

UNIVERSITÉ DE PROVENCE (AIX-MARSEILLE I)

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PROVENCE
(Mention : Chimie Informatique, Spectrométrie et Analyse)

École Doctorale : Sciences Chimiques de Marseille (ED 250)

**Étude des transitions structurales des protéines flexibles par
marquage de spin suivi par spectroscopie de Résonance
Paramagnétique Électronique (RPE)**

Soutenance prévue

le 08 décembre 2011

par

Magali LORENZI

Jury :

Mme. Valérie BELLE (Co-Directrice de thèse)
Mr. Pierre DORLET (Rapporteur)
Mr. Bruno GUIGLIARELLI (Directeur de thèse)
Mr. Bruno KIEFFER (Examinateur)
Mr. Gilles TRUAN (Rapporteur)
Mme. Béatrice TUCCIO-LAURICELLA (Examinateur)

Thèse préparée dans l'Unité de
Bioénergétique et Ingénierie des Protéines
Au sein de l'équipe
Biophysique des Métalloprotéines – UPR 9036 CNRS

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Flexibilité et dynamique structurale des protéines.....	5
1.1 <i>Importance de la flexibilité structurale des protéines</i>	6
1.1.1 Architecture des protéines	6
1.1.2 La flexibilité des protéines	8
A. La flexibilité d'une protéine et la thermodynamique.....	9
B. Flexibilité et interaction protéine-protéine/ligand.....	10
C. Flexibilité et fonction protéique	11
1.2 <i>Les protéines intrinsèquement désordonnées (PID)</i>	12
1.2.1 Le dogme de la relation structure-fonction et la découverte des PID	12
1.2.2 Caractéristiques des PID et classification	13
1.2.3 Les différentes fonctions des PID.....	16
1.2.4 Interactions protéine-protéine chez les PID	17
1.3 <i>Techniques expérimentales pour étudier la flexibilité structurale des protéines.....</i>	18
1.3.1 La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	18
1.3.2 Le Dichroïsme Circulaire (CD)	20
1.3.3 La spectroscopie de Fluorescence	24
1.3.4 La Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)	26
1.3.5 Méthodes pour accéder à la taille et à la forme des protéines.....	28
A. La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	28
B. La diffusion statique (SLS) ou dynamique de la lumière (DLS)	29
C. La chromatographie par filtration sur gel.....	31
D. L'ultracentrifugation analytique	33
Chapitre 2 : Sondes paramagnétiques et spectroscopie RPE : le marquage de spin.....	35
2.1 <i>Spectroscopie RPE des radicaux nitroxydes.....</i>	36
2.1.1 Spectre RPE d'un centre isotrope ($S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$)	36
2.1.2 Spectre RPE d'un centre anisotrope ($S = \frac{1}{2}$, $I = 1$).....	38
2.1.3 Influence de la mobilité du radical nitroxyde sur le spectre RPE	40
2.1.4 Mobilité des marqueurs de spin greffés sur des protéines.....	41
A. Principe du marquage de spin	41
B. Caractérisation de la mobilité.....	42
C. Analyse de la mobilité.....	43
2.1.5 Influence des agents relaxants sur les sondes paramagnétiques	44

2.1.6 Influence de l'interaction dipolaire.....	45
A. Analyse en onde continue	45
B. Analyse en RPE impulsionnelle	46
2.2 Utilisations de ces sondes paramagnétiques : quelques exemples	47
2.2.1 Changements conformationnels d'une protéine	47
2.2.2 Interaction protéine-protéine ou protéine-ligand.....	49
2.2.3 Mesure de distances entre deux centres paramagnétiques	52
2.2.4 Etude de deux cas particuliers	53
A. Le lysozyme T4	53
B. La rhodopsine.....	54
Chapitre 3 : Matériels et Méthodes.....	56
3.1 Purification de la CP12 et de son partenaire la GAPDH.....	57
3.1.1 Préparation de la CP12 et de ses mutants.....	57
3.1.2 Préparation de la GAPDH.....	57
3.2 Purification de NarJ et synthèse de son peptide partenaire.....	58
3.2.1 Obtention de NarJ et de ses différents mutants	58
3.2.2 Synthèse des différents peptides.....	59
3.3 Dosage de la concentration des protéines	59
3.3.1 La méthode de Bradford	59
3.3.2 Détermination de la concentration en protéines par la technique de Lowry.....	60
3.4 Contrôle des propriétés biochimiques et biophysiques des protéines.....	60
3.4.1 Mesure d'activité enzymatique de la GAPDH.....	60
3.4.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes (gel SDS-PAGE)	61
3.4.3 Electrophorèse en conditions natives.....	61
3.4.4 Immunoempreinte (luminol ou phosphatase)	61
3.4.5 Dichroïsme Circulaire (CD)	62
3.4.6 Fluorescence	62
3.5 Marquage des protéines sur les résidus cystéines.....	63
3.5.1 Réduction des cystéines.....	63
3.5.2 Marquage au MTSL ou au Proxyl	64
3.6 Marquage des protéines sur les résidus tyrosines.....	65
3.7 Quantification.....	66
3.8 Acquisition des spectres RPE.....	68
3.8.1 Température ambiante.....	68
3.8.2 Basse température en onde continue	69
3.8.3 Basse température en onde impulsionnelle.....	69
3.9 Traitement des spectres enregistrés à température ambiante.....	70

3.9.1 Paramètres semi quantitatifs.....	70
3.9.2 Simulation des spectres	70
<i>3.10 Vérification du marquage des protéines par spectrométrie de masse</i>	<i>71</i>
3.10.1 Masse globale	72
3.10.2 Digestion trypsique	72
Chapitre 4 : Interaction de la protéine chaperone NarJ et de l'extrémité N-terminal de la sous-unité catalytique NarG de la nitrate réductase A d'<i>Escherichia coli</i>	73
<i>4.1 Contexte actuel de la protéine NarJ d'<i>Escherichia coli</i></i>	<i>74</i>
4.1.1 La nitrate réductase A.....	74
4.1.2 NarJ, une protéine chaperon multifonctionnelle	75
4.1.3 Changement conformationnel global de NarJ lors de son interaction avec le peptide de NarG.....	78
<i>4.2 Etude de la flexibilité de NarJ</i>	<i>81</i>
4.2.1 Choix des sites de marquage	81
4.2.2 Contrôle des formes mutées et marquées de NarJ	83
A. Structure secondaire des protéines révélée par CD.....	83
B. Correcte fixation du peptide malgré la mutation et le marquage de NarJ	83
4.2.3 Marquage de NarJ entier et analyse des formes spectrales	84
A. Le domaine C-terminal : une région désordonnée.....	84
B. La présence du peptide n'induit pas de structuration de la partie C-terminale ...	85
C. Analyse du désordre du domaine C-terminal par simulation.....	86
4.2.4 Localisation du site d'interaction et mise en évidence du caractère flexible de la protéine.....	87
A. Différentes mobilités du radical nitroxyde selon le site de marquage de NarJT... ..	87
B. Effet du partenaire : localisation du site d'interaction.....	88
C. Simulation des spectres RPE	89
<i>4.3 Double mutant NarJ-H21C/Q104C : Influence du partenaire sur l'organisation structurale de la protéine à proximité de la cavité.....</i>	<i>91</i>
4.3.1 Contrôle par spectroscopie CD et fluorescence	91
4.3.2 Détermination de la proportion relative de marquage sur chaque site	92
4.3.3 Analyse du mutant H21C [*] /Q104C [*] en présence du peptide partenaire en RPE à onde continue	94
A. Etude à température ambiante	94
B. Eloignement des marqueurs en présence de peptide vu par RPE à basse température	95
4.3.4 Mesure de distance : ouverture au niveau de la crevasse de NarJT lors de l'interaction.....	96
<i>4.4 Marquage de différents peptides mutés</i>	<i>97</i>
4.4.1 Pas d'effet de la mutation sur les peptides	97

