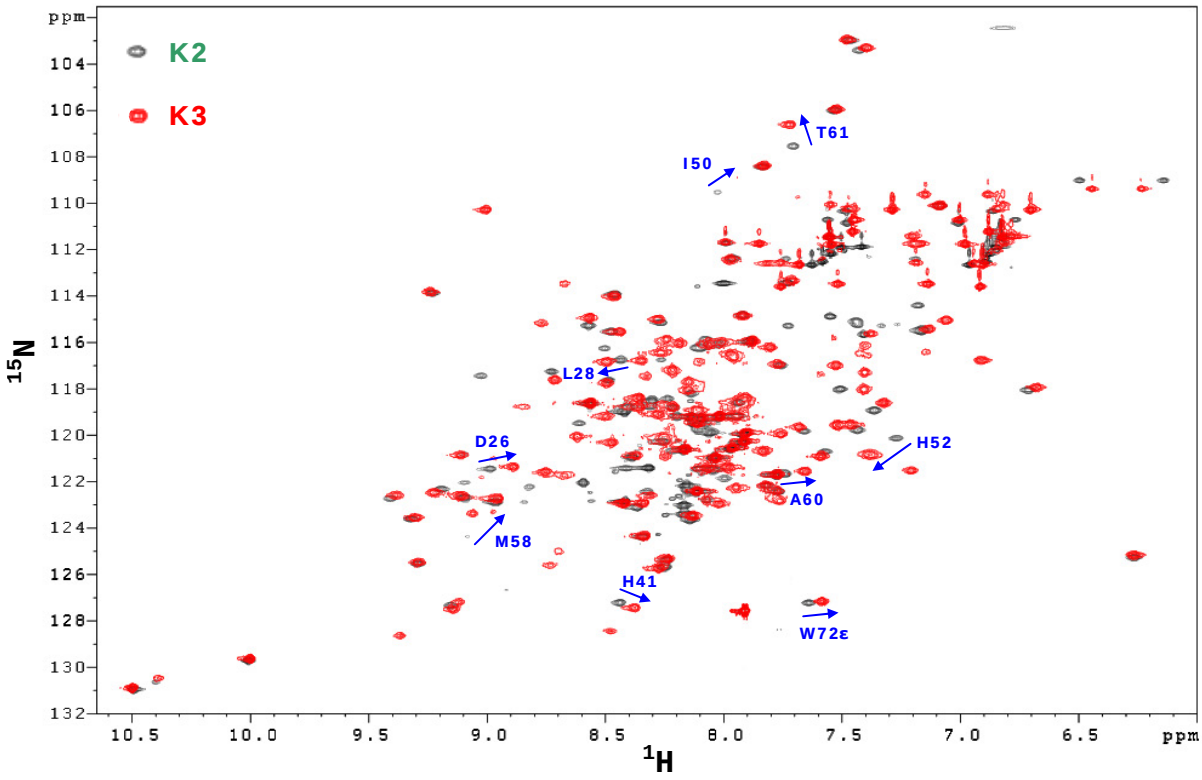


***Figure 5.14** : Superposition des spectres HSQC ^{1}H-^{15}N de K2 et K3. Les résidus qui présentent une variation significative de déplacements chimiques ^{1}H et ^{15}N sont mis en évidence ($\Delta\delta m > 0.7$ ppm). La numérotation des résidus est relative au domaine K2.*

La variation moyenne $\Delta\delta_m$ de déplacements chimiques ^1H et ^{15}N par résidu a été évaluée en utilisant la relation suivante : $\Delta\delta_m = |\Delta\delta H_N| + |\Delta\delta N_H/10|$. Comme le montrent les Figures 5.14 et 5.15, des valeurs significatives de $\Delta\delta_m$ (> 0.07 ppm) sont observées au niveau de résidus de la boucle H2-H3 (I50, H52, et T61), et de l'hélice 3_{10} (M58 et A60). Ces valeurs de $\Delta\delta_m$ indiquent une modification de l'environnement chimique des groupements amides de ces résidus induite par la proximité avec la région N-terminale de KIN17 contenant le motif prédit en « doigt de zinc ». Des modifications d'intensité de pic sont également observées au niveau de la boucle H2-H3. Ainsi, les pics de corrélation ^1H-^{15}N correspondant aux résidus E54, H55, I56, H57, et N59, et qui appartiennent à des zones dégagées du spectre HSQC de K2, n'ont pas été retrouvées sur le spectre HSQC de K3. Cette dégénérescence du signal pourrait s'expliquer par une mobilité du motif « doigt de zinc » qui induirait un équilibre conformationnel (à une vitesse d'échange intermédiaire) entre une forme liée, où ces 5 résidus seraient en interaction avec « le doigt de zinc », et une forme libre où ils ne le seraient pas. Les résidus dont le pic de corrélation n'a pas été retrouvé (hors extrémité 1-18) sont imputés d'une valeur de $\Delta\delta_m$ de 0.1 ppm.

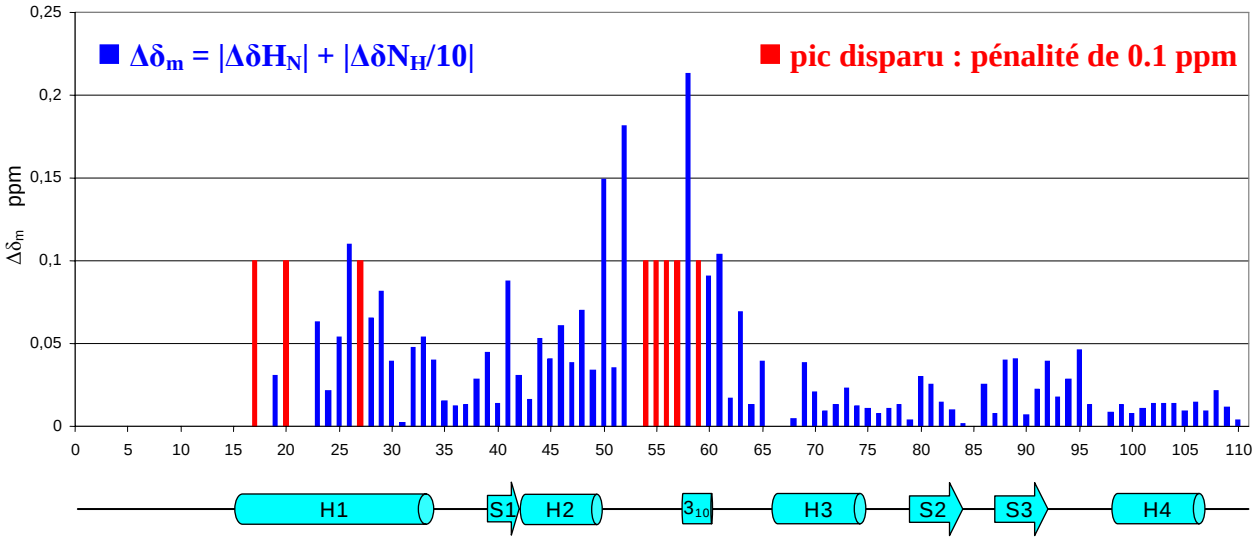


Figure 5.15 *: Graphique des variations moyennes $\Delta\delta_m$ des déplacements chimiques ^1H et ^{15}N des résidus du motif Winged Helix. La numérotation des résidus est relative au domaine K2.*

Les résidus de la boucle H2-H3 affectés par la présence de la région N-terminale de KIN17 contenant le doigt de zinc forment une surface qui est mise en évidence sur la Figure 5.16. De manière intéressante, cette surface se superpose parfaitement avec la surface hydrophobe ultra conservée que nous avons mise en évidence précédemment. Le motif prédit

en « doigt de zinc » adopte donc une position préférentielle au niveau de la surface ultra conservée H2-H3 du motif *Winged Helix*.

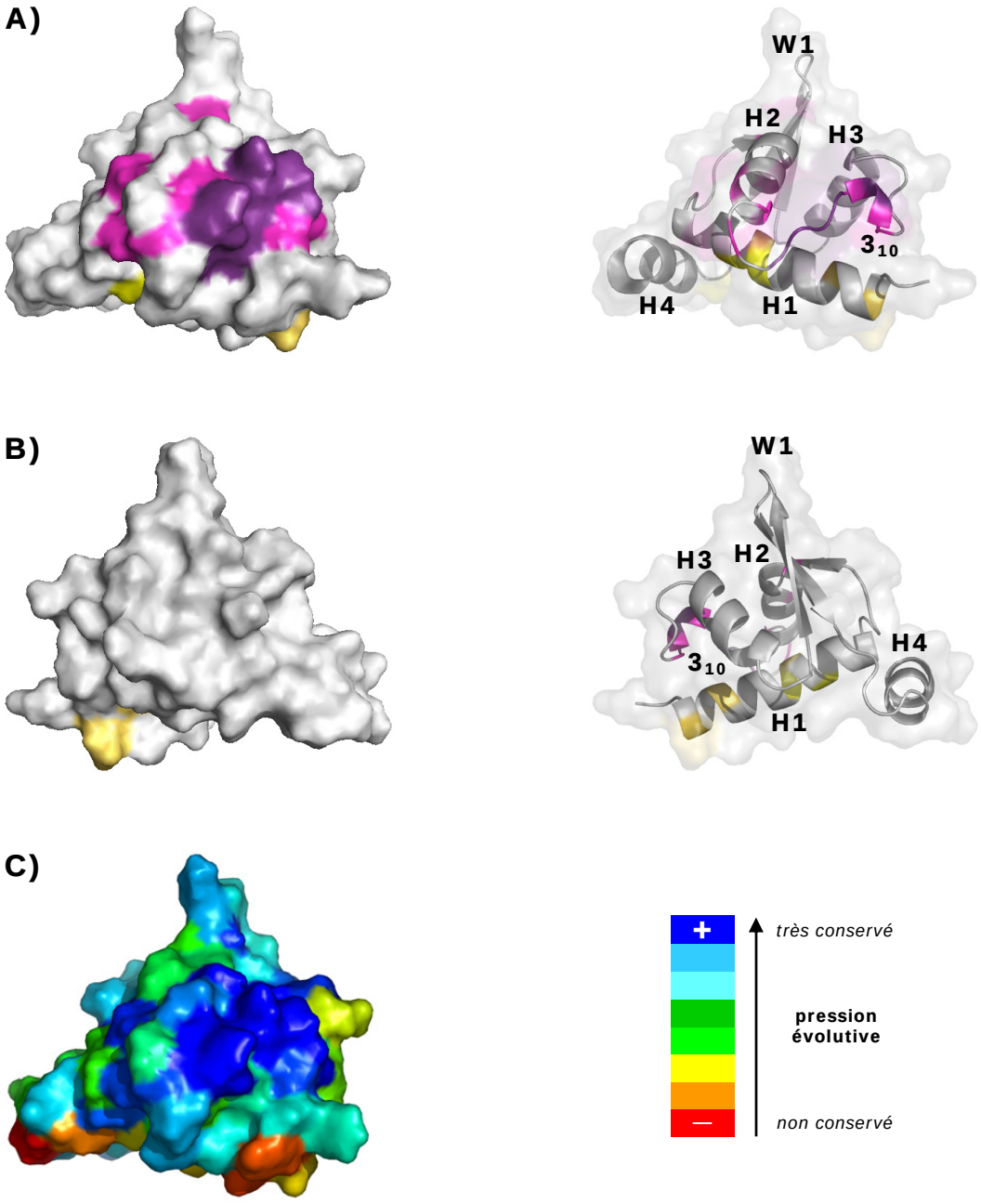


Figure 5.16 *: Mise en évidence d'une surface d'interaction du motif Winged Helix avec la région N-terminale de KIN17 contenant le module prédit en « doigt de zinc ». A) Représentation de la face avant H2-H3. Les résidus dont la modification moyenne de déplacements chimiques $\Delta\delta_m$ est significative ($\Delta\delta_m$ > 0.07 ppm) sont colorés en violet (hors hélice H1). Les résidus dont le pic de corrélation n'a pas été retrouvé sont colorés en rose (hors hélice H1). Les résidus de l'hélice H1 dont la valeur de $\Delta\delta_m$ est significative sont colorés en jaune. B) Représentation de la face arrière opposée à la surface H2-H3. Le code couleur est identique à celui utilisé en A). C) Mise en évidence de la surface ultra conservée H2-H3 du motif Winged Helix. Les surfaces sont colorées en fonction de l'état de conservation des résidus au cours de l'évolution (d'après CONSURF).*

Par ailleurs, des modifications significatives de $\Delta\delta_m$ apparaissent également au niveau des résidus D26, L28, et E29 de l'hélice H1. Ces 3 résidus appartiennent à une surface située à l'opposé de la surface ultra conservée (Figure 5.16). De plus, dans la structure du domaine K2, les protons amides des résidus D26 et L28 sont protégés du solvant et orientés vers le cœur hydrophobe. Par conséquent, nous proposons que la modification significative de déplacements chimiques de ces 3 résidus soit plutôt due à une modification structurale de l'hélice H1 (orientation ou longueur), ou des résidus qui la précédent qui sont déstructurés dans la structure du domaine K2. La structuration des 15 résidus qui séparent le module « doigt de zinc » du motif *Winged Helix* pourrait également provoquer une modification ou une rupture partielle du réseau de liaisons hydrogènes du *Winged Helix*, ce qui expliquerait les modifications significatives de $\Delta\delta_m$ enregistrées.

CHAPITRE 6

Conclusions & Perspectives

L'objectif du travail présenté dans la seconde partie de ce manuscrit était d'améliorer la connaissance des fonctions, des partenaires biologiques, et des mécanismes d'action de la protéine KIN17 humaine en s'intéressant plus particulièrement à la région 51-160. Pour cela, nous avons abordé une approche structurale qui consiste à émettre des hypothèses sur les fonctions potentielles adoptées par cette région à partir de la connaissance de sa structure. Nous avons montré par Résonance Magnétique Nucléaire et Modélisation Moléculaire que la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine adopte un repliement de type *Winged Helix* de topologie quasi canonique. La détermination de la structure de ce domaine réfute donc la prédiction des logiciels bio-informatiques de détections de domaines qui suggèrent l'existence d'un domaine FF de liaison à des peptides phosphorylés dans la région 50-150 de KIN17 humaine. Les domaines à motif *Winged Helix* sont principalement connus pour leur capacité à lier l'ADN et de ce fait, ils sont souvent retrouvés chez des facteurs de transcription eucaryotes ou procaryotes. Ce simple constat constitue un premier argument structural qui supporte l'implication de KIN17 dans la régulation et la maintenance de l'ADN.

- *Interaction avec l'ADN ?*

Nous avons comparé la structure du domaine K2 avec celle de motifs *Winged Helix* structuralement proches afin d'évaluer les potentialités de K2 à lier l'ADN. A ce jour, il existe 2 modes de reconnaissance de l'ADN par les domaines à motif *Winged Helix* dont les bases moléculaires sont parfaitement connues. La comparaison structurale du domaine K2 avec ces motifs fait apparaître des divergences significatives qui mettent en cause la capacité de K2 à lier l'ADN selon ces modes de reconnaissance :

- Les motifs *Winged Helix* qui adoptent le mode de reconnaissance classique utilisent principalement leur hélice H3 pour pénétrer le sillon majeur et interagir avec le squelette et les bases de l'ADN. En superposant K2 avec plusieurs de ces motifs, nous avons mis en évidence des différences structurales au niveau de l'hélice H3 qui apparaît plus courte chez K2 et dont l'orientation, plus ouverte par rapport au reste du domaine, n'est pas favorable à une interaction avec le grand sillon de l'ADN selon le mode de reconnaissance classique. La présence et la position d'une large boucle rigide et très conservée, et d'une hélice 3_{10} atypique, entre H2 et H3 sont responsables de cette différence structurale et différencient le motif *Winged Helix* de K2 des *Winged Helix* classiques de liaison à l'ADN.

- L'analyse du potentiel électrostatique de surface a également mis en évidence des différences structurales notables : tous les motifs *Winged Helix* qui lient l'ADN de type B ou Z selon le mode de reconnaissance classique présentent un potentiel de surface H3-W1 largement positif alors que cette surface apparaît peu polaire et faiblement chargée positivement chez K2.

- Cette surface fonctionnelle de liaison à l'ADN H3-W1 est fortement conservée chez les motifs *Winged Helix* de liaison à l'ADN, ce qui n'est pas le cas chez K2 où nous avons montré que l'hélice H3 est peu conservée au vu de l'état de conservation générale du domaine K2.

- Le seul motif *Winged Helix* connu à ce jour qui adopte un mode de reconnaissance atypique utilise sa boucle W1 qui contient plusieurs résidus basiques pour interagir avec le grand sillon de l'ADN. Chez K2, cette boucle ne contient que 2 résidus qui forment un coude β de type I et les surfaces formées par les résidus de W1 et des brins β S2 et S3 sont peu polaires et plutôt hydrophobes.

L'ensemble de ces observations suggère que le motif *Winged Helix* de la région 51-160 de KIN17 humaine n'est pas capable de lier l'ADN selon les modes de reconnaissance connus des *Winged Helix*. Les premiers tests d'interaction *in vitro* que nous avons menés par *Southwestern* corroborent nos conclusions structurales et montrent que cette région de KIN17 n'est pas suffisante pour lier l'ADN de manière autonome.

- *Interaction avec l'ARN ?*

Les données récentes de la littérature ont mis en évidence la capacité de 3 motifs *Winged Helix* à fixer l'ARN. Toutefois, les bases moléculaires de cette reconnaissance n'ont été identifiées à ce jour qu'à une seule reprise chez le facteur d'élongation SelB. Celles-ci reposent principalement sur une interaction avec l'ARN via une surface formée par des résidus des hélices H2 et H3 particulièrement basiques. Le motif *Winged Helix* de la région 51-160 de KIN17 ne présente pas cette caractéristique structurale et par conséquent, ne possède certainement pas la capacité à lier l'ARN selon ce mode de reconnaissance. Ces données structurales sont toutefois insuffisantes pour conclure quant à la potentialité du *Winged Helix* de KIN17 à interagir avec l'ARN. D'un point de vue fonctionnel, nous avons

montré par hybridation *Northwestern* que ce motif n'est pas suffisant pour lier une sonde d'ARN de 1200 nucléotides reconnue par KIN17 humaine.

- *Interaction de type protéine-protéine ?*

L'utilisation du programme *CONSURF* nous a permis de mettre en évidence la présence d'une surface ultra conservée formée par les chaînes latérales de 8 résidus qui appartiennent à l'hélice H2, à la boucle entre H2 et H3, et à l'hélice 3_{10} H2.5. Cette surface plutôt neutre et relativement hydrophobe est située sur la face adjacente à la surface H3-W1. Nous avons trouvé dans la littérature quelques motifs *Winged Helix* qui possèdent une telle surface hydrophobe et conservée située sur une face différente de H3-W1. Dans la plupart des cas, ce type de surface constitue une interface autonome de dimérisation qui permet une liaison à l'ADN sous forme dimérique. Nos résultats ont montré d'une part, que le domaine K2 se trouve sous forme monomérique en solution et d'autre part, qu'il n'est pas capable de lier l'ADN selon les modes de reconnaissance connus. Par conséquent, il est peu probable que la surface ultra conservée de K2 soit impliquée dans un mécanisme de dimérisation autonome. La récente résolution de structure des domaines RPA32 et RAP74 à motif *Winged Helix* a mis en évidence l'implication de ce type de motif dans des interactions de type protéine-protéine avec un partenaire protéique de nature différente. Ces 2 domaines ne sont pas des homologues structuraux de K2 mais ils présentent des caractéristiques structurales communes : ils ne lient pas l'ADN, leur surface H3-W1 est peu conservée, et ils possèdent une surface hydrophobe très conservée qui interagit avec leur partenaire respectif. Sur la base de ces similitudes, il est apparu possible que la surface ultra conservée du motif *Winged Helix* de la région 51-160 de KIN17 soit impliquée dans des interactions de type protéine-protéine.

Dans l'optique d'améliorer la connaissance des fonctions du motif *Winged Helix* de KIN17, l'étude structurale en solution de la région 1-160 (domaine K3) de la protéine humaine a été initiée par RMN. Les prédictions bio-informatiques préliminaires que nous avons réalisées suggèrent la présence d'un motif de liaison aux acides nucléiques de type « doigt de zinc » en amont du module *Winged Helix* au niveau de la région 28-50 de KIN17 humaine. Les premiers tests d'interaction *in vitro* menés par *Nortwestern* et *Southwestern* sur le domaine K3 mettent en évidence le rôle majeur de la région 1-50 dans la liaison de KIN17 humaine à l'ADN et l'ARN. Nous avons montré par cartographie des déplacements chimiques sur HSQC ^{1}H-^{15}N l'existence de relations structurales entre le module *Winged*

Helix et la région N-terminale 1-50 contenant le motif « doigt de zinc ». Cette étude révèle ainsi que le motif « doigt de zinc » adopte une position préférentielle autour du module *Winged Helix* au niveau de sa surface hydrophobe ultra conservée. Cette surface est donc impliquée dans des interactions de type protéine-protéine intra-moléculaires.

En conclusion, notre approche structurale n'a pas abouti à la caractérisation de la fonction du domaine *Winged Helix* de KIN17 humaine, mais, dans un cadre plus général, elle a permis de contribuer à l'amélioration de la connaissance des fonctions et des partenaires biologiques de la protéine KIN17. Ainsi, nous avons montré d'une part, que ce domaine *Winged Helix* n'est pas capable de lier l'ADN ou l'ARN de manière autonome, et d'autre part, qu'il entretient des relations structurales avec le module « doigt de zinc » de liaison à l'ADN et l'ARN de la région N-terminale de KIN17.

Sur la base de ces conclusions, il serait à présent intéressant de déterminer le rôle exact du motif *Winged Helix* dans la liaison à l'ADN et l'ARN du domaine K3. La caractérisation structurale et dynamique du domaine K3 par RMN nous permettrait de savoir si ce domaine est composé d'une ou de deux unités de repliement. En effet, il est possible que le module « doigt de zinc » ne soit pas capable de se replier de manière autonome. La fonction du motif « *Winged Helix* » pourrait donc être essentiellement structurale et consisterait à favoriser et stabiliser le repliement biologiquement actif du module « doigt de zinc ». Le rôle exact du motif *Winged Helix* dans la liaison à l'ADN et l'ARN pourrait être rapidement mis en évidence par RMN en réalisant une titration du domaine K3 par des acides nucléiques après avoir attribué les raies de résonance de la chaîne principale de K3. Cependant, une étude par RMN de ce domaine nécessiterait dans un premier temps une optimisation des conditions d'analyse afin de pallier la dégénérescence du signal observée dans la région N-terminale contenant le « doigt de zinc », probablement due à de l'échange conformationnel. Dans le cas où cette optimisation ne serait pas suffisante, la mutation d'une ou plusieurs cystéines non caractéristique(s) du motif C_2H_2 pourrait être une solution afin de limiter cet échange conformationnel. A l'issue de cette étude structurale, la mise en évidence d'une interaction conjointe du module « doigt de zinc » et du motif *Winged Helix* avec l'ADN ou l'ARN serait considérable d'un point de vue structural. Cela signifierait que ces 2 modules constituent un nouveau repliement de domaine de liaison aux acides nucléiques. A notre connaissance, il

n'existe en effet aucune structure tridimensionnelle de protéine qui présente un tel domaine formé par un motif *Winged Helix* et un module « doigt de zinc ».

D'une manière plus globale, l'étude structurale de KIN17 pourrait être poursuivie en recherchant les interactions du domaine K3 avec les autres domaines de la protéine. La région C-terminale 268-393 de KIN17 humaine vient d'être résolue au LSP par cristallographie des rayons X. Ce domaine contient un double motif SH3 de liaison à l'ARN. La reconstitution de la structure entière de KIN17 à partir de la structure de ses domaines structuraux pourrait être réalisée à partir d'une analyse SAXS (*Small Angle X-ray Scaterring*) qui permet de reconstituer l'enveloppe globale de la protéine.

Enfin, au-delà de l'approche structurale, les chercheurs du LSP poursuivent actuellement la recherche des partenaires protéiques des domaines de KIN17 par des études biochimiques de type « double hybride » ou *pull down* réalisées sur des extraits nucléaires. En cas de résultat favorable pour les domaines K2 et K3, la RMN sera sans aucun doute la méthode de choix pour caractériser les bases moléculaires de l'interaction de ces domaines avec leur(s) partenaire(s), et ainsi améliorer la connaissance des fonctions précises et des modes d'action de la protéine KIN17 dans le noyau de la cellule.