4.4.2	Un protocole de marquage à améliorer	98
4.4.3	Modifications spectrales pour un peptide.....	101
4.5	<i>Discussion</i>	103
Chapitre 5 : Le complexe CP12/GAPDH chez l'algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ...108		
5.1	<i>Le complexe CP12/GAPDH/PRK dans le cycle de Calvin</i>	109
5.1.1	Le cycle de Calvin-Benson-Bassham	109
5.1.2	Le complexe PRK/CP12/GAPDH.....	111
5.1.3	La CP12 au sein du complexe PRK/CP12/GAPDH	112
5.1.4	La CP12 : une protéine partiellement désordonnée	112
5.1.5	La GAPDH	113
5.1.6	Site d'interaction entre la CP12 et la GAPDH de <i>C. reinhardtii</i>	116
5.2	<i>Etude de la CP12 marquée avec la sonde MTSL - Effet de son partenaire la GAPDH.</i> .	117
5.2.1	Une protéine doublement marquée et déstructurée	117
5.2.2	Etude de la CP12 marquée.....	118
5.2.3	Caractérisation d'une nouvelle fonction de la GAPDH.....	121
5.2.4	Discussion.....	128
5.3	<i>Une stratégie alternative pour le marquage de la CP12 : la Tyrosine comme site de greffage</i>	130
5.3.1	Réaction de type Mannich	131
5.3.2	Essai concluant sur la tyrosine estérifiée.....	133
5.3.3	Marquage de la CP12	134
5.3.4	Détermination du site de greffage par Spectrométrie de Masse.....	135
5.3.5	Etude structurale globale de la CP12 marquée	137
A.	Gel en condition dénaturante.....	137
B.	Dichroïsme circulaire (CD)	138
5.3.6	Activité de la GAPDH en présence de la CP12 marquée avec ANINO	139
5.3.7	Etude de l'interaction CP12 ^{ANINO} /GAPDH	140
A.	Test de reconstitution.....	140
B.	Etude du complexe CP12 ^{ANINO} /GAPDH par spectroscopie RPE	141
5.3.8	Discussion.....	143
5.4	<i>Etude des mutants de la CP12</i>	145
5.4.1	Marquage des mutants C31S, C23S et C66S avec la sonde MTSL	145
5.4.2	Marquage des mutants C23S et C31S avec la sonde Proxyl.....	149
5.4.3	Analyses des espèces marquées par spectrométrie de masse	150
5.4.4	Caractéristiques structurales et fonctionnelles des mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl}	150
A.	Electrophorèse en conditions dénaturantes	150
B.	Etude par Dichroïsme Circulaire	152

C. Activité enzymatique de la GAPDH en présence des mutants C23S et C31S marqués ou non	153
D. Electrophorèse en conditions natives et immunoempreinte.....	153
5.4.5 Etude de l'interaction des mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl} en RPE.....	154
A. Faible évolution des spectres RPE en présence de GAPDH.....	154
B. Protection par la GAPDH de l'attaque du DTT sur le marqueur de chaque mutant 155	
5.4.6 Effet du TFE sur les mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl}	159
A. Structuration de la protéine visible en CD et RPE	159
B. Effet de la GAPDH sur ces mélanges protéines marquées/TFE.....	160
5.4.7 Discussion.....	161
Conclusions générales et perspectives.....	166
Bibliographie	170

Abréviations

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

BPGA : 1,3-biphosphoglycérate

CD : Dichroïsme Circulaire

CROX : Oxalate de Chrome

Da : Dalton

DEAE : Diéthyle aminoéthyle

DEER : Double Résonance Electron-Electron

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DTT : Dithiothréitol

FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

MTSL : MéthaneThioSulfonate Label

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

NOE : Effet nucléaire Overhauser

PID : Protéine Intrinsèquement Désordonnée

PRE : Paramagnetic Resonance Enhancement

PRK : Phosphoribulokinase

RDC : Couplage dipolaire résiduel

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles

SDS : Dodécyl-sulfate de sodium

SDSL : Site-Directed Spin Labeling

SLS : Diffusion statique de la lumière

TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol

Liste des figures

- Figure 1 :** Les quatre niveaux de structure protéique. (A) Séquence d'acides aminés formant la structure primaire de l'insuline bovine [3]. (B) Eléments de structure secondaire : en rose hélice α , en orange feuillet β . (C) Structure tertiaire de la myoglobine (Pdb : 1MBO) [4]. (D) Arrangement de quatre domaines formant la structure quaternaire de l'hémoglobine (Pdb : 1GZX) [5]. 6
- Figure 2 :** Illustration schématique des événements conformationnels dans une protéine. Les mouvements changeant la conformation d'une protéine se passent avec des constantes de temps allant de la femtoseconde à la centaine de seconde d'après [8]. 8
- Figure 3 :** Modèle de différents mécanismes d'interaction protéine-protéine/ligand. (A) Modèle classique de la clé et de la serrure. (B) Modèle de l'ajustement induit. (C) Modèle de la sélection conformationnelle. L = ligand. D'après [17]. 10
- Figure 4 :** Interaction d'un ligand avec l'anticorps Spe7. Deux conformations Ab^1 et Ab^2 sont en équilibre et seul Ab^2 lie le ligand. Le complexe ainsi formé subit un ajustement induit résultant dans un complexe stable [21]. 12
- Figure 5 :** Vision de la « trinité des protéines » suggérant que la structure de l'état natif d'une protéine inclut ces trois états et que la fonction d'une protéine peut être portée non seulement par l'état natif mais également par une de ces trois transitions [29]. 15
- Figure 6 :** Classification des PID selon leur fonctions [30]. 16
- Figure 7 :** Repliement induit du polypeptide KID lors de son interaction avec CBP. On observe une transition désordre \rightarrow paire d'hélices α [38]. 18
- Figure 8 :** Détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine 53BP1 [50]. (A) Ensemble de contrainte établissant un maillage de distances (en blanc) qui définissent la structure de la protéine. (B) Ensemble de structures très proches compatibles avec les données expérimentales. (C) Représentation de la structure de la protéine : deux feuillets β (jaune et vert), une hélice α (rouge) et deux liens flexibles (bleu). 19
- Figure 9 :** Spectres CD UV-lointain typiques de protéines désordonnées, et de protéines contenant majoritairement des hélices α ou des feuillets β 21
- Figure 10 :** Spectres CD de la MeCP2 (A) et de deux de ses fragments (B) : MBD (B) et TRD (B). Les spectres ont été analysés avec le logiciel CDPro permettant la quantification des structures secondaires [70]. 22

Figure 11 : Spectres CD de la protéine Ntail wt seule en solution (violet) ou en présence de 20 % de TFE (rose) d'après [77].	23
Figure 12 : Spectres de fluorescence de la protéine CaD136 libre et liée à la calmoduline. La longueur d'excitation est de 296,7 nm. Le spectre du tryptophane en solution dans l'eau (L-Trp) est montré pour comparaison [79].	25
Figure 13 : Repliement induit du domaine AF1. (A) Dérivée seconde du spectre de AF1 (trait plein), de la protéine RAP74 (tirets) et du mélange des deux (tirets espacés). (B) Somme algébrique du spectre des deux protéines seules en solution (tirets) et spectre du mélange des deux protéines (tirets espacés) [91].	27
Figure 14 : Représentation de Kratky des spectres de diffusion obtenus par des études de diffusion des rayons X aux petits angles. Sont représentés les tracés de Kratky caractéristiques pour une protéine globulaire et un « random coil » [74]. $I(q)$ correspond à l'intensité de diffusion, q est le vecteur de diffusion avec $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$, θ angle de diffusion, λ longueur d'onde.	29
Figure 15 : Intensité relative de diffusion (I_{rel}) en fonction du rayon de Stokes (R_s) pour la protéine prion recombinante du hamster Syrien dans l'état natif à pH 4,2 [97].	31
Figure 16 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique.	32
Figure 17 : Diagramme des niveaux d'énergie pour un système de spin $S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$. Les flèches violettes indiquent les trois transitions possibles.	37
Figure 18 : Signal RPE d'un système $S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$. (Pour des raisons techniques d'enregistrement ce spectre correspond à la dérivée première du signal d'absorption).	38
Figure 19 : Directions x, y et z des axes magnétiques d'un radical nitroxyde.	38
Figure 20 : Spectres RPE simulés pour des nitroxydes en solution gelée. (A) Spectres d'absorption correspondant aux trois plages de champ résonant. (B) Spectre d'absorption résultant de la somme de ces trois raies. (C) Dérivée première du spectre d'absorption [108].	39
Figure 21 : Spectres RPE de radicaux nitroxydes en fonction de la mobilité caractérisée par le temps de corrélation de rotation τ_r . Spectres simulés avec le logiciel EasySpin [109] avec les paramètres suivants : $\nu = 9,5$ GHz ; $(g_x ; g_y ; g_z) = (2,0089 ; 2,0064 ; 2,0027)$; $(A_x/g_x\beta ; A_y/g_y\beta ; A_z/g_z\beta) = (0,49 ; 0,49 ; 3,51)$ mT et $\tau_r = 10^{-12}$ s (A) ; 10^{-9} s (B) ; 10^{-8} s (C) ; 10^{-5} s (D).	41
Figure 22 : Représentation des différents paramètres semi-quantitatifs pouvant être mesurés sur un spectre RPE d'un marqueur greffé sur une protéine. $h(+1)$, $h(0)$ et $h(-1)$ sont respectivement les amplitudes pic à pic des raies correspondant à $M_I = +1, 0$ et -1 . δ est la largeur de la raie centrale (unité : mT).	43

Figure 23 : Représentation de l'angle θ entre le champ magnétique \vec{B} et l'axe reliant les centres paramagnétiques A et B.	46
Figure 24 : Expérience de DEER. A) Séquence DEER à quatre impulsions. Sont représentés les deux fréquences d'irradiation (ν_{obs} et ν_{pompe}) sur le spectre d'absorption de nitroxydes en solution gelée. Le temps t varie au cours de la séquence tandis que ν_1 et ν_2 sont fixés. B) Signal temporel montrant la modulation de l'écho sous l'effet de l'interaction dipolaire. C) « Pattern de Pake » après transformée de Fourier du signal temporel. D) Distribution de distances interspins obtenue après régularisation de Tikhonov.	48
Figure 25 : Spectres RPE de la LPH marquée en position 249 (A) et 181 (B) en fonction du pH. Les pointillés en A indiquent la position des raies à bas et haut champs de la composante large du spectre RPE [137].	49
Figure 26 : (A) Spectres RPE de mutants marqués de l'arrestine en solution ou lié à la rhodopsine active ou inactive. Pour chaque mutant, les spectres normalisés en absence (noir) ou en présence de rhodopsine inactive (rouge) sont représentés sur la première ligne ; et les spectres en présence de rhodopsine inactive (rouge) ou active (bleu) sont représentés sur la deuxième ligne. (B) et (C) Résumé des changements de mobilité induit par l'interaction arrestine/rhodopsine. Les changements de mobilité sont caractérisés par des couleurs : gris, pas de changements ; rose/rouge, petite et grande augmentation de mobilité respectivement ; bleu clair/bleu foncé, petite et grande diminution de mobilité respectivement. (B) Changements sous interactions avec la rhodopsine inactive. (C) Changements supplémentaires lors de l'activation de la rhodopsine par la lumière. (Le domaine C-terminal est en jaune) [139].....	50
Figure 27 : Spectres RPE des mutants marqués de la protéine Ntail en absence (gauche) ou en présence (droite) de son partenaire XD. (Bas) Représentation du rapport $h(+1)/h(0)$ des protéines Ntail marquées libres et en présence soit de XD soit de TFE en fonction des positions de marquage. Les changements de mobilité sont représentés par des cadres de couleur : rose, pas de changements ; violet, forts changements ; bleu, faibles changements [45].	51
Figure 28 : Représentation des paramètres semi-empiriques décrivant la forme spectrale de la sonde greffée en différents sites du T4L. (ΔH_0) est la largeur pic à pic de la raie centrale et ($\langle H^2 \rangle$) le second moment du spectre [149].	53
Figure 29 : Formule chimique développée du dithiothréitol (DTT).	63
Figure 30 : Formules chimiques du MTSL (A) et du 3-maleimido-proxyl (B).	64
Figure 31 : (A) Spectres RPE de chaque fraction après passage sur colonne. (B) Représentation de la concentration en protéines et en spin en fonction des différentes fractions [164].	65

Figure 32 : Formule chimique du marqueur ANINO.....	66
Figure 33 : Spectre RPE d'un radical nitroxyde (A) et intégrale de ce spectre (B).	67
Figure 34 : Représentation des valeurs $h(+1)$, $h(0)$ et $h(-1)$ respectivement les amplitudes pic à pic des raies à bas champ, à champ central et à haut champ.	70
Figure 35 : Représentation des angles ϑ et φ à l'intérieur d'un cône [122].	71
Figure 36 : Structure et composition en centres métalliques de la nitrate réductase A d' <i>Escherichia coli</i>	75
Figure 37 : Modèle de biogenèse du complexe nitrate réductase A présentant en particulier l'insertion du Moco et les différentes étapes d'assemblage des sous-unités, d'après [173]. ..	77
Figure 38 : Modèle structural en 3D obtenu pour la protéine NarJ tronquée d' <i>Escherichia coli</i> construit par homologie de séquences [178].	78
Figure 39 : Spectre HSQC ^1H - ^{15}N de la protéine NarJ en absence et en présence du peptide de NarG(1-15) [178].	80
Figure 40 : Sites d'interaction entre NarJT et le domaine N-terminal de NarG prédits par des calculs d'arrimage moléculaire. Les sphères bleues représentent le centre géométrique du peptide NarG (1-15). Les dix meilleurs scores obtenus sont représentés dont six se trouvent dans une crevasse hydrophobe [178]......	80
Figure 41 : Localisation des résidus ciblés pour l'introduction d'une cystéine par mutagenèse dirigée dans la protéine NarJT. Le résidu Glu119 est situé dans la crevasse, le résidu Gln149 à l'opposé de cette crevasse et les résidus Gln104 et His21 sont localisés de part et d'autre de la crevasse. La séquence primaire de NarJ est notée avec en bleu les résidus choisis pour la mutation et la cystéine naturelle du domaine C-terminal.	82
Figure 42 : Analyse par dichroïsme circulaire de la protéine NarJ, NarJT, des différents mutants avant (A) et après (B) marquage avec le MTSL.	83
Figure 43 : Spectre RPE à température ambiante de la protéine NarJ marquée en position 207 dans la région C-terminale.	85
Figure 44 : Spectre RPE de la protéine NarJ marquée en position 207 en absence (A) et en présence (B) du peptide NarG(1-15). Les spectres noirs correspondent aux spectres expérimentaux, les rouges sont ceux simulés à l'aide du programme EPRSIM-C. (C) Représentation des paramètres de simulation τ et Ω pour la protéine NarJ seule en solution (sphère bleue) et pour la protéine NarJ en présence du peptide NarG(1-15) (sphère rose). ...	86
Figure 45 : Spectres RPE des protéines NarJT mutées marquées à température ambiante. Les spectres sont normalisés à l'amplitude de la raie centrale.	87

Figure 46 : Spectres expérimentaux des mutants H21C*, Q104C*, Q149C*, et E119C* seuls en solution (A) ou en présence du peptide partenaire (B).	88
Figure 47 : Spectres RPE expérimentaux (noirs) et simulés (rouge) en absence (A) et en présence (B) du peptide partenaire.	89
Figure 48 : Graphiques $[\tau-\Omega]$ des mutants marqués H21C*, Q104C*, Q149C* et E119C*. Les sphères bleues correspondent aux mutants seuls en solution et les sphères roses, aux mutants en présence de peptide. La taille des sphères indique la proportion de chaque composante.	90
Figure 49 : Position des acides aminés ciblés pour le double mutant NarJ tronqué.	91
Figure 50 : Contrôle du double mutant H21C/Q104C marqué ou non par spectroscopie de fluorescence (A) ou dichroïsme circulaire (B).	92
Figure 51 : (A) Comparaison de la somme des spectres des mutants monomarqués H21C* et Q104C* (rouge) par rapport au spectre du mutant bimarqué H21C*/Q104C* (noir). Les spectres ont été normalisés à l'intensité intégrée. (B) Analyse combinatoire correspondant à une répartition homogène entre le site 1 et le site 2 (gauche) et à une répartition hétérogène en faveur du site 1 (droite).	93
Figure 52 : Spectres RPE de la protéine H21C*/Q104C* sans peptide (noir) et en présence de partenaire (rouge) (1 : 10). (A) Enregistrement à température ambiante et (B) en conditions cryogéniques (100 K). Tous les spectres sont normalisés à l'intensité intégrée.	94
Figure 53 : Courbes de saturation obtenues pour les mutants simplement marqués H21C* et Q104C* ainsi que pour le mutant doublement marqué H21C*/Q104C* en absence (A) et en présence de peptide (B). Les expériences ont été faites à 100K sur des protéines de concentration égale à 95 μ M. L'abscisse des graphiques correspond à la racine carrée de la puissance d'enregistrement des spectres, et l'ordonnée, au rapport de l'amplitude pic à pic de la raie centrale sur la racine de la puissance normalisé à 1.	96
Figure 54 : Expériences de DEER. (A) Trace expérimentale dans le domaine temporel de l'expérience DEER (noire) et fonction utilisée pour la correction de la ligne de base (rouge). (B) Trace expérimentale après correction. (C) Profil de distances obtenu après une régularisation de Tikhonov (logiciel DEER Analysis [131]). Les indices 1 et 2 correspondent au mutant H21C/Q104C* seul et avec peptide respectivement.	97
Figure 55 : Séquence du peptide de NarG et position des résidus mutés en cystéine.	98
Figure 56 : Fraction 4 après élution sur colonne PD MidiTrap G-10. (A) Peptide L5C après marquage. (B) Contrôle avec du radical seul passé sur la colonne dans les mêmes conditions que pour les peptides.	99