ANNEXE

Criblage des conditions d’expression des protéines PROentier, PROcatal, PROter, et PROinser

1) Matériels et Méthodes

1.1) Construction des plasmides d'expression par recombinaison homologue

1.1.1) Stratégie employée

Commercialisée par la société Invitrogen, la technologie *Gateway* s'appuie sur les propriétés de recombinaison homologue du bactériophage lambda au niveau des sites spécifiques *att*, qu'il utilise naturellement pour s'intégrer dans le génome d'*E. coli* (Landy, 1989). Ce mécanisme naturel a été détourné pour en faire un système de recombinaison *in vitro* simple et efficace. Le système de clonage *Gateway* présente de nombreux avantages et permet notamment de s'affranchir des étapes de restriction-ligation obligatoires lors d'un clonage classique. L'insertion d'un insert d'ADN est spécifique et directionnelle (conservation du cadre de lecture), et le moyen de sélection est rapide. Il est alors facile d'obtenir différents plasmides d'expression à partir d'un seul plasmide d'entrée.

Le principe de la méthodologie de construction des différents vecteurs d'expression à partir de la technique *Gateway* est représenté dans la Figure A1. La première étape consiste à adjoindre aux gènes encodant les domaines PRODH les 2 sites de recombinaison spécifique, *attB1* en amont, et *attB2* en aval du gène, par PCR d'assemblage. Un site de clivage reconnu par la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*) est également incorporé en amont du gène d'intérêt. Les amplicons de PCR, flanqués des sites *attB*, sont alors clonés dans le vecteur donneur pDONR221 (Invitrogen) possédant les sites *attP1* et *attP2* par réaction de BP clonase. Ce vecteur donneur contient également un gène de résistance à la kanamycine (Km^R), ainsi qu'un second au chloramphénicol (Cm^R) inséré entre les 2 sites *attP*. Les enzymes de la BP clonase reconnaissent de manière spécifique les sites *attB* et *attP*, ce qui conduit à l'insertion du gène d'intérêt dans le vecteur donneur. Il se forme alors par cette réaction un *vecteur d'entrée* possédant le gène de résistance à la kanamycine (Km^R), les sites de recombinaison homologue *AttL1* et *AttL2*, et le gène d'intérêt.

Le *vecteur d'entrée* est utilisé pour obtenir l'ensemble des *vecteurs d'expression* à partir de vecteurs pDEST, qui contiennent un gène encodant un des 6 partenaires de fusion, un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R), et les sites de recombinaison *attR1* et *attR2*. Le gène d'intérêt est « transféré » du v*ecteur d'entrée* au *vecteur d'expression* de manière unidirectionnelle grâce aux enzymes de la LR clonase qui reconnaissent les sites *attL* et *attR*

de manière spécifique. Au final, ces plasmides d'expression comportent, un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R), une étiquette 6xHis, un gène encodant un des 6 partenaires de fusion, le gène d'intérêt, et un site de clivage par la TEV inséré entre le partenaire et le gène d'intérêt.

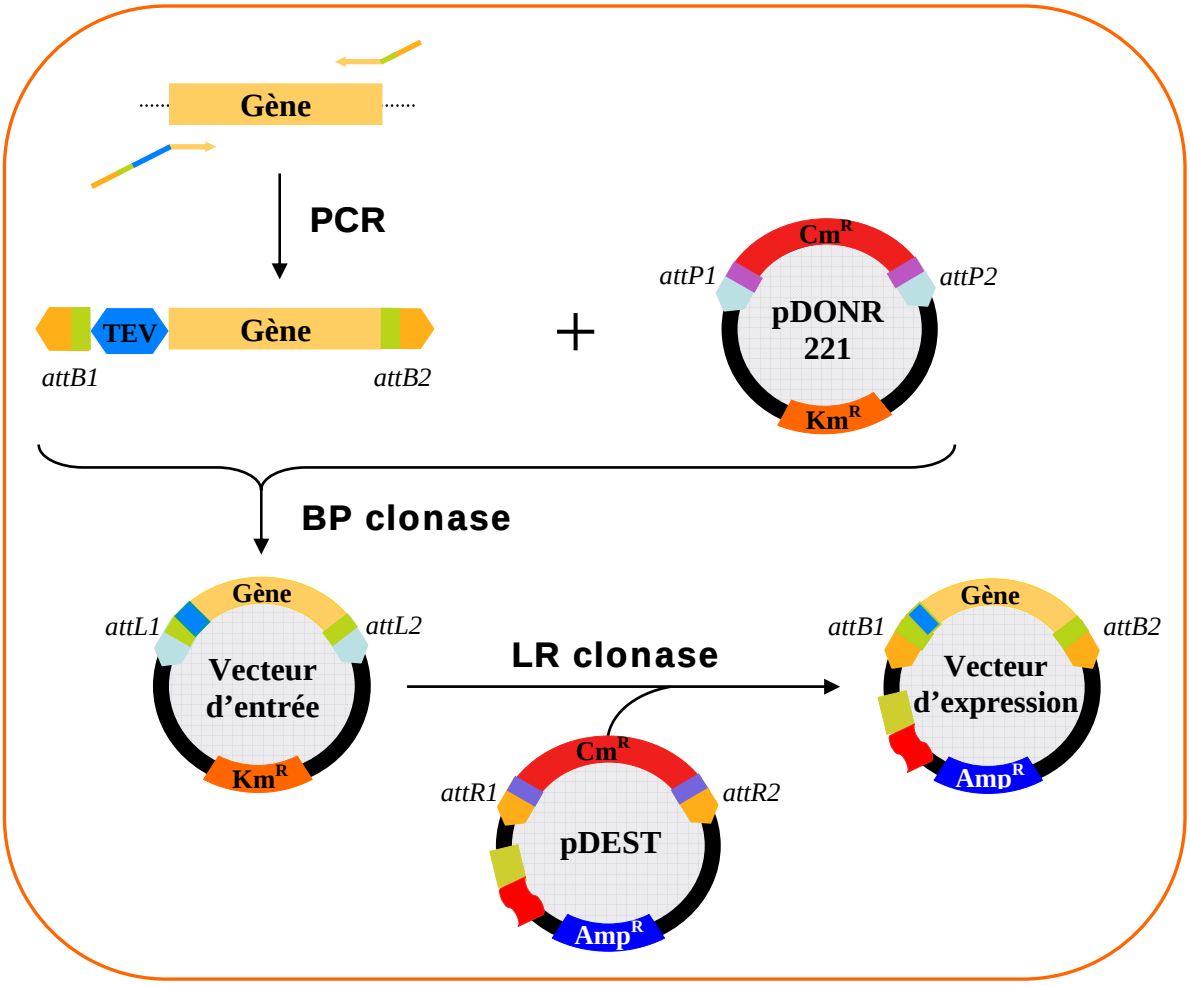


***Figure A1** : Résumé des principales étapes de la construction des vecteurs d'expression à partir de la technique de clonage par recombinaison homologue Gateway.*

1.1.2) PCR d'assemblage

Outre l'amplification des gènes d'intérêt, la PCR d'assemblage a pour objectif d'adjoindre, un site de reconnaissance *AttB1* et un site de clivage reconnu par la TEV en amont du gène, et un site de reconnaissance *AttB2* et une étiquette Tag-S en aval du gène. Le Tag-S encode un fragment protéique qui permet de détecter l'expression des protéines de fusion par un test de fluorescence. Dans le cas des domaines PRODH, ce test, qui était en cours de mise au point, n'a pas été utilisé et l'expression des protéines hétérologues a été uniquement analysée sur gel SDS-PAGE.

L'introduction de longues séquences de nucléotides non spécifiques du gène en amont et en aval des gènes d'intérêt (respectivement 57 et 60 bp) nécessite de réaliser 2 réactions de PCR successives. La première PCR (PCR1) fait intervenir une amorce sens spécifique du gène contenant le site de clivage par la TEV et une partie du site *attB1*, ainsi qu'une amorce anti-sens complémentaire à la fin du gène comportant l'étiquette Tag-S. L'ensemble des amorces utilisées pour amplifier les gènes encodant les domaines PRODH est reporté dans le Tableau A1.

PCR	*Amorces*		*Séquences*
PCR1	PROentier	S	5′-GGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGGACATTTTGTAGCCGGGGAG-3′
		AS	5′-TTAGCTGTCCATGTGTTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTCTTTCTAGGC AGGGCGATGGAAGAGGTT-3′
	PROcatal	S	5′-GGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGGACATTTTGTAGCCGGGGAG-3′
		AS	5′-TTAGCTGTCCATGTGTTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTCTTTCTAGGC AGGGCGATGGAAGAGGTT-3′
	Proter	S	5′-GGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGGAGGAGGGTCGGCAACGGCAGTG-3′
		AS	5′-TTAGCTGTCCATGTGTTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTCTTTCTAGGA CTCGTGGTCTTCCCCGGC-3′
	Proinser	S	5′-GGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGGGAGACCACAGTTTCTGCTGCAG-3′
		AS	5′-TTAGCTGTCCATGTGTTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTCTTTCTACTC CTCCTCCTCAGTGAACCCGGA-3′
PCR2	AttB1-TEV-S		5′-GGGGGGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAGAATCTTTATTTTCAG GGC-3′
	AttB2-TagS-AS		5′-GGGGGGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTAACTGTCCATGTGCTG GCGTTCGAA-3′

***Tableau A1** : Amorces sens (S) et anti-sens (AS) utilisées pour les PCR d'assemblage. Les oligonucléotides qui apparaissent en orange correspondent au site de recombinaison AttB1, en bleu au site de clivage par la TEV, en violet au Tag-S, et en rouge au site de reconnaissance AttB2.*

Les mélanges réactionnels se composent de 12 ng de vecteur de départ contenant le gène d'intérêt, 0.1 mM de dNTP, 0.4 µM d'amorce sens, 0.4 µM d'amorce anti-sens, 4.5 unités de polymérase, et 5µL de tampon *Pfu* 10X dans un volume final de 50 µL complété avec de l'eau milliQ. L'enzyme utilisée est la *Pfu DNA polymerase* commercialisée par Promega. Ces mélanges sont introduits dans des barrettes de 16 tubes PCR de 250 µL (Promega) et traités en parallèle avec des pipettes multicanaux. Les conditions de PCR utilisées sont : un cycle de dénaturation thermique (2 min à 94°C), suivi de 30 cycles de PCR (45 sec à 94°C, 45 sec à 50°C, et 4 min 30 à 72°C), puis 10 min d'élongation finale à 72°C. Les produits de PCR1 sont purifiés sur gel avec le kit *QIAquick purification* (Qiagen), et quantifiés sur gel d'agarose.

La seconde PCR (PCR2) utilise une amorce sens non spécifique du gène qui adjoint la région N-terminale du site *attB1* en amont du site de clivage par la TEV. L'amorce anti-sens est également non spécifique du gène et permet d'insérer le site de reconnaissance *attB2* en aval

du Tag-S. La composition des mélanges réactionnels et les conditions de PCR sont identiques à celles utilisées pour la PCR1. Environ 5 ng de produit de PCR1 purifié servent de matrice. La purification et la quantification des produits de PCR2 se font de la même manière que pour la PCR1.

1.1.3) Construction des *vecteurs d'entrée*

Les produits de PCR2, contenant les gènes d'intérêt flanqués des sites *AttB*, sont clonés dans le vecteur donneur pDONR 221 par réaction de BP clonase. Les réactifs utilisés, ainsi que le protocole original, sont fournis par Invitrogen. Le mélange réactionnel est composé de 1 µL de *Clonase Reaction Buffer* 5X, 150 ng de vecteur pDONR 221 (1 µL), 1 µL de tampon Tris-EDTA (Tris 10mM à pH 8.0 et EDTA 1mM), 1 µL de produit de PCR2, et 1 µL de mélange enzymatique BP clonase. L'ensemble est incubé 3 heures à 25°C, puis traité à la protéinase K (0.4 µg/µL) pendant 10 min à 37°C afin de stopper la réaction. 50 µL de bactéries thermocompétentes DH5α sont transformées par le produit de réaction BP clonase par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Le produit de transformation est étalé sur boîte LB/agar contenant 50 µg/mL de kanamycine, puis incubé à 37°C pendant toute une nuit. Le lendemain, une dizaine de colonies sont repiquées sur milieu LB/agar/kanamycine, puis une PCR sur colonie est réalisée sur chacun des clones en utilisant une amorce sens (M13) s'hybridant sur le plasmide, et une amorce anti-sens s'hybridant sur le gène d'intérêt. Les colonies, conduisant après PCR à une bande unique dont la taille apparente correspond à la taille moléculaire attendue, sont mises en culture dans du LB à 37°C. Les *vecteurs d'entrée* sont alors extraits et purifiés avec le kit *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega). Les produits de ces minipréparations sont finalement séquencés sur appareil *310 Genetic Analyser* (ABI Prism, Applied Biosystems).