Figure 57 : Spectres RPE à température ambiante des peptides L5C, R7C, F8C et Y10C marqués au MTSL. Au dessus de chaque spectre se trouve la représentation de la structure du peptide, avec en rouge la mutation en cystéine.	100
Figure 58 : Spectres RPE des peptides L5C ^{MTSL} , R7C ^{MTSL} , F8C ^{MTSL} et Y10C ^{MTSL} à température ambiante seuls (noir) ou soit en présence de NarJ-W194F (rose) soit de NarJT (violet). Les spectres ont été normalisés à l'amplitude de la raie centrale.	102
Figure 59 : Cycle thermodynamique pour les processus de reconnaissance moléculaire impliquant l' « induced fit » et la sélection conformationnelle. Pour la sélection conformationnelle, la conformation requise pour l'interaction (P ₂) est pré-existante en solution avant l'addition du ligand (L). Pour l' « induced fit », l'interaction se fait avant le changement conformationnel de la protéine (P ₁ en P ₂). K ₁ et K ₂ représentent les constantes cinétiques d'après [184].	106
Figure 60 : Cycle de Calvin-Benson-Bassham. Les trois étapes clés sont représentées ; étape 1 : phase de carboxylation, étape 2 : phase de réduction, étape 3 : phase de régénération.	111
Figure 61 : Modèle décrivant l'association entre la CP12, la GAPDH et la PRK de <i>C. reinhardtii</i> d'après [2].	112
Figure 62 : Modèle structural de la CP12 de <i>C. reinhardtii</i> obtenu par modélisation moléculaire [198]. Les quatre cystéines sont représentées en rouge.	113
Figure 63 : Déphosphorylation et réduction du 1,3-biphosphoglycérate en glycéraldéhyde-3-phosphate inorganique par la GAPDH.	114
Figure 64 : Modélisation de la GAPDH de <i>C. reinhardtii</i> [200]. Les quatre monomères sont représentés en rouge, bleu, vert et orange. La crevasse formée entre deux monomères est située par une flèche.	114
Figure 65 : Régulation de deux GAPDH chloroplastiques. (A) Schéma pour la GAPDH A ₂ B ₂ avec un changement conformationnel lors de la transition obscurité/lumière d'après [204]. Les deux couleurs représentent les deux sous-unités A et B. (B) Schéma pour la GAPDH A4 qui change également de conformation lors de sa régulation d'après [203].	115
Figure 66 : Modèle structural de la CP12 [198] et site d'interaction avec la GAPDH. Les résidus cystéines et les résidus chargés négativement mutés sont colorés en vert et en rouge, respectivement. Les résidus chargés positivement situés dans la S-loop de la GAPDH [200] et les résidus chargés négativement sur la CP12 sont représentés par des cercles, et interagissent à l'aide d'interactions électrostatiques [205].	116
Figure 67 : (A) Spectre RPE à température ambiante de la CP12 marquée avec la sonde MTSL. La concentration en protéine est de 24 μM et la concentration en spins de 42 μM. P = 10 mW, MA = 0,1 mT (B) Spectres RPE enregistrés en conditions cryogéniques (100 K) de la CP12	

marquée (rouge) et d'une protéine monomarkuée de référence (noir). $P = 0,4$ mW, $MA = 0,3$ mT. Les spectres ont été normalisés par rapport à l'amplitude pic à pic de la raie centrale. L'élargissement du spectre de la CP12^{MTSL} traduit la présence de fortes interactions spin-spin.

..... 118

Figure 68 : Spectres CD de la CP12 dans ses 2 états rédox et marquée au MTSL. Tampon phosphate 10 mM, pH 6, filtré. 10 μ M de protéine dans la cuve..... 119

Figure 69 : Gel d'électrophorèse. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE de 12 % et révélées par coloration au Bleu de Coomassie R250. Protéine standard : piste 1. 10 μ g de CP12 non marquée en absence d'agent réducteur, piste 2, ou en présence de 20 mM de DTT, piste 3. 7 μ g de CP12 marquée en absence de DTT, piste 4, ou en présence de 20 mM de DTT, piste 5. 119

Figure 70 : Analyse de la formation du complexe CP12-GAPDH. (A) Analyse Western Blot de la reconstitution in vitro du complexe CP12-GAPDH. La CP12 non marquée (piste 2) et la CP12 marquée (piste 3) ont été mélangées avec la GAPDH tétramérique dans un rapport molaire de 1 : 1 (0.03 nmol). La CP12 seule est déposée comme contrôle (piste 1). Les protéines sont séparées sur un gel natif de gradient d'acrylamide 4-15%, transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées avec des anticorps dirigés contre la CP12. (B) Effet de la CP12 sur l'activité NADPH-GAPDH. Courbes d'activité pour la GAPDH seule, $[GAPDH]_0 = 1$ nM (noire), en présence de CP12 (rouge) ou en présence de CP12 marquée au MTSL (bleue) à 0,5 μ M (cf paragraphe 3.4.1)..... 120

Figure 71 : Effet de la GAPDH sur la CP12 marquée. Spectres RPE à $t = 0$ min et $t = 90$ min du mélange CP12^{MTSL}/GAPDH pour un rapport molaire de 1 : 1 (1 monomère de CP12 pour 1 tétramère de GAPDH). La concentration finale en protéine est de 20,7 μ M. 121

Figure 72 : Evolution du rapport $h(-1)/h(0)$ au cours du temps avec un excès molaire d'une CP12 pour quatre monomères de GAPDH. Le temps caractéristique de la cinétique est de 29 min. Un délai de 10 minutes a été observé dans ce cas mais n'est pas systématique. 122

Figure 73 : Cinétique de libération du MTSL de la CP12 pour différents excès molaires CP12/monomère GAPDH. La concentration en CP12 est de 20 μ M..... 123

Figure 74 : Réaction du 3-Maleimido-proxyl avec les cystéines et spectre RPE de la CP12 marqué avec la sonde PROXYL. La forme spectrale est similaire à celle observée avec le MTSL. 124

Figure 75 : Alignement de séquences de différentes GAPDH : GAPDH de muscle de lapin, GAPDH de levure et GAPDH de *C. reinhardtii*. Les cystéines du site actif des GAPDH sont encadrées en rouge, les extra-cystéines sont montrées par des flèches. D'après [209]..... 125

Figure 76 : Cinétique de libération du MTSL en présence de GAPDH de *C. reinhardtii* (rond violet), GAPDH de levure (carré bleu) ou de lapin (triangle rose) en mélange avec de la CP12

dans un rapport molaire de 1 : 1 ; ou en présence de différentes protéines avec la GAPDH de C. reinhardtii : GAPDH/Ntail (losange orange) et GAPDH/cytochrome c₃ (triangle noir) (1 : 1).
..... 126

Figure 77 : Schéma du mécanisme de libération d'un marqueur de la CP12^{MTSL} par la GAPDH.
..... 127

Figure 78 : Etude de la cinétique de libération du marqueur du mélange CP12^{MTSL}/GAPDH et du mélange CP12^{MTSL}/GAPDH-C21S par RPE au cours du temps. 127

Figure 79 : Modèle de la structure d'une partie d'un monomère de GAPDH de C. reinhardtii montrant les quatre cystéines. Les extra-cystéines sont colorées en rouge (C21) et bleu (C291) et sont proches l'une de l'autre. Les cystéines du site actif, C156 et C160 sont en vert. 129

Figure 80 : Réaction générale de Mannich d'après [221]. 131

Figure 81 : Mécanisme développé d'une réaction de type Mannich d'après [221]. 132

Figure 82 : Réaction de Mannich à 3 composés sur la tyrosine donnant deux produits réactionnels A et B possibles. 132

Figure 83 : Spectrométrie de masse en ionisation électrospray (ESI-MS) du mélange contenant la tyrosine estérifiée, le formaldéhyde et le marqueur après incubation de 16h à pH 6,5. M_A: nitroxyde, M_B: tyrosine estérifiée, M_D: tyrosine estérifiée marquée. Les signaux à 214, 231, 279 et 338 viennent d'impuretés dans la source d'ionisation [222]. 133

Figure 84 : (A) Concentration en protéine (losange bleu) et concentration en spin (carré rose) des fractions après sortie de colonne. A partir de la fraction 5, la concentration en spin devient supérieure à celle en protéine. Cela indique une contamination par du radical libre. Seules les fractions 2 à 5 ont été rassemblées. (B) Spectre de la CP12 marquée après les 16 heures de réaction de marquage. 135

Figure 85 : Spectres MALDI-ToF obtenus après digestion trypsique des échantillons réduits et alkylés de la CP12 non marquée (rose) et de la CP12 marquée (bleu) pour le peptide de 27 acides aminés du domaine C-terminal. 136

Figure 86 : Gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. 7 µg de protéines ont été déposés. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 + 20 mM DTT ; 3 : CP12^{ANINO} seule ; 4 : CP12^{ANINO} + 20 mM DTT ; 5 : Marqueur de taille Euromedex (5 µL). 138

Figure 87 : Spectres CD de la CP12 dans ses deux états rédox, marquée avec ANINO et en présence de 30 % de TFE. Tampon phosphate 10 mM, pH 6, filtré. 10 µM de protéine dans une cuve de 1 mm de trajet optique. 139

Figure 88 : Effet de la CP12 sur l'activité NADPH-GAPDH. Représentation de la disparition du NADPH au cours du temps (ΔA/min) pour la GAPDH seule ou en présence de CP12 marquée

ou non. Les barres d'erreurs représentent les écarts type obtenus à partir de trois expériences identiques. 140

Figure 89 : Immunoempreinte de la reconstitution du complexe GAPDH/CP12. 1 : CP12 sauvage ; 2 : CP12 sauvage avec GAPDH ; 3 : CP12^{ANINO} avec GAPDH. 141

Figure 90 : (A) Spectres RPE normalisés à l'amplitude de la raie centrale enregistrés à 296 (1) K du radical libre (a), greffé sur la protéine (b), en présence de 30 % de saccharose (c), et complexé au partenaire, la GAPDH (d). Les rapports $h(-1)/h(0)$ de chacun des spectres sont représentés sur le graphique. (B) Spectres RPE simulés (en couleur) avec le logiciel EasySpin [109] superposés aux spectres expérimentaux (noir). Les temps de corrélation résultant des simulations sont donnés. 142

Figure 91 : Schéma de la structure secondaire de la CP12 (A) et de la CP12 marquée avec ANINO (B). Les deux CP12 possèdent une paire d'hélices α et un pont disulfure dans le domaine N-terminal ainsi qu'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal. 144

Figure 92 : Spectres RPE des deux mutants CP12 marqués avec la sonde MTSL à température ambiante. A : Mutant C23S^{MTSL} à 47,5 μ M, B : Mutant C66S^{MTSL} à 161 μ M, C : Mutant C31S^{MTSL} à 150 μ M. 146

Figure 93 : Spectres CD de la CP12 dans ses deux états rédox, du mutant C23S marqué avec la sonde MTSL ou non (A) et du mutant C66S marqué avec la sonde MTSL ou non (B). Spectres CD du C23S^{MTSL} en absence ou en présence de TFE (C) et du C66S^{MTSL} en absence ou en présence de TFE (D). Tampon phosphate 10 mM, pH 8, filtré. 10 μ M de protéine dans une cuve de 1 mm de trajet optique. 147

Figure 94 : Illustration de la position du marqueur et des structures globales des mutants marqués. A : Mutant CP12-C23S^{MTSL} dépourvu d'hélices α , B : Mutant CP12-C66S^{MTSL} avec présence des 2 hélices. 147

Figure 95 : Cinétique de libération du MTSL de la CP12^{MTSL}, du C23S^{MTSL}, du C31S^{MTSL} et du C66S^{MTSL} par la GAPDH avec un temps caractéristique de libération τ similaire pour les protéines CP12^{MTSL}, C23S^{MTSL} et C66S^{MTSL} de l'ordre de 30 minutes. Le τ du mutant C31S^{MTSL} est de l'ordre de 80 minutes. Ce temps plus long est dû à l'utilisation d'une GAPDH dialysée qui a pu perdre de son efficacité. 148

Figure 96 : Immunoempreinte de la reconstitution du complexe GAPDH/CP12. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 avec GAPDH ; 3 : C23S avec GAPDH ; 4 : C23S^{MTSL} avec GAPDH ; 5 : C66S avec GAPDH. 149

Figure 97 : Spectres RPE des mutants C23S et C31S marqués avec la sonde 3-maleimido-proxyl. 150

Figure 98 : Gel SDS-PAGE 12 % des mutants C23S et C31S. (A) Mutant C23S. 1 : CP12 rec wt ; 2 : CP12 rec wt + 20 mM DTT final ; 3 : Marqueur de taille ; 4 : C23S non marqué ; 5 : C23S non marqué + 20 mM DTT final ; 6 : C23S ^{Proxyl} ; 7 : C23S ^{Proxyl} + 20 mM DTT final. 7 µg de protéines sont déposés. (B) Mutant C31S. 1 : Marqueur de taille ; 2 : C31S non marqué ; 3 : C31S non marqué + 20 mM DTT final ; 4 : C31S ^{Proxyl} ; 5 : C31S ^{Proxyl} + 20 mM DTT final. 5 µg de protéines déposées sur le gel.	151
Figure 99 : Spectres CD des mutants C23S et C31S non marqués et marqués ainsi que de la CP12 dans ses deux états rédox. 10 µM de protéine ont été utilisés pour chaque expérience. Tampon phosphate 10 mM, pH 6, filtré. Cuve de 1 mm de trajet optique.	152
Figure 100 : Effet des mutants C23S et C31S marqués ou non sur l'activité NADPH-GAPDH. 5 µM de protéines sont utilisées pour chaque test. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de la moyenne de trois mesures réalisées dans des conditions identiques.	153
Figure 101 : Analyse de la formation du complexe GAPDH-CP12 par reconstitution in vitro. (A) Immunoempreinte pour le mutant C23S. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 + GAPDH ; 3 : C23S seule ; 4 : C23S* seul ; 5 : C23S* + GAPDH. (B) Immunoempreinte pour la protéine C31S. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 + GAPDH ; 3 : C31S seule ; 4 : C31S* ; 5 : C31S* + GAPDH. Les mélanges CP12/GAPDH ont été faits avec un rapport molaire de 1 : 3 (CP12 : GAPDH) pour les deux tests. (*) = 3-maleimido-proxyl.	154
Figure 102 : Effet de la GAPDH sur les mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl} . Etude par spectroscopie RPE. Les spectres RPE ont été normalisés à l'amplitude de la raie centrale.	155
Figure 103 : Disparition du signal RPE pour les mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl} après ajout de 5 mM de DTT. L'amplitude correspond à la mesure pic à pic de la raie centrale.	156
Figure 104 : Cinétique de réduction du radical pour les mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl} . Chaque échantillon est composé d'un des mutants marqués et de GAPDH en quantité équimolaire ainsi que du DTT à 5 mM final.	157
Figure 105 : Cinétique de réduction du radical Proxyl soit en présence de DTT 5 mM final soit en présence de GAPDH et de DTT 5 mM final.	157
Figure 106 : Cinétique de réduction du radical nitroxyde sur les mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl} par le DTT (5 mM) en présence de GAPDH (1 : 1) dans deux conditions différentes, en présence de substrat (rond) ou sans (carré).	158
Figure 107 : Spectres CD du C23S ^{Proxyl} et du C31S ^{Proxyl} en présence ou non de TFE en proportion variable.	159
Figure 108 : Spectres RPE des mutants C23S ^{Proxyl} et C31S ^{Proxyl} sans TFE ou en présence de 30 % de TFE. Les spectres sont normalisés à l'intensité intégrée.	159