1.1.4) Construction des *vecteurs d'expression*

Les 7 plasmides de type pDEST possèdent un gène encodant un partenaire de fusion en aval de l'étiquette 6xHis, à l'exception du vecteur pDEST-17 (Invitrogen) qui ne contient pas de partenaire. La formation des vecteurs d'expression est réalisée en mélangeant 1.8 µL de *vecteur d'entrée* (300 ng), 1.2 µL de chacun des vecteurs pDEST (100 à 300 ng), 1 µL de *Clonase Reaction Buffer* 5X, et 1 µL de mélange enzymatique LR clonase. L'incubation dure 5 heures à température ambiante, puis la protéinase K est ajoutée (0.4 µg/µL). La transformation des bactéries DH5α thermocompétentes est alors menée comme

précédemment par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. L'analyse des transformants se fait d'une part, par PCR sur colonie en utilisant une amorce sens spécifique du promoteur T7, et une amorce anti-sens spécifique du site *AttB2*. D'autre part, un repiquage sur milieu LB/agarose-kanamycine, -chloramphénicol, et -ampicilline, permet de vérifier le profil de résistance des vecteurs d'expression. Seules les colonies qui présentent une résistance unique à l'ampicilline sont sélectionnées puis stockées à -80°C avec du glycérol.

1.2) Criblage des conditions d'expression en microplaque

Le criblage des conditions d'expression des domaines PRODH sur microplaques 96 puits (Falcon) a été réalisé en suivant les protocoles mis au point par les chercheurs du LMP dans le cadre de la plate-forme 3PM (une microplaque par souche et par température).

1.2.1) Transformation des souches d'*E. coli* et préparation des précultures

Pour chaque puits, 50 µL de bactéries thermocompétentes sont transformées par 20 ng de *vecteur d'expression* par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Après ajout de 200 µL de milieu SOC, les microplaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Chaque puits est alors doté des antibiotiques appropriés (Ampicilline à 100 µg/mL pour la sélection des plasmides d'expression, et chloramphénicol à 35 µg/mL uniquement pour la souche Rosetta pLysS), et les plaques sont incubées sur la nuit à 37°C sous une agitation de 250 rpm. On peut ainsi noter que les cultures de transformation servent également de préculture.

1.2.2) Cultures d'expression

Les cultures d'expression, contenant 240 µL de LB et les antibiotiques appropriés, sont ensemencées avec un volume de préculture de manière à obtenir une DO_{600} initiale de 0.05 (utilisation du lecteur de microplaques *ELX 800 Universal Microplate Reader* de la société Bio-Teck Instruments). La croissance est maintenue sous agitation (1000 rpm) à 37°C jusqu'à une DO_{600} de 1.2 pour une induction à 20°C, et de 0.4 à 0.6 pour une induction à 37°C (0.4 pour les BL21 Star, 0.5 pour les C41, et 0.6 pour les Rosetta). Les souches C41 et Rosetta sont induites avec 1mM d'IPTG, et la souche BL21 Star avec 0.5 mM d'IPTG. L'induction est alors prolongée pendant 3 heures à 37°C, ou sur la nuit à 20°C sous une agitation de 1000 rpm. La croissance bactérienne est alors stoppée par centrifugation à 2830xg et à 4°C pendant 20 minutes.

1.2.3) Lyse des bactéries et séparation des fractions soluble et insoluble

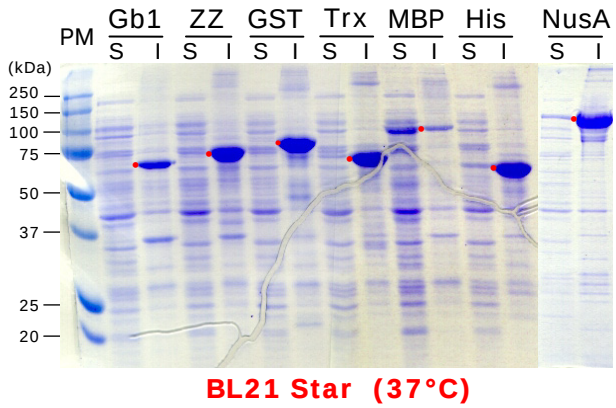
Les culots bactériens sont lysés par reprise dans 50 µL de tampon de lyse contenant, 100 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM de NaCl, 0.1 % de Triton X-100, 1 µM de phosphoramidon, et 1 mM de PMSF. 0.04 µg/mL de lysozyme (Sigma) sont ensuite ajoutés, et les microplaques sont mises à incuber sous agitation modérée à 4°C pendant 1 heure. La lyse de l'ADN est initiée en ajoutant 0.125 U/µL de benzonase (Merck) et 10 mM de $MgCl_2$. Les microplaques sont alors incubées à température ambiante pendant 10 minutes sous légère agitation. Les fractions soluble et insoluble sont séparées par centrifugation à 2830xg pendant 1 heure 30 à 4°C. L'expression des protéines de fusion est analysée sur gel SDS-PAGE. 10 µL de chaque échantillon sont dilués dans du « bleu de charge » réducteur 2X [Tris-Hcl 62.5 mM pH 6.8, bleu de bromophénol 0.02 % (w/v), SDS 2 % (v/v), β-mercaptoéthanol 280 mM, glycérol 20 % (v/v)], avant de subir une dénaturation thermique à 100°C pendant 5 minutes. 10 µL sont finalement déposés sur gel de polyacrylamide (8 à 12 %).

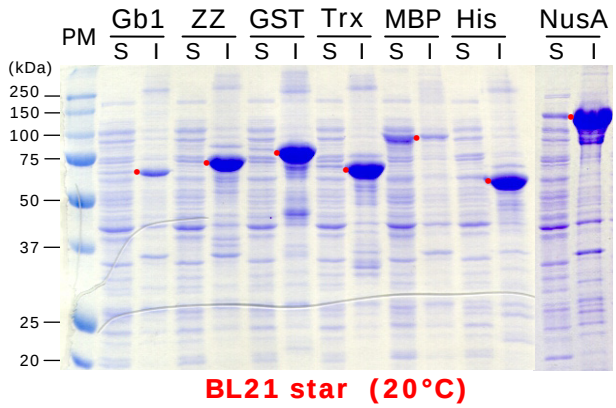
2) Résultats

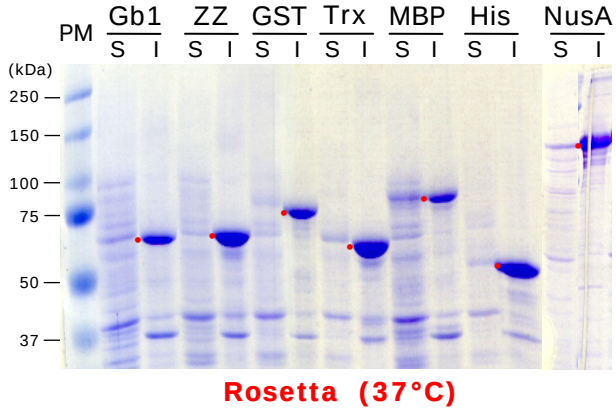
Comme je l'ai exposé dans le chapitre 4 de la première partie de ce manuscrit (cf. § 2.2.2), les domaines PROcatal et PROentier ont été exprimés dans 28 conditions expérimentales différentes (7 partenaires de fusion, 2 souches d'expression, et 2 températures), contre 42 conditions pour les domaines PROter et PROinser (7 partenaires, 3 souches, et 2 températures). Pour chaque condition testée, les fractions contenant les protéines solubles et insolubles ont été déposées sur gel SDS-PAGE. L'analyse de l'expression des protéines de fusion à partir de l'interprétation des profils électrophorétiques des gels SDS-PAGE est reportée, domaine par domaine, dans un tableau récapitulatif (Figures A2 à A5).

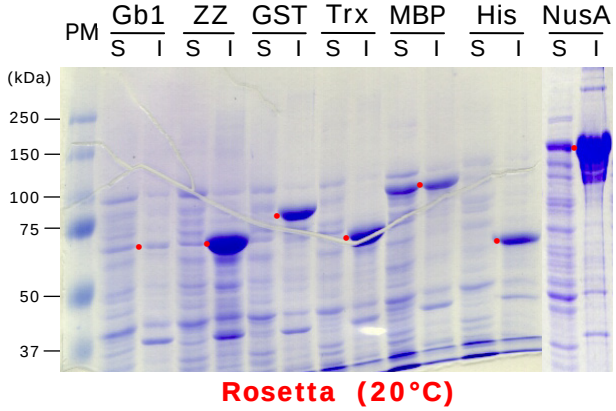
2.1) Le domaine PROcatal

Que ce soit en souche BL21 Star ou Rosetta, les protéines de fusion PROcatal sont globalement bien exprimées, et ceci avec l'ensemble des partenaires de fusion (Figure A2). Seule la construction avec Gb1 conduit à une expression faible, voire nulle en souche Rosetta et à 20°C. Cependant, ces bons résultats en terme d'expression ne sont pas associés à de bons profils de solubilité. En effet, on constate que la majorité des protéines hétérologues PROcatal sont exprimées dans la fraction insoluble. C'est le cas notamment pour les constructions avec ZZ et la GST, ainsi que pour les fusions Gb1, Trx, et His, qui conduisent toutefois dans certaines conditions à une expression soluble très minoritaire.









PROcatal	Gb1		ZZ		GST		Trx		MBP		His		NusA	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
BL21 Star 37°C	-	++(+)	-	+++(+)	-	+++(+)	+	+++(+)	+(+)	+	-	+++(+)	+(+)	++++
BL21 Star 20°C	+	++	-	++++	-	++++	+	++++	+(+)	+	-	++++	+(+)	++++
Rosetta 37°C	-	++	-	+++	+/-	++(+)	+	+++(+)	+	++	+	+++	+(+)	+++(+)
Rosetta 20°C	+/-	+/-	-	++++	-	+++	-	+++(+)	++(+)	++	-	++(+)	++	++++

Figure A2 *: Analyse de l'expression et de la solubilité des protéines de fusion PROcatal dans 28 conditions expérimentales différentes.*

Les points rouges sur les gels SDS-PAGE correspondent aux masses attendues des protéines de fusion. Après dépôt des fractions soluble (S) et insoluble (I), chaque bande de surexpression est analysée, et une valeur semi-quantitative est associée à son intensité, de faible (+) à très forte (++++). Les fractions non lisibles sont annotées du sigle NL, et les fractions se confondant aux protéines intrinsèques à E. coli et constituant un doute, sont associées au sigle +/-. Les notations surlignées en couleur mettent en évidence les meilleures conditions d'expression et de solubilité : couleur orange pour la meilleure condition, et couleur jaune pour la deuxième meilleure condition.

De manière plus intéressante, on retrouve ce profil d'expression pour la construction PROcatal fusionnée avec le partenaire NusA. L'expression dans la fraction insoluble y est très intense, mais contrairement aux autres protéines de fusion, le taux d'expression de protéines solubles est significatif, et notamment en souche Rosetta cultivée à 20°C.

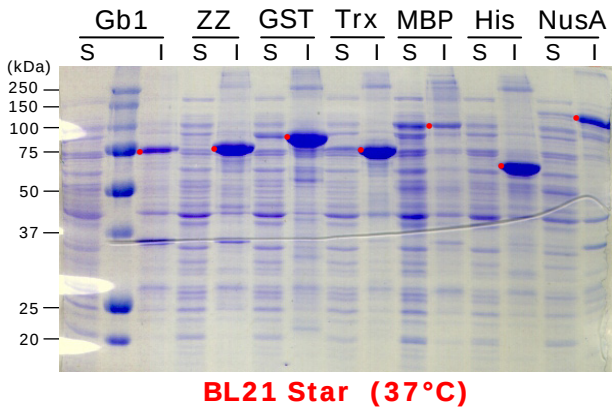
Le meilleur résultat en terme d'expression de protéines solubles PROcatal est obtenu avec le partenaire MBP en souche Rosetta cultivée à 20°C. La combinaison de ces trois conditions permet en effet d'obtenir une bonne expression avec un taux de protéines solubles tout à fait satisfaisant.

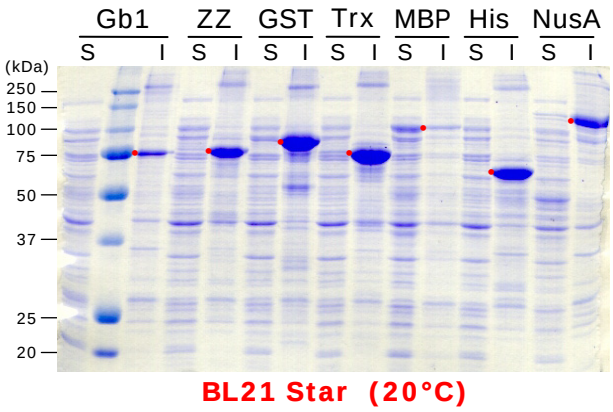
Au final, il apparaît que la nature du partenaire de fusion joue un rôle primordial sur la solubilité des protéines hétérologues PROcatal. L'influence de la souche bactérienne et de la température d'expression semble à première vue moins prononcée, mais elle est flagrante lorsque PROcatal est exprimée en fusion avec NusA et MBP. Ainsi, l'association souche Rosetta-température d'expression de 20°C se démarque nettement des autres conditions dans la mesure où elle permet d'améliorer sensiblement le profil de solubilité des constructions avec NusA et MBP.

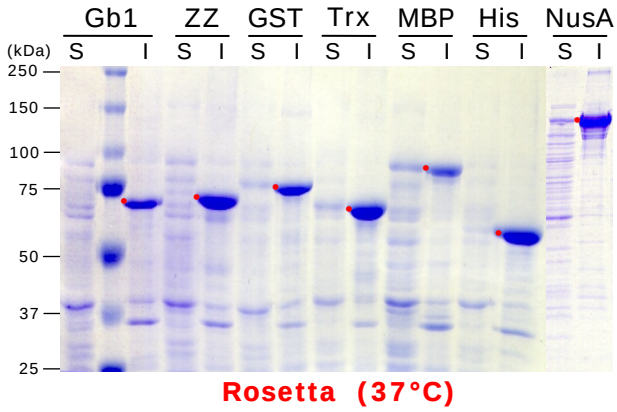
2.2) La protéine PROentier

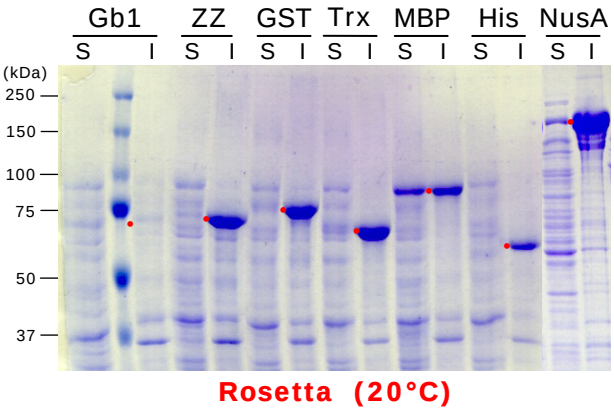
PROentier est constitué à 86 % des acides aminés du domaine PROcatal et de manière intéressante, on constate que le profil d'expression des protéines de fusion PROentier est similaire à celui des protéines hétérologues PROcatal, voire identique dans certaines conditions. Ainsi, le meilleur résultat, en termes d'expression et de solubilité, est obtenu avec le partenaire MBP en souche Rosetta cultivée à 20°C.

Comme le met en évidence la Figure A3, la nature du partenaire de fusion semble jouer un rôle essentiel sur l'expression et la solubilité des protéines hétérologues PROentier : les constructions avec His, Gb1, ZZ, Trx, et GST conduisent à une expression quasi exclusive de protéines insolubles ; et même si pour Trx, on retrouve systématiquement une expression très faible dans la fraction soluble, seules les constructions avec MBP et NusA permettent, dans certains cas, d'observer une expression suffisante de protéines solubles.









PROentier	Gb1		ZZ		GST		Trx		MBP		His		NusA	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
BL21 Star 37°C	-	++(+)	-	+++(+)	+	+++(+)	+	+++(+)	+	+	-	+++(+)	+	+++
BL21 Star 20°C	-	+(+)	+	++(+)	+/-	++++	+	++++	+	+	-	+++(+)	+	+++(+)
Rosetta 37°C	-	++	+/-	+++	-	++(+)	+	+++(+)	+	++	+	+++	+	+++(+)
Rosetta 20°C	+/-	+/-	-	+++(+)	-	+++	+	+++	++	++	-	++	+(+)	++++

***Figure A3** : Analyse de l'expression et de la solubilité des protéines de fusion PROentier dans 28 conditions expérimentales différentes.*

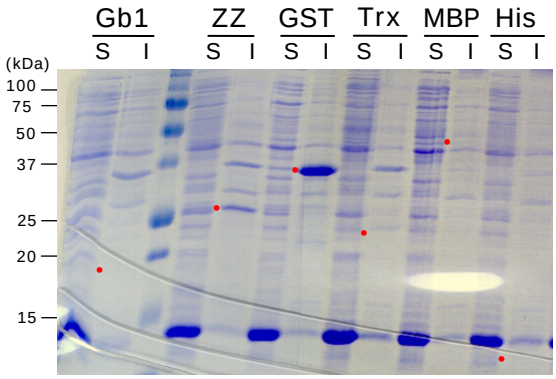
Comme précédemment, les résultats du criblage des conditions d'expression des protéines de fusion PROentier ne mettent en évidence aucun effet direct de la souche bactérienne ou de la température d'expression sur l'expression et la solubilité des protéines de fusion recombinantes. Cependant, on retrouve pour les constructions avec MBP et NusA, un effet souche couplé à un effet température qui met une nouvelle fois en valeur le pouvoir de solubilisation de la combinaison souche Rosetta-température d'expression de 20°C.

2.3) Le domaine PROter

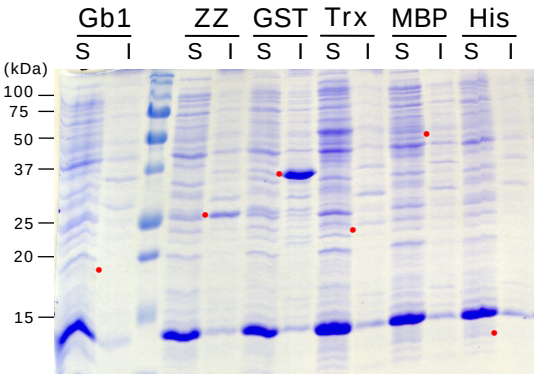
L'expression des protéines de fusion PROter n'a été initialement testée qu'en souches BL21 Star et Rosetta. Comme le montrent les gels SDS-PAGE et le tableau d'analyse de la Figure A4, la majorité de ces protéines hétérologues ne s'expriment pas dans ces deux souches ; ou l'expression est si faible qu'elle n'est pas décelable sur gel SDS-PAGE. C'est le cas notamment des constructions avec Gb1, Trx, MBP, et His. Pour PROter en fusion avec le partenaire ZZ, une expression faible est observable dans la fraction insoluble, mais uniquement en souche BL21 Star. Seule la construction avec GST s'exprime dans les deux souches. Cette expression est exclusivement insoluble, sauf en BL21 Star cultivée à 20°C où une bande de faible intensité apparaît dans la fraction soluble.

En ce qui concerne la construction avec NusA, nous avons rencontré des difficultés lors de l'étape de transformation des BL21 Star par le plasmide d'expression. En effet, malgré plusieurs essais, nous n'avons pas été en mesure de transformer cette souche par notre vecteur d'intérêt. Ce problème ne s'est pas posé avec la souche Rosetta, et contrairement aux autres protéines de fusion, les taux d'expression obtenus à 37°C et 20°C avec NusA sont significatifs dans les fractions soluble et insoluble.

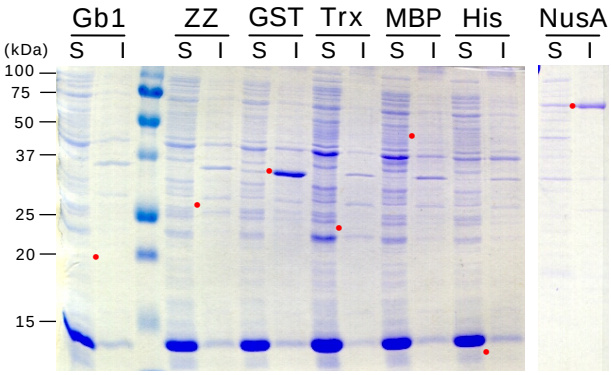
De manière intéressante, nous avons constaté que la transformation des souches par les vecteurs d'expression *PROter* induit une diminution importante de la croissance bactérienne après induction par l'IPTG. Cette baisse de la vitesse de croissance associée à une expression réduite de la plupart des protéines de fusion est tout à fait caractéristique de protéines hétérogènes toxiques. Par conséquent, il nous est apparu nécessaire de tester l'expression des protéines de fusion PROter en souche C41 qui est adaptée à la production de ce type de protéines.



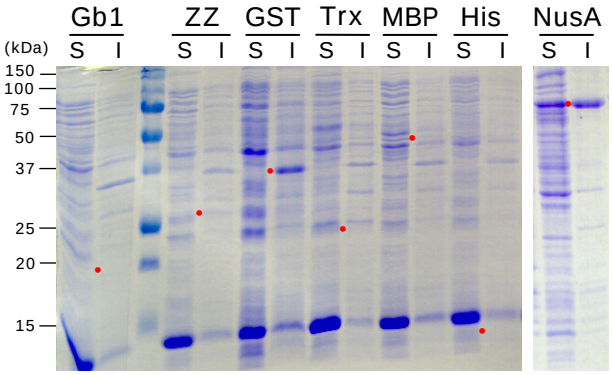
BL21 Star (37°C)



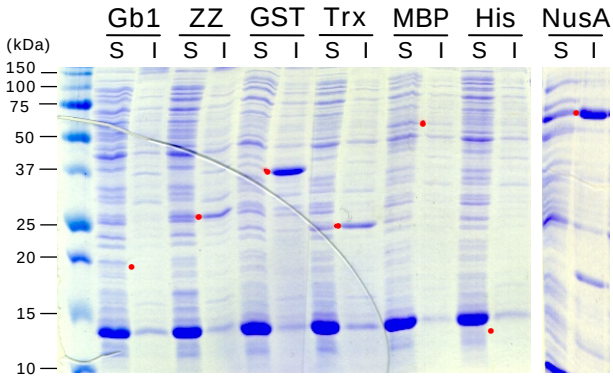
BL21 Star (20°C)



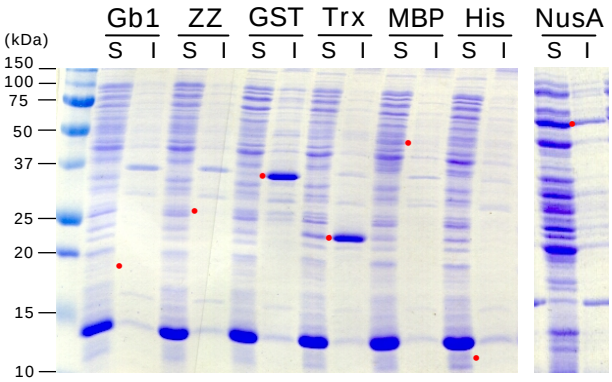
Rosetta (37°C)



Rosetta (20°C)



C41 (37°C)



C41 (20°C)

PROter	Gb1		ZZ		GST		Trx		MBP		His		NusA	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
BL21 Star 37°C	-	-	+/-	+	+/-	+++	-	-	-	-	-	-	ND	ND
BL21 Star 20°C	-	-	+/-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Rosetta 37°C	-	-	-	-	+/-	++(+)	-	-	-	-	-	-	+	+(+)
Rosetta 20°C	-	-	-	-	-	+(+)	-	-	-	-	-	-	++	++
C41 37°C	-	-	+/-	+	+	++(+)	+/-	++	+	+/-	-	-	+(+)	++(+)
C41 20°C	-	-	-	-	+/-	++(+)	+	++(+)	+/-	-	-	-	+(+)	+(+)

***Figure A4** : Analyse de l'expression et de la solubilité des protéines de fusion PROter dans 42 conditions expérimentales différentes.*

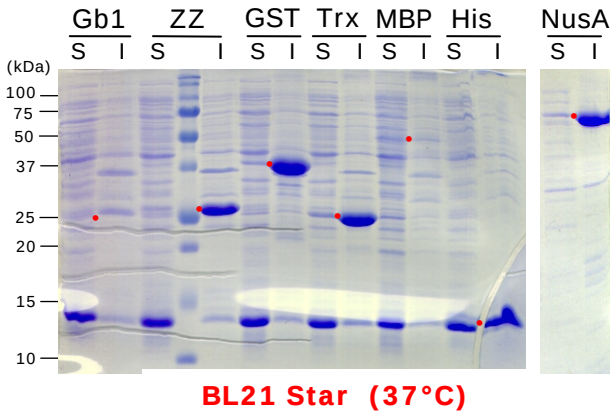
Comme le met en évidence la Figure A4, on constate que la souche C41 apporte une amélioration significative des taux d'expression des protéines hétérologues PROter. Ainsi, alors qu'en souches BL21 Star et Rosetta l'expression des constructions Trx et MBP n'était pas détectable, des bandes de surexpression sont observables en C41 pour ces deux constructions, et notamment pour le partenaire Trx où l'effet souche est assez spectaculaire. En revanche, la production de PROter en fusion avec Gb1 et His n'est toujours pas détectable en souche C41. En ce qui concerne les constructions avec ZZ et GST, les profils d'expression obtenus en souche C41 sont comparables à ceux obtenus avec les deux autres souches.