Figure 109 : Spectres RPE des mélanges des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} en présence de 30 % TFE avec ou sans partenaire GAPDH. Les spectres sont normalisés à l'intensité intégrée. 160

Figure 110 : Effet du TFE à 30 % sur l'activité GAPDH-NADPH en présence des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} 161

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pourcentage en acides aminés pour des PID [28], des protéines globulaires [28], la protéine CP12 et la protéine NarJ (les deux protéines étudiées au cours de cette thèse). Les valeurs en bleu représentent les acides aminés au moins deux fois plus présents dans les PID que les protéines globulaires, les valeurs roses les acides aminés deux fois moins représentés. 14

Tableau 2 : Paramètres d'enregistrement pour le standard et indication des paramètres fixes et variables pour les différents échantillons marqués. 68

Tableau 3 : Valeurs des constantes de dissociation Kd des différentes protéines mutées et marquées de NarJ obtenues par spectroscopie de fluorescence. 84

Tableau 4 : Constantes de dissociation du complexe NarJT avec les différents peptides mutés déterminées par fluorescence. Utilisation de 2 µM de protéine. 98

Tableau 5 : Evaluation des pourcentages de marquage des différents peptides à l'aide de la concentration en peptide et de la concentration en spin. * : valeurs estimées par rapport aux valeurs des trois autres peptides. 101

Tableau 6 : Formule chimique des différents composés susceptibles d'être observés en spectrométrie de masse [222]. 134

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des expériences faites sur les mutants C23S et C31S marqués ou non. 162

Introduction générale

Introduction générale

L'étude des transitions structurales dans les protéines est d'un intérêt crucial car ces transitions sont souvent impliquées dans des processus biologiques essentiels tels que la régulation de l'activité enzymatique, la formation de complexe protéique, l'assemblage d'édifice supramoléculaire, la régulation cellulaire... De tels phénomènes sont possibles grâce à la flexibilité des protéines, globulaires ou intrinsèquement désordonnées, ce qui les empêche d'être observés par les techniques structurales classiques comme la cristallographie aux rayons X.

Le marquage de spin couplé à la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique bien adaptée pour l'étude de ces transitions structurales. L'insertion d'un radical nitroxyde sur une cystéine, naturelle ou introduite par mutagenèse dirigée, située à une position clé de la protéine permet d'obtenir des informations locales sur les changements structuraux éventuels provoqués par l'ajout d'un partenaire. La présence de deux radicaux permet également de mesurer des distances intersondes. La RPE comble ainsi le vide situé entre la microscopie et la cristallographie.

L'activité de recherche de notre équipe, au sein du laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, est centrée sur l'étude des propriétés structurales et fonctionnelles de métalloenzymes rédox impliquées dans le métabolisme énergétique de micro-organismes. Cette activité est basée sur l'analyse : des propriétés électroniques, structurales et thermodynamiques des centres rédox mis en jeu, de l'organisation des centres dans les complexes enzymatiques, des modes de reconnaissance des protéines partenaires. Trois grandes classes de systèmes biologiques sont particulièrement étudiées :

- Les hydrogénases et leurs protéines partenaires physiologiques.
- Les enzymes à molybdène.
- Les protéines à structure désordonnées ou flexibles qui peuvent avoir un caractère multifonctionnel.

Les stratégies mises en place pour l'étude de ces systèmes s'appuient principalement sur la spectroscopie RPE, la potentiométrie rédox, la spectroscopie électronique et la modélisation théorique. Mon travail de thèse se situe au niveau de la troisième classe de systèmes biologiques listés ci-dessus. Il est centré sur l'utilisation des sondes paramagnétiques pour l'étude de la flexibilité et de la dynamique structurale des protéines, un axe qui se développe depuis quelques années au laboratoire. Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été d'appliquer et de développer cette technique à l'étude de deux systèmes biologiques présentant une flexibilité différente, une protéine chaperon NarJ présente dans la bactérie *Escherichia coli*, et une protéine intrinsèquement désordonnée la CP12 que l'on trouve dans l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour ces deux systèmes biologiques,

Introduction générale

les questions posées sont néanmoins similaires et concernent leur comportement structural lors de leur interaction avec leur partenaire physiologique. Dans ma thèse, j'ai été amenée à mettre en place des stratégies différentes pour ces deux protéines en fonction des connaissances que l'on avait sur chacune d'elle et des problèmes rencontrés au cours de mon travail.

Pour le premier système biologique étudié : la protéine chaperon NarJ d'*E. coli*, j'ai bénéficié d'une longue collaboration entre notre équipe et celle du Dr Axel Magalon au Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB, Marseille) sur l'étude du complexe membranaire Nitrate Réductase A d'*Escherichia coli*. Cette enzyme constitue un bon modèle d'étude des processus bioénergétiques de transfert d'électrons et de protons se produisant au niveau de la membrane. La nitrate réductase membranaire d'*E. coli* est un complexe formé de trois sous-unités (NarG, NarH, NarI) portant chacune des centres métalliques de natures différentes. Une de ces sous-unités (NarG) contient le cofacteur à Mo et un centre [4Fe-4S]. La signature RPE de ce centre a permis de suivre en détail le processus d'assemblage du complexe nitrate réductase et il a pu être montré que l'insertion de ce centre précède celle du cofacteur à molybdène, processus régi par une protéine accessoire ou chaperon : NarJ [1]. Cette protéine chaperon est multifonctionnelle et interagit avec NarG en deux sites distincts. L'objectif de ce sujet d'étude a été d'utiliser des sondes paramagnétiques pour caractériser une de ces deux associations en appliquant différentes approches de spectroscopie RPE. J'ai en particulier eu la chance de participer aux premières expériences de mesures de distances entre marqueurs grâce à l'installation, durant le déroulement de ma thèse, d'un spectromètre de RPE impulsionnelle au laboratoire.

Pour le deuxième système biologique étudié : une protéine chloroplastique de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la CP12, une collaboration a été entreprise avec le Dr Brigitte Gontero qui dirige l'équipe « d'Enzymologie de complexes supramoléculaires » au laboratoire BIP. Cette équipe s'intéresse à l'étude du métabolisme du carbone chez les organismes photosynthétiques. Un des organismes modèles étudiés est l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et plus particulièrement un complexe supramoléculaire constitué de deux enzymes, la PRK et la GAPDH, deux enzymes clés impliquées dans l'assimilation du CO₂. Il a été montré que la CP12, petite protéine peu structurée appartenant à la famille des protéines intrinsèquement désordonnées (PID), était nécessaire à l'assemblage de cet édifice et qu'elle jouait le rôle de protéine « adaptatrice » [2]. En particulier, la CP12 interagit avec la GAPDH permettant la régulation de l'activité enzymatique de cette dernière. Cette interaction semble également reliée à des changements conformationnels des deux partenaires. L'objectif ici a été d'étudier cette

Introduction générale

interaction par marquage de spin suivi par RPE afin de comprendre les bases moléculaires de ce processus.

Ces deux protéines, NarJ et CP12, sont donc des sujets d'étude particulièrement intéressants car elles sont représentatives de degré de flexibilité différent.

Le plan de ma thèse est le suivant :

Le **chapitre 1** concerne une introduction générale sur la flexibilité structurale des protéines et son importance pour la multifonctionnalité des protéines. Les protéines intrinsèquement désordonnées et leurs propriétés, très étudiées depuis quelques années, seront développées en détail. Enfin, une présentation concise des différentes techniques expérimentales pour étudier les protéines flexibles sera faite en associant de nombreux exemples d'applications.