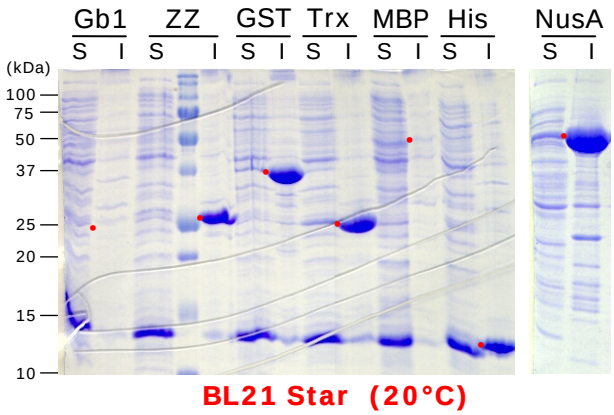
Au vu de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la nature du partenaire de fusion et de la souche bactérienne est déterminante pour l'expression et la solubilité des protéines hétérologues PROter. En effet, seule la construction avec NusA permet d'obtenir une expression suffisante de protéines solubles en souches Rosetta ou C41. L'influence de la température semble plus limitée, mais comme observé précédemment, l'association souche Rosetta-température de 20°C combinée à un partenaire de fusion efficace conduit aux meilleurs taux d'expression de protéine soluble.

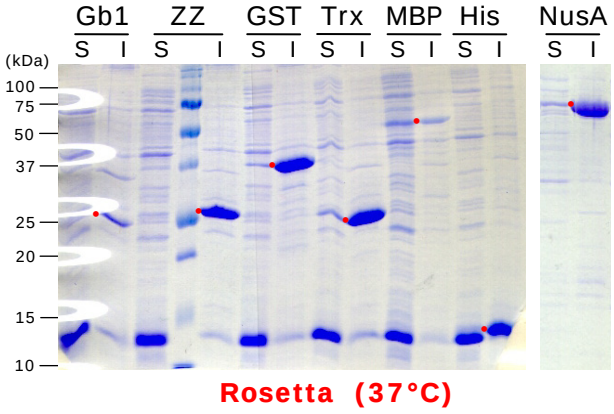
2.4) Le domaine PROinser

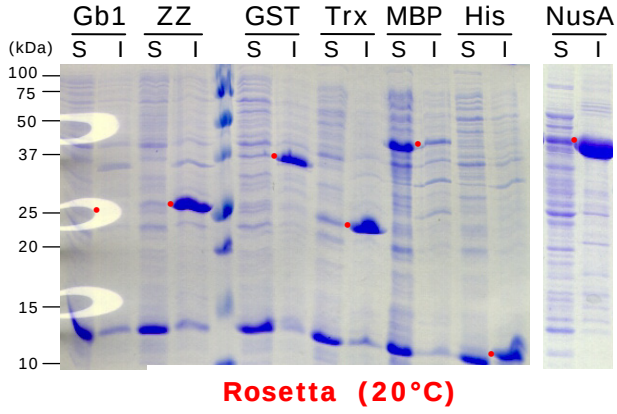
Les protéines hétérologues PROinser présentent un profil d'expression qui ressemble davantage à celui des protéines de fusion PROcatal et PROentier, plutôt qu'à celui des protéines PROter. Ainsi, le meilleur résultat est obtenu avec le partenaire MBP en souche Rosetta cultivée à 20°C avec un taux d'expression de protéines solubles tout à fait satisfaisant.

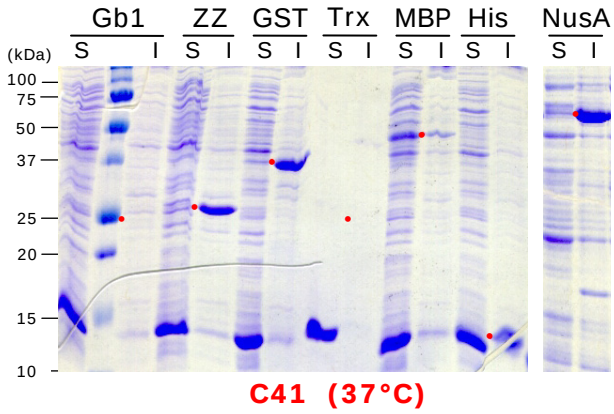
Comme le montre la Figure A5, les niveaux d'expression obtenus sont très élevés pour l'ensemble des partenaires de fusion, à l'exception de la construction avec Gb1, qui est peu ou non exprimée. Cependant, cette production est majoritairement insoluble pour la plupart des partenaires de fusion : c'est le cas notamment pour His, GST, Trx, et ZZ. Aussi, dans le cas de GST et Trx, une faible expression est presque systématiquement observable dans la fraction soluble. A l'instar des 3 autres domaines PRODH, seules les constructions avec MBP et NusA conduisent à une production significative dans la fraction soluble.

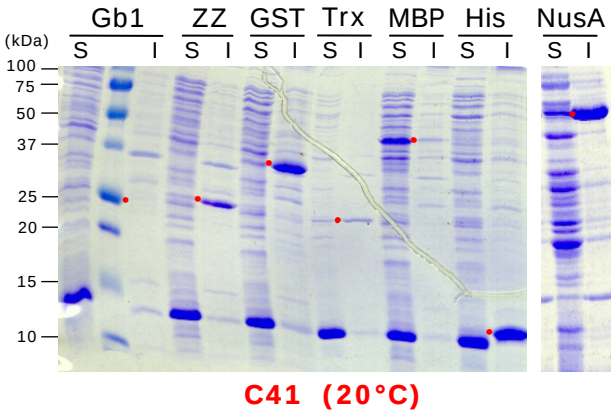












PROinser	Gb1		ZZ		GST		Trx		MBP		His		NusA	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
BL21 Star 37°C	-	+/-	+/-	+++(+)	+	++++	+	++++	+	+	+/-	+++	+(+)	+++(+)
BL21 Star 20°C	-	-	-	+++	+	++++	+	+++	+	+	+/-	++(+)	+(+)	++++
Rosetta 37°C	-	+	-	+++	+	+++(+)	+	+++(+)	+(+)	+(+)	+/-	++(+)	+(+)	+++(+)
Rosetta 20°C	-	-	+/-	+++	+	+++	+	+++	++(+)	+	+/-	+++	+(+)	++++
C41 37°C	-	-	+/-	+++	+/-	+++	ND	ND	++	+(+)	-	+++	+/-	+++
C41 20°C	-	-	+	++(+)	+	+++	+	+	++	+	-	+++(+)	+(+)	+++(+)

***Figure A5** : Analyse de l'expression et de la solubilité des protéines de fusion PROinser dans 42 conditions expérimentales différentes.*

L'analyse du criblage des conditions d'expression de PROinser met donc une nouvelle fois en évidence le rôle essentiel du partenaire de fusion sur la solubilité des protéines hétérologues. Aussi, contrairement aux résultats obtenus avec les autres domaines PRODH, il est plus difficile de mettre en évidence un effet direct de la souche bactérienne ou de la température sur l'expression et la solubilité des protéines de fusion PROinser. Dans le cas de la construction avec MBP, on constate toutefois que la souche Rosetta donne de meilleurs résultats que les souches BL21 Star et C41. Par ailleurs, même si un effet solubilisant de l'association souche Rosetta-température de 20°C est observé pour la construction avec MBP, ce dernier ne se retrouve pas pour la construction avec NusA.

Références Bibliographiques

Adams, E. & Frank, L. (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu Rev Biochem*, **49**, 1005-1061.

Allen, M., Friedler, A., Schon, O. & Bycroft, M. (2002) The structure of an FF domain from human HYPA/FBP11. *J Mol Biol*, **323**, 411-416.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Gold, L.S. (1993) DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, **101 Suppl 5**, 35-44.

Angulo, J.F., Rouer, E., Mazin, A., Mattei, M.G., Tissier, A., Horellou, P., Benarous, R. & Devoret, R. (1991) Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5117-5123.

Arfken, G. (1985) The method of Steepest Descents. *Mathematical Methods for Physicists, 3rd ed.*, **Orlando, FL: Academic Press**, 428-436.

Athanasiadis, A., Placido, D., Maas, S., Brown, B.A., 2nd, Lowenhaupt, K. & Rich, A. (2005) The crystal structure of the Zbeta domain of the RNA-editing enzyme ADAR1 reveals distinct conserved surfaces among Z-domains. *J Mol Biol*, **351**, 496-507.

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems : application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 10037-10041.

Bannai, H., Inenaga, S., Shinohara, A., Takeda, M. & Miyano, S. (2002) A string pattern regression algorithm and its application to pattern discovery in long introns. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, **13**, 3-11.

Becker, D.F. & Thomas, E.A. (2001) Redox properties of the PutA protein from Escherichia coli and the influence of the flavin redox state on PutA-DNA interactions. *Biochemistry*, **40**, 4714-4721.

Biard, D.S., Miccoli, L., Despras, E., Frobert, Y., Creminon, C. & Angulo, J.F. (2002) Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. *J Biol Chem*, **277**, 19156-19165.

Blum, A. & Ebercon, A. (1976) Genotypic responses in sorghum to drought stress. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Sci*, **16**, 428-431.

Bohm, S., Frishman, D. & Mewes, H.W. (1997) Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2464-2469.

Bondy, S.C. & Naderi, S. (1994) Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*, **48**, 155-159.

Braud, S., Moutiez, M., Belin, P., Abello, N., Drevet, P., Zinn-Justin, S., Courcon, M., Masson, C., Dassa, J., Charbonnier, J.B., Boulain, J.C., Menez, A., Genet, R. & Gondry, M. (2005) Dual expression system suitable for high-throughput fluorescence-based screening and production of soluble proteins. *J Proteome Res*, **4**, 2137-2147.

Brennan, R.G. & Matthews, B.W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem*, **264**, 1903-1906.

Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplys, M. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem*, **4**, 187-217.

Brosemer, R.W. & Veerabhadrappa, P.S. (1965) Pathway of proline oxidation in insect flight muscle. *Biochim Biophys Acta*, **110**, 102-112.

Brown, E.D. & Wood, J.M. (1992) Redesigned purification yields a fully functional PutA protein dimer from Escherichia coli. *J Biol Chem*, **267**, 13086-13092.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905-921.

Brünger, A.T. (1992). *X-PLOR Manual Version 3.1*, **Yale University New Haven, Connecticut.**

Brunner, G. & Neupert, W. (1969) Localisation of proline oxidase and Delta-pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase in rat liver. *FEBS Lett*, **3**, 283-286.

Campbell, H.D., Webb, G.C. & Young, I.G. (1997) A human homologue of the Drosophila melanogaster sluggish-A (proline oxidase) gene maps to 22q11.2, and is a candidate gene for type-I hyperprolinaemia. *Hum Genet*, **101**, 69-74.

Carlier, L., le Maire, A., Braud, S., Masson, C., Gondry, M., Zinn-Justin, S., Guilhaudis, L., Milazzo, I., Davoust, D., Gilquin, B. & Couprie, J. (2006) NMR Assignment of Region 51-160 of Human KIN17, a DNA and RNA-binding Protein. *J Biomol NMR*.

Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G. & Skelton, N.J. (1996). *NMR Spectroscopy. Principles and Practice*, **London 1996, Academic Press**.

Chakravarti, A. (2002) A compelling genetic hypothesis for a complex disease: PRODH2/DGCR6 variation leads to schizophrenia susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4755-4756.

Chen, C.C., Tsuchiya, T., Yamane, Y., Wood, J.M. & Wilson, T.H. (1985) Na+ (Li+)-proline cotransport in Escherichia coli. *J Membr Biol*, **84**, 157-164.

Clark, E.D. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*, **12**, 202-207.

Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E. & Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364**, 412-420.

Claros, M.G. & Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, **241**, 779-786.

Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1991) Two-, three-, and four- dimensional NMR methods for obtaining larger and more precise three-dimensional structures of proteins in solution. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **20**, 29-63.

Cook, W.J., Kar, S.R., Taylor, K.B. & Hall, L.M. (1998) Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J Mol Biol*, **275**, 337-346.

Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR*, **13**, 289-302.

De Silva, R.S., Kovacikova, G., Lin, W., Taylor, R.K., Skorupski, K. & Kull, F.J. (2005) Crystal structure of the virulence gene activator AphA from Vibrio cholerae reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily. *J Biol Chem*, **280**, 13779-13783.

Dillon, E.L., Knabe, D.A. & Wu, G. (1999) Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol*, **276**, G1079-1086.

Dong, G., Chakshusmathi, G., Wolin, S.L. & Reinisch, K.M. (2004) Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *Embo J*, **23**, 1000-1007.

Efron, M.L. (1965) Familial Hyperprolinemia. Report of a Second Case, Associated with Congenital Renal Malformations, Hereditary Hematuria and Mild Mental Retardation, with Demonstration of an Enzyme Defect. *N Engl J Med*, **272**, 1243-1254.

Elantak, L., Ansaldi, M., Guerlesquin, F., Mejean, V. & Morelli, X. (2005) Structural and genetic analyses reveal a key role in prophage excision for the TorI response regulator inhibitor. *J Biol Chem*, **280**, 36802-36808.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, **300**, 1005-1016.

Emanuelsson, O., von Heijne, G. & Schneider, G. (2001) Analysis and prediction of mitochondrial targeting peptides. *Methods Cell Biol*, **65**, 175-187.

Englander, S.W., Downer, N.W. & Teitelbaum, H. (1972) Hydrogen exchange. *Annu Rev Biochem*, **41**, 903-924.

Erecinska, M. (1965) Ubiquinone in proline oxidation. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **158**, 209-215.

Fan, J.B., Ma, J., Zhang, C.S., Tang, J.X., Gu, N.F., Feng, G.Y., St Clair, D. & He, L. (2003) A family-based association study of T1945C polymorphism in the proline dehydrogenase gene and schizophrenia in the Chinese population. *Neurosci Lett*, **338**, 252-254.

Farrow, N.A., Zhang, O., Forman-Kay, J.D. & Kay, L.E. (1994) A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of 15N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium. *J Biomol NMR*, **4**, 727-734.

Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. & Bateman, A. (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res*, **34**, D247-251.

Friedberg, E.C. (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 22-33.

Frishman, D. & Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*, **23**, 566-579.

Gajiwala, K.S. & Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 110-116.

Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B. & Burley, S.K. (2000) Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, **403**, 916-921.

Garcia-Castellanos, R., Mallorqui-Fernandez, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M. & Gomis-Ruth, F.X. (2004) On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. *J Biol Chem*, **279**, 17888-17896.

Georgiou, G. & Valax, P. (1999) Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol*, **309**, 48-58.

Gogos, J.A., Santha, M., Takacs, Z., Beck, K.D., Luine, V., Lucas, L.R., Nadler, J.V. & Karayiorgou, M. (1999) The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet*, **21**, 434-439.

Grzesiek, S. & Bax, A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly 13C/15N-enriched proteins. *J Biomol NMR*, **3**, 185-204.

Gu, D., Zhou, Y., Kallhoff, V., Baban, B., Tanner, J.J. & Becker, D.F. (2004) Identification and characterization of the DNA-binding domain of the multifunctional PutA flavoenzyme. *J Biol Chem*, **279**, 31171-31176.

Hagedorn, C.H. & Phang, J.M. (1983) Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys*, **225**, 95-101.

Hagedorn, C.H. & Phang, J.M. (1986) Catalytic transfer of hydride ions from NADPH to oxygen by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys*, **248**, 166-174.

Hagedorn, C.H., Yeh, G.C. & Phang, J.M. (1982) Transfer of 1-pyrroline-5-carboxylate as oxidizing potential from hepatocytes to erythrocytes. *Biochem J*, **202**, 31-39.

Hammarstrom, M., Hellgren, N., van Den Berg, S., Berglund, H. & Hard, T. (2002) Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in Escherichia coli. *Protein Sci*, **11**, 313-321.

Hayward, D.C., Delaney, S.J., Campbell, H.D., Ghysen, A., Benzer, S., Kasprzak, A.B., Cotsell, J.N., Young, I.G. & Miklos, G.L. (1993) The sluggish-A gene of Drosophila melanogaster is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2979-2983.

Herbert, A., Lowenhaupt, K., Spitzner, J. & Rich, A. (1995) Chicken double-stranded RNA adenosine deaminase has apparent specificity for Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7550-7554.

Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-374.

Hoffmann, M.H. & Vadstrup, S. (2000) [DiGeorge syndrome. Velocardiofacial syndrome/chromosome 22q11 deletion syndrome]. *Ugeskr Laeger*, **162**, 2736-2739.

Holden, J.S. (1973) Free amino acid levels in the cockroach, Periplaneta americana. *J Physiol*, **232**, 61P-62P.

Holm, L. & Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol*, **233**, 123-138.

Hong-qi, Z., Croes, A.F. & Linskens, H.F. (1982) Protein synthesis in germinating pollen of Petunia: role of proline. *Planta*, **154**, 199-203

Huffman, J.L. & Brennan, R.G. (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 98-106.

Humbertclaude, V., Rivier, F., Roubertie, A., Echenne, B., Bellet, H., Vallat, C. & Morin, D. (2001) Is hyperprolinemia type I actually a benign trait? Report of a case with severe neurologic involvement and vigabatrin intolerance. *J Child Neurol*, **16**, 622-623.

Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1994) A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci*, **3**, 2207-2216.

Hutchinson, F. (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **32**, 115-154.

Jacquet, H., Berthelot, J., Bonnemains, C., Simard, G., Saugier-Veber, P., Raux, G., Campion, D., Bonneau, D. & Frebourg, T. (2003) The severe form of type I hyperprolinaemia results from homozygous inactivation of the PRODH gene. *J Med Genet*, **40**, e7.

Jacquet, H., Raux, G., Thibaut, F., Hecketsweiler, B., Houy, E., Demilly, C., Haouzir, S., Allio, G., Fouldrin, G., Drouin, V., Bou, J., Petit, M., Campion, D. & Frebourg, T. (2002) PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet*, **11**, 2243-2249.

Jansson, M., Li, Y.C., Jendeberg, L., Anderson, S., Montelione, B.T. & Nilsson, B. (1996) High-level production of uniformly 15N- and 13C-enriched fusion proteins in Escherichia coli. *J Biomol NMR*, **7**, 131-141.

Jeggo, P.A. (1998) DNA breakage and repair. *Adv Genet*, **38**, 185-218.

Jin, C., Marsden, I., Chen, X. & Liao, X. (1999) Dynamic DNA contacts observed in the NMR structure of winged helix protein-DNA complex. *J Mol Biol*, **289**, 683-690.

Johnson, A.B. & Strecker, H.J. (1962) The interconversion of glutamic acid and proline. IV. The oxidation of proline by rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, **237**, 1876-1882.

Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.A. & Stahl, S. (2002) Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. *Biotechnol Appl Biochem*, **35**, 91-105.

Kanelis, V., Forman-Kay, J.D. & Kay, L.E. (2001) Multidimensional NMR methods for protein structure determination. *IUBMB Life*, **52**, 291-302.

Kannouche, P., Mauffrey, P., Pinon-Lataillade, G., Mattei, M.G., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L. & Angulo, J.F. (2000) Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. *Carcinogenesis*, **21**, 1701-1710.

Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Mauffrey, P., Faucher, C., Biard, D.S. & Angulo, J.F. (1997) Overexpression of kin17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells. *Biochimie*, **79**, 599-606.

Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Tissier, A., Chevalier-Lagente, O., Sarasin, A., Mezzina, M. & Angulo, J.F. (1998) The nuclear concentration of kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis*, **19**, 781-789.

Kapust, R.B. & Waugh, D.S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, **8**, 1668-1674.

Karplus, M. & Grant, D.M. (1959) A Criterion for Orbital Hybridization and Charge Distribution in Chemical Bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **45**, 1269-1273.

Kay, L.E., Torchia, D.A. & Bax, A. (1989) Backbone dynamics of protein as studied by 15N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy : application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, **28**, 8972-8979.

Kay, L.E., Xu, G.Y., Singer, A.U., Muhandiram, D.R. & Forman-Kay, J.D. (1993) A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ^{1}H and ^{13}C Correlations in H_2O Samples of Proteins. *J Magn Reson B*, **101**, 333-337

Khanna, K.K. & Jackson, S.P. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, **27**, 247-254.

Kielkopf, C.L., Lucke, S. & Green, M.R. (2004) U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev*, **18**, 1513-1526.

Kowaloff, E.M., Phang, J.M., Granger, A.S. & Downing, S.J. (1977) Regulation of proline oxidase activity by lactate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5368-5371.

Kramar, R. (1967) Studies on the proline oxidase complex. *Enzymologia*, **33**, 33-37.

Kurumizaka, H., Aihara, H., Ikawa, S., Kashima, T., Bazemore, L.R., Kawasaki, K., Sarai, A., Radding, C.M. & Shibata, T. (1996) A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein. A gateway model for double-stranded DNA binding. *J Biol Chem*, **271**, 33515-33524.

Kyrpides, N.C., Woese, C.R. & Ouzounis, C.A. (1996) KOW: a novel motif linking a bacterial transcription factor with ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, **21**, 425-426.

Landy, A. (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, **58**, 913-949.

Laskowski, R.A., Rullmannn, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R. & Thornton, J.M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, **8**, 477-486.

Lee, Y.H., Nadaraia, S., Gu, D., Becker, D.F. & Tanner, J.J. (2003) Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. *Nat Struct Biol*, **10**, 109-114.

Lindahl, T. (1974) An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 3649-3653.

Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.

Littlefield, O. & Nelson, H.C. (1999) A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocrystal. *Nat Struct Biol*, **6**, 464-470.

Liu, H., Heath, S.C., Sobin, C., Roos, J.L., Galke, B.L., Blundell, M.L., Lenane, M., Robertson, B., Wijsman, E.M., Rapoport, J.L., Gogos, J.A. & Karayiorgou, M. (2002) Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3717-3722.

Logan, T.M., Olejniczak, E.T., Xu, R.X. & Fesik, S.W. (1993) A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments. *J Biomol NMR*, **3**, 225-231.

Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A. & Dreyfus, M. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol*, **33**, 188-199.

Majumdar, A., Wang, H., Morsauher, R.C. & Zuiderweg E.R.P. (1993) Sensitivity improvement in 2D and 3D HCCH spctroscopy using heteronuclear cross-polarization. *J Biomol NMR*, **3**, 387-397.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual*, **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory**.

Marion, D., Kay, L.E., Sparks, S.W., Torchia, D.A. & Bax, A. (1989) Three-dimensional heteronuclear NMR of 15N labeled proteins. *J Am Chem Soc*, **111**, 1515-1517.

Marsden, I., Chen, Y., Jin, C. & Liao, X. (1997) Evidence that the DNA binding specificity of winged helix proteins is mediated by a structural change in the amino acid sequence adjacent to the principal DNA binding helix. *Biochemistry*, **36**, 13248-13255.

Marti, T.M., Kunz, C. & Fleck, O. (2002) DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol*, **191**, 28-41.

Masson, C., Menaa, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Chevillard, S., Radicella, J.P., Sarasin, A. & Angulo, J.F. (2003) Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 616-621.

Maynard, T.M., Haskell, G.T., Peters, A.Z., Sikich, L., Lieberman, J.A. & LaMantia, A.S. (2003) A comprehensive analysis of 22q11 gene expression in the developing and adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14433-14438.

Mazin, A., Timchenko, T., Menissier-de Murcia, J., Schreiber, V., Angulo, J.F., de Murcia, G. & Devoret, R. (1994) Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4335-4341.

McGuffin, P., Asherson, P., Owen, M. & Farmer, A. (1994) The strength of the genetic effect. Is there room for an environmental influence in the aetiology of schizophrenia? *Br J Psychiatry*, **164**, 593-599.

Menzel, R. & Roth, J. (1981) Purification of the putA gene product. A bifunctional membrane-bound protein from Salmonella typhimurium responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. *J Biol Chem*, **256**, 9755-9761.

Mer, G., Bochkarev, A., Gupta, R., Bochkareva, E., Frappier, L., Ingles, C.J., Edwards, A.M. & Chazin, W.J. (2000) Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA. *Cell*, **103**, 449-456.

Miccoli, L., Biard, D.S., Creminon, C. & Angulo, J.F. (2002) Human kin17 protein directly interacts with the simian virus 40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res*, **62**, 5425-5435.

Miccoli, L., Frouin, I., Novac, O., Di Paola, D., Harper, F., Zannis-Hadjopoulos, M., Maga, G., Biard, D.S. & Angulo, J.F. (2005) The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Mol Cell Biol*, **25**, 3814-3830.

Murphy, K.C. (2002) Schizophrenia and velo-cardio-facial syndrome. *Lancet*, **359**, 426-430.