Le **chapitre 2** sera entièrement consacré à la principale technique que j'ai utilisée au cours de ma thèse : l'utilisation de sondes paramagnétiques combinée à la spectroscopie RPE. Les bases théoriques nécessaires à la compréhension des formes spectrales des radicaux nitroxyde greffés sur des protéines seront données et les différentes approches méthodologiques seront décrites. La fin de ce chapitre sera consacrée à quelques exemples d'application.

Le **chapitre 3** présentera les méthodes expérimentales utilisées au cours de cette thèse.

Les chapitres suivants concerneront la description des stratégies mises en œuvre et les résultats obtenus pour mes deux sujets d'étude.

Le **chapitre 4** portera sur l'étude de la flexibilité de la protéine NarJ. Nous verrons comment les radicaux nitroxydes permettent d'obtenir des informations sur le site d'interaction entre deux partenaires et de proposer un mode d'interaction.

Le **chapitre 5** sera consacré à l'étude de la protéine CP12. Nous observerons un comportement inhabituel du partenaire physiologique vis-à-vis de la protéine marquée. Par ailleurs, nous décrirons comment la difficulté liée à la présence de cystéines (cibles des sondes paramagnétiques classiques) au sein de la protéine a nécessité le développement de nouvelles stratégies de marquage. Enfin, des mutants portant sur les résidus cystéines de la CP12 seront également étudiés pour caractériser l'interaction entre la CP12 et la GAPDH.

Chapitre 1 : Flexibilité et dynamique structurale des protéines

1.1 Importance de la flexibilité structurale des protéines

1.1.1 Architecture des protéines

Les protéines sont des polymères constitués de vingt acides aminés différents reliés par des liaisons peptidiques. Aux températures physiologiques et en solution aqueuse, les chaînes polypeptidiques des protéines se replient. La séquence en acides aminés dans une protéine constitue sa structure primaire. Celle-ci peut déterminer la façon dont la protéine se replie en des structures de niveau plus complexe. La structure secondaire peut prendre la forme d'hélices α ou de feuillets β qui vont être construits à la suite d'interactions régulières par le biais de liaisons hydrogène. Pour une protéine globulaire, les différents éléments de structures secondaires ainsi que des boucles et des éléments dépourvus de structure secondaire, sont repliés en une structure tertiaire. Enfin, de nombreuses protéines sont formées de l'association des chaînes repliées de plusieurs polypeptides : c'est ce que l'on appelle la structure quaternaire.

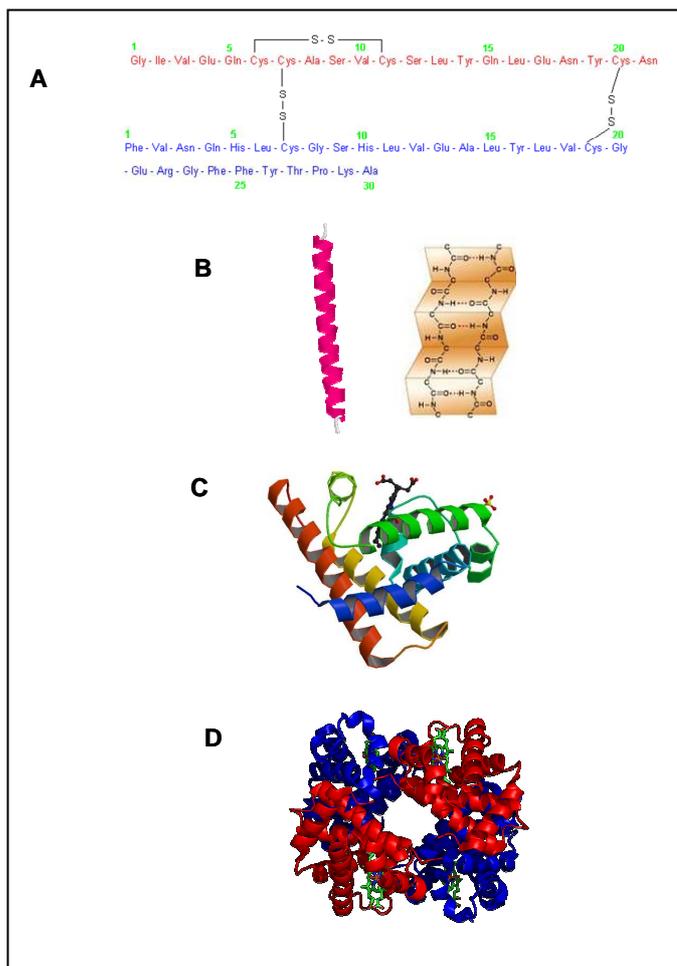


Figure 1 : Les quatre niveaux de structure protéique. (A) Séquence d'acides aminés formant la structure primaire de l'insuline bovine [3]. (B) Éléments de structure secondaire : en rose hélice α , en orange feuillet β . (C) Structure tertiaire de la myoglobine (Pdb : 1MBO) [4]. (D) Arrangement de quatre domaines formant la structure quaternaire de l'hémoglobine (Pdb : 1GZX) [5].

Quatre grands types d'interaction gouvernent le repliement d'une protéine [6] :

- Les ponts disulfure (énergie de liaison aux alentours de 160 kJ/mol), qui se forment entre les chaînes latérales des résidus cystéines et sont retrouvés en abondance dans les protéines. A l'exception de ces liaisons, le reste de l'énergie de stabilisation d'une protéine repliée ne provient pas de liaisons covalentes.
- L'interaction de Van der Waals avec une énergie de liaison d'environ 4 kJ/mol : cette liaison se fait pour n'importe quel atome mais nécessite une distance entre atomes faible : moins de 5 angström. Chaque atome présente des fluctuations électroniques temporaires faisant de lui un dipôle transitoire. Ceci explique que deux atomes, mêmes neutres, peuvent développer une interaction électrostatique faible. Leur faiblesse est compensée par leur nombre considérable.
- La liaison Hydrogène dont l'énergie de liaison est généralement comprise entre 4 et 20 kJ/mol : deux atomes électronégatifs se partagent inégalement un atome d'hydrogène. Un atome est lié par covalence à l'hydrogène, c'est l'atome donneur. L'autre atome est l'atome accepteur. Généralement on observe cette liaison entre les éléments de deux liaisons peptidiques. On les trouve également associant les chaînes latérales des acides aminés polaires. Elles sont faibles et instables mais ces défauts sont compensés par leur très grand nombre qui leur permet d'avoir un rôle essentiel dans le maintien de la structure second-tertiaire. Les liaisons hydrogène gagnent en puissance quand les trois atomes sont alignés sur un même axe.
- Les interactions hydrophobes (énergie de liaison d'environ 12-15 kJ/mol) : elles s'effectuent entre deux molécules non polaires. En présence d'eau, celles-ci auront tendance à s'associer pour exclure l'eau. Par exemple dans les protéines globulaires solubles, la zone hydrophobe (les groupements apolaires) est enfouie à l'intérieur de la molécule, excluant l'eau. Ce phénomène stabilise les structures tertiaires.

Au-dessus du zéro absolu, toutes les liaisons chimiques présentent une certaine flexibilité. Dans les protéines, comme la plupart des liaisons sont non covalentes, il y a suffisamment d'énergie thermique aux températures physiologiques pour que les interactions faibles se rompent et se reforment fréquemment rendant les protéines flexibles. Les structures protéiques fluctuent de manière continue autour d'une conformation d'équilibre. Ces fluctuations atomiques peuvent varier de quelques centièmes d'angströms (vibration atomique simple) à une dizaine d'angströms (déplacement d'un segment par rapport à la structure complète) [7]. Ces fluctuations sont suffisamment importantes pour permettre aux petites molécules de pénétrer à l'intérieur de la protéine.

Elles sont essentielles pour la fonction de la protéine et elles permettent à la structure de s'ajuster avec une autre molécule.