Murphy, K.C., Jones, L.A. & Owen, M.J. (1999) High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry*, **56**, 940-945.

Nakai, K. & Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, **24**, 34-36.

Nguyen, B.D., Abbott, K.L., Potempa, K., Kobor, M.S., Archambault, J., Greenblatt, J., Legault, P. & Omichinski, J.G. (2003) NMR structure of a complex containing the TFIIF subunit RAP74 and the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain phosphatase FCP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5688-5693.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, **10**, 1-6.

Nilges, M. (1995) Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol*, **245**, 645-660.

Nilges, M., Macias, M.J., O'Donoghue, S.I. & Oschkinat, H. (1997) Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. *J Mol Biol*, **269**, 408-422.

Nishikawa, J., Amano, M., Fukue, Y., Tanaka, S., Kishi, H., Hirota, Y., Yoda, K. & Ohyama, T. (2003) Left-handedly curved DNA regulates accessibility to cis-DNA elements in chromatin. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6651-6662.

Okuda, M., Watanabe, Y., Okamura, H., Hanaoka, F., Ohkuma, Y. & Nishimura, Y. (2000) Structure of the central core domain of TFIIEbeta with a novel double-stranded DNA-binding surface. *Embo J*, **19**, 1346-1356.

Ostrovsky de Spicer, P., O'Brien, K. & Maloy, S. (1991) Regulation of proline utilization in Salmonella typhimurium: a membrane-associated dehydrogenase binds DNA in vitro. *J Bacteriol*, **173**, 211-219.

Ostrovsky, P.C. & Maloy, S. (1995) Protein phosphorylation on serine, threonine, and tyrosine residues modulates membrane-protein interactions and transcriptional regulation in Salmonella typhimurium. *Genes Dev*, **9**, 2034-2041.

Pardi, A., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1984) Calibration of the angular dependence of the amide proton-C alpha proton coupling constants, 3JHN alpha, in a globular protein. Use of 3JHN alpha for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol*, **180**, 741-751.

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wuthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12366-12371.

Pfanner, N. & Neupert, W. (1990) The mitochondrial protein import apparatus. *Annu Rev Biochem*, **59**, 331-353.

Phang, J.M. (1985) The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr Top Cell Regul*, **25**, 91-132.

Pinon-Lataillade, G., Masson, C., Bernardino-Sgherri, J., Henriot, V., Mauffrey, P., Frobert, Y., Araneda, S. & Angulo, J.F. (2004) KIN17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. *J Cell Sci*, **117**, 3691-3702.

Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol*, **47**, 903-915.

Ponting, C.P. (2002) Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3643-3652.

Powell, M.J.D. (1977) Restart procedures of the conjugate gradient method. *Math Program*, **2**, 241-254.

Ramachandran, G.N., Chandrasekaran, R. & Kopple, K.D. (1971) Variation of the NH-C alpha-H coupling constant with dihedral angle in the NMR spectra of peptides. *Biopolymers*, **10**, 2113-2131.

Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I. & Mann, M. (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res*, **12**, 1231-1245.

Redfield, A.G., McIntosh, L.P. & Dahlquist, F.W. (1989) Use of 13C and 15N isotope labels for proton nuclear magnetic resonance and nuclear Overhauser effect. Structural and dynamic studies of larger proteins and nucleic acids. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*, **22**, 129-137.

Reilly, D. & Fairbrother, W.J. (1994) A novel isotope labeling protocol for bacterially expressed proteins. *J Biomol NMR*, **4**, 459-462.

Safo, M.K., Zhao, Q., Ko, T.P., Musayev, F.N., Robinson, H., Scarsdale, N., Wang, A.H. & Archer, G.L. (2005) Crystal structures of the BlaI repressor from Staphylococcus aureus and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the bla and mec operons. *J Bacteriol*, **187**, 1833-1844.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, **73**, 39-85.

Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution. *Prog Nucl Mag Res Sp*, **34**, 93-158.

Savarin, P., Zinn-Justin, S. & Gilquin, B. (2001) Variability in automated assignment of NOESY spectra and three-dimensional structure determination: a test case on three small disulfide-bonded proteins. *J Biomol NMR*, **19**, 49-62.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-5864.

Schwartz, T., Rould, M.A., Lowenhaupt, K., Herbert, A. & Rich, A. (1999) Crystal structure of the Zalpha domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*, **284**, 1841-1845.

Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U. & Sattler, M. (2001) SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol*, **8**, 27-31.

Selmer, M. & Su, X.D. (2002) Crystal structure of an mRNA-binding fragment of Moorella thermoacetica elongation factor SelB. *Embo J*, **21**, 4145-4153.

Singleton, M.R., Morales, R., Grainge, I., Cook, N., Isupov, M.N. & Wigley, D.B. (2004) Conformational changes induced by nucleotide binding in Cdc6/ORC from Aeropyrum pernix. *J Mol Biol*, **343**, 547-557.

Small, I., Peeters, N., Legeai, F. & Lurin, C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, **4**, 1581-1590.

Smith, L.J., Bolin, K.A., Schwalbe, H., MacArthur, M.W., Thornton, J.M. & Dobson, C.M. (1996) Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations. *J Mol Biol*, **255**, 494-506.

Strecker, H.J. (1960) The interconversion of glutamic acid and proline. II. The preparation and properties of delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid. *J Biol Chem*, **235**, 2045-2050.

Surber, M.W. & Maloy, S. (1999) Regulation of flavin dehydrogenase compartmentalization: requirements for PutA-membrane association in Salmonella typhimurium. *Biochim Biophys Acta*, **1421**, 5-18.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. & Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, **33**, 25-35.

Timchenko, T., Bailone, A. & Devoret, R. (1996) Btcd, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in Escherichia coli for H-NS, a bacterial nucleoid protein. *Embo J*, **15**, 3986-3992.

Tissier, A., Kannouche, P., Biard, D.S., Timchenko, T., Mazin, A., Araneda, S., Allemand, I., Mauffrey, P., Frelat, G. & Angulo, J.F. (1995) The mouse Kin-17 gene codes for a new protein involved in DNA transactions and is akin to the bacterial RecA protein. *Biochimie*, **77**, 854-860.

Tugarinov, V., Hwang, P.M. & Kay, L.E. (2004) Nuclear magnetic resonance spectroscopy of high-molecular-weight proteins. *Annu Rev Biochem*, **73**, 107-146.

Tusnady, G.E. & Simon, I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol*, **283**, 489-506.

Vallee, B.L. & Auld, D.S. (1995) Zinc metallochemistry in biochemistry. *Exs*, **73**, 259-277.

Van Melckebeke, H., Vreuls, C., Gans, P., Filée, P., Llabres, G., Joris, B. & Simorre, J.P. (2003) Solution structural study of BlaI: implications for the repression of genes involved in β-Lactam antibiotic resistance. *J Mol Biol*, **333**, 711-720.

Venyaminov, S.Y. & Yang, J.T. (1996) Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. **Plenum Press, New York, 1996**.

Verbruggen, N., Hua, X.J., May, M. & Van Montagu, M. (1996) Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8787-8791.

Verlet, L. (1967) Computer experiments on classical fluids. Part I. *Phys Rev*, **159**, 98-103.

Vincentelli, R., Bignon, C., Gruez, A., Canaan, S., Sulzenbacher, G., Tegoni, M., Campanacci, V. & Cambillau, C. (2003) Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization. *Acc Chem Res*, **36**, 165-172.

Vuister, G.W. & Bax, A. (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond $J(H_NH_\alpha)$ coupling constants in ^{15}N-enriched proteins. *J Am Chem Soc*, **115**, 7772-7777.

Wakasugi, M. & Sancar, A. (1999) Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*, **274**, 18759-18768.

Wang, S.S. & Brandriss, M.C. (1986) Proline utilization in Saccharomyces cerevisiae: analysis of the cloned PUT1 gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 2638-2645.

Williams, D.C., Jr., Cai, M., Suh, J.Y., Peterkofsky, A. & Clore, G.M. (2005) Solution NMR structure of the 48-kDa IIAMannose-HPr complex of the Escherichia coli mannose phosphotransferase system. *J Biol Chem*, **280**, 20775-20784.

Williams, H.J., Williams, N., Spurlock, G., Norton, N., Zammit, S., Kirov, G., Owen, M.J. & O'Donovan, M.C. (2003) Detailed analysis of PRODH and PsPRODH reveals no association with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **120**, 42-46.

Wishart, D.S. & Sykes, B.D. (1994) The 13C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using 13C chemical-shift data. *J Biomol NMR*, **4**, 171-180.

Wishart, D.S., Sykes, B.D. & Richards, F.M. (1992) The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **31**, 1647-1651.

Wojciak, J.M., Iwahara, J. & Clubb, R.T. (2001) The Mu repressor-DNA complex contains an immobilized 'wing' within the minor groove. *Nat Struct Biol*, **8**, 84-90.

Wood, J.M. (1987) Membrane association of proline dehydrogenase in Escherichia coli is redox dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 373-377.

Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, **New York, John Wiley & Sons**.

Xu, R., Ayers, B., Cowburn, D. & Muir, T.W. (1999) Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 388-393.

Yang, J.T., Wu, C.S. & Martinez, H.M. (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol*, **130**, 208-269.

Yeldandi, A.V., Rao, M.S. & Reddy, J.K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, **448**, 159-177.

Yoshizawa, S., Rasubala, L., Ose, T., Kohda, D., Fourmy, D. & Maenaka, K. (2005) Structural basis for mRNA recognition by elongation factor SelB. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 198-203.

Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C.O. & Pavletich, N.P. (1999) Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev*, **13**, 666-674.

Zhu, W. & Becker, D.F. (2003) Flavin redox state triggers conformational changes in the PutA protein from Escherichia coli. *Biochemistry*, **42**, 5469-5477.

Zimmerman, D.E., Kulikowski, C.A., Huang, Y., Feng, W., Tashiro, M., Shimotakahara, S., Chien, C., Powers, R. & Montelione, G.T. (1997) Automated analysis of protein NMR assignments using methods from artificial intelligence. *J Mol Biol*, **269**, 592-610.

Résumé

Le maintien de l'intégrité du patrimoine génétique est essentiel à la survie des organismes vivants. Face aux nombreuses sources de stress génotoxiques qui induisent des dommages de l'ADN, les cellules ont mis en place des mécanismes complexes capables de détecter et réparer ces lésions. Parmi ces sources, figurent les rayonnements ultraviolets (UV) contenus dans la lumière solaire, qui modifient la structure de l'ADN et peuvent conduire à l'introduction de mutations. Chez l'homme, la grande majorité des dommages de l'ADN produits par les rayonnements est éliminée par le système NER (*Nucleotide Excision Repair*), un système capable d'exciser les nucléotides lésés et de les remplacer. Une déficience de cette voie de réparation peut mener à l'apoptose (mort programmée des cellules), et augmente la susceptibilité de développer des maladies graves telles que le cancer. Le système NER met en œuvre de nombreuses protéines impliquées dans des mécanismes variés tels que la détection, la signalisation, ou la réparation de l'ADN. La protéine eucaryote KIN17, récemment découverte dans le noyau de la cellule humaine, semble appartenir à ce système de réparation. Cependant, son rôle précis dans la réponse aux dommages de l'ADN reste à ce jour inconnu. C'est pourquoi, nous avons entrepris une caractérisation structurale et fonctionnelle de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine (domaine K2) afin d'améliorer la connaissance de ses fonctions, de ses partenaires biologiques, et de ses modes de fonctionnement.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à la préparation de l'échantillon de protéine en vue d'une analyse structurale par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Le travail a dans un premier temps consisté à choisir et optimiser le système d'expression de domaines structuraux d'une autre protéine : la proline déshydrogénase PRODH.

Dans un second temps, la meilleure stratégie de préparation de l'échantillon a été appliquée à la protéine KIN17 pour produire, puis résoudre la structure tridimensionnelle du domaine K2 par RMN et Modélisation Moléculaire. Nous avons montré que la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine adopte un repliement caractéristique de la famille structurale « *Winged Helix* » des protéines de liaison aux acides nucléiques. Cependant, l'analyse des détails structuraux du domaine K2, la comparaison avec des protéines de fonction connue de la même classe structurale, et des études électrophorétiques, révèlent l'incapacité de ce domaine à lier l'ADN et l'ARN de manière autonome. En revanche, nous avons mis en évidence, par une étude RMN complémentaire, l'existence d'une surface ultra conservée impliquée dans des interactions de type protéine-protéine intra-moléculaires entre le motif « *Winged Helix* » de la région 51-160 et la région N-terminale 1-50 de KIN17 humaine.