1.1.2 La flexibilité des protéines

Les structures de protéines sont très dynamiques et leurs fonctions biologiques sont intimement liées à cette dynamique. La dynamique ou le mouvement dans une protéine permet à sa conformation de changer et de répondre à la présence d'autres molécules et/ou à des variations environnementales. Les processus biologiques et biochimiques dépendent de cette capacité à changer de conformation. L'adaptabilité ou la flexibilité d'une protéine peut résulter, soit de subtils changements comme le déplacement de la chaîne latérale de quelques acides aminés pour lier un petit substrat, soit de changements drastiques comme le repliement global de certaines protéines [8-9]. La gamme de temps de ces événements conformationnels qui sont à la base de la flexibilité des protéines couvre une période allant de 10^{-12} à 10^1 seconde.

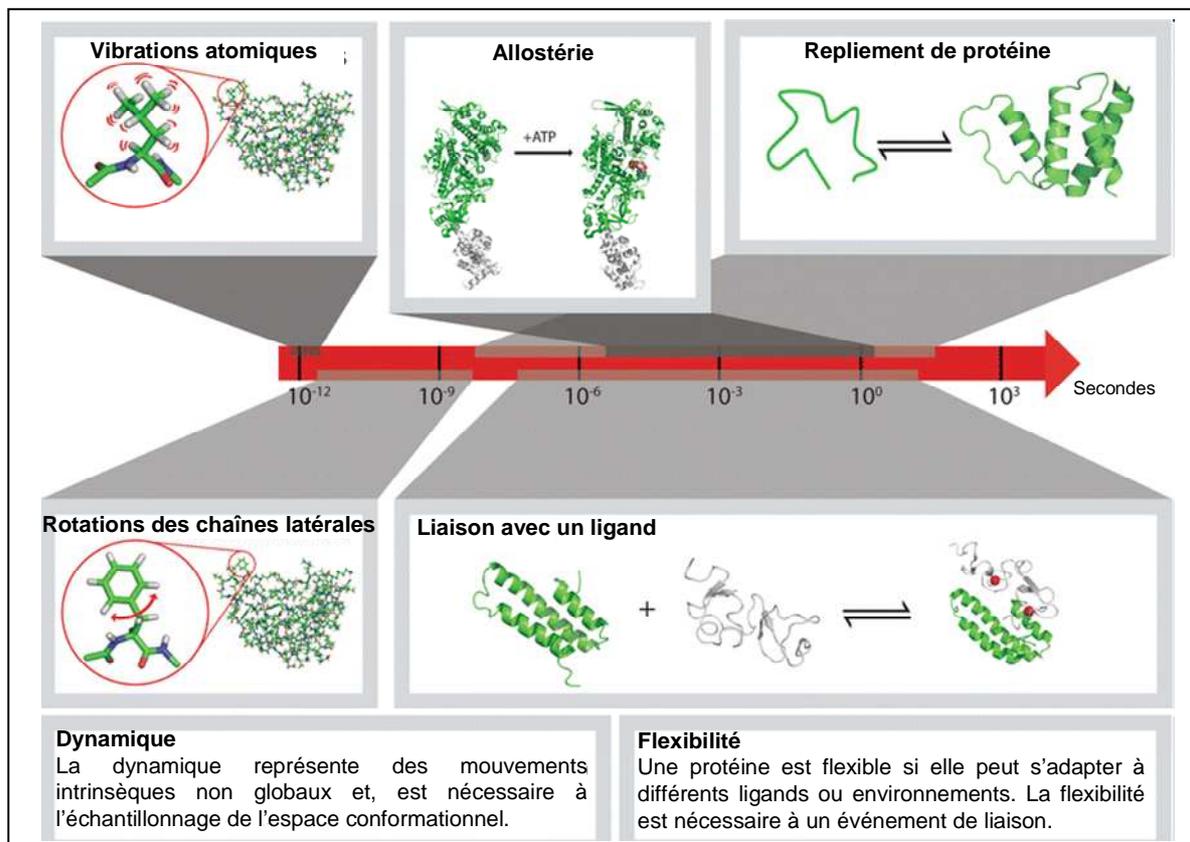


Figure 2 : Illustration schématisque des événements conformationnels dans une protéine. Les mouvements changeant la conformation d'une protéine se passent avec des constantes de temps allant de la femtoseconde à la centaine de seconde d'après [8].

A. La flexibilité d'une protéine et la thermodynamique

Pour comprendre la nature de la flexibilité d'une protéine et ainsi comment elle peut influencer la fonction d'une protéine, il est nécessaire d'analyser la thermodynamique des processus d'interaction protéine-ligand. La conformation d'une protéine change continuellement, des interactions sont rompues et d'autres sont formées. La thermodynamique de ces changements conformationnels prend en compte les types et les nombres d'interaction impliqués dans le processus. Si on considère une protéine P et un ligand L, on a : $P + L \leftrightarrow PL$.

A l'équilibre, le rapport entre les concentrations des molécules P et L et du complexe PL est donné par la constante d'équilibre (ou constante d'association) K_a suivante :

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

K_a peut aussi être exprimée en terme de différence dans l'énergie libre standard de Gibbs, ΔG° , entre les molécules non liées et le complexe : $\Delta G^\circ = -RT \ln K_a$. $\Delta G^\circ < 0$ signifie que l'énergie libre du complexe est plus faible que celles des molécules non liées c'est-à-dire que le complexe est énergétiquement favorisé. Dans ce cas, la formation du complexe est associée à une libération d'énergie tandis que sa dissociation coûte de l'énergie. ΔG° peut être décomposée comme résultant des variations dans l'enthalpie (ΔH°) et l'entropie (ΔS°) de formation du complexe : $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$. Un changement d'enthalpie est un changement dans l'énergie de toutes les interactions qui stabilisent les conformations du système. Dans un tel processus, les interactions qui sont perdues et celles qui sont formées donnent la variation d'enthalpie. Si $\Delta H^\circ < 0$, il y a plus d'interactions stabilisantes formées que rompues et l'énergie est libérée. Un changement dans l'enthalpie favorisera la réaction dans la direction où $\Delta H^\circ < 0$. L'entropie est une mesure du désordre. Le changement dans ΔS° mesure ainsi si le système devient plus ordonné ($\Delta S^\circ < 0$) ou plus désordonné ($\Delta S^\circ > 0$) après un processus. Si une réaction augmente le désordre, elle sera entropiquement favorisée [8]. En effet, si $\Delta S^\circ > 0$ et $\Delta H^\circ < 0$, on aura alors $\Delta G^\circ \ll 0$. La constante d'association K_a sera très grande et la réaction sera fortement déplacée vers la formation du complexe. En revanche, si on prend le cas d'une protéine désordonnée qui passe dans un état ordonné lors de son interaction avec un partenaire. ΔS° est alors négatif. S'il n'est pas compensé, on a ΔG° faiblement négatif voire nul. C'est ce qu'on appelle le coût entropique. Dans ce cas là, K_a est petit ce qui implique que la formation protéine-ligand a lieu mais n'est pas favorisée. Elle est donc réversible. C'est une notion indispensable pour tous les systèmes où ont lieu des processus d'association/dissociation rapide.

B. Flexibilité et interaction protéine-protéine/ligand

Pour fixer un ligand de manière spécifique, une protéine doit posséder ou être capable de former un site de liaison dont la stéréochimie, la configuration de charges et les groupements susceptibles de participer à des liaisons hydrogène sont complémentaires de ceux du ligand. Le premier essai pour décrire les processus d'interaction a été fait par Emil Fischer qui en 1894 suggérait un modèle représenté par une clé et une serrure (figure 3-A) [10]. Cette analogie convient à de nombreuses protéines et à leurs ligands, toutefois elle laisse penser que la protéine et le ligand sont rigides. En réalité, les protéines et les ligands qui s'y fixent sont tous deux naturellement flexibles, de sorte que la vision de Fischer a été progressivement remplacée par le modèle de l'ajustement induit suggéré par Daniel Koshland en 1958 (figure 3-B) [11]. Au cours de la liaison, chacun des partenaires peut ajuster sa structure grâce à la présence de l'autre. Ce mécanisme resta le seul décrit pendant 40 ans jusqu'à ce qu'une nouvelle vision du repliement des protéines émerge dans les années 1990 [12-13]. Selon l'étape limitante dans le processus d'interaction, différents modèles sont proposés comme le modèle d'équilibre préexistant ou de sélection conformationnelle (figure 3-C) [14-15] et le mécanisme de déplacement des populations [16].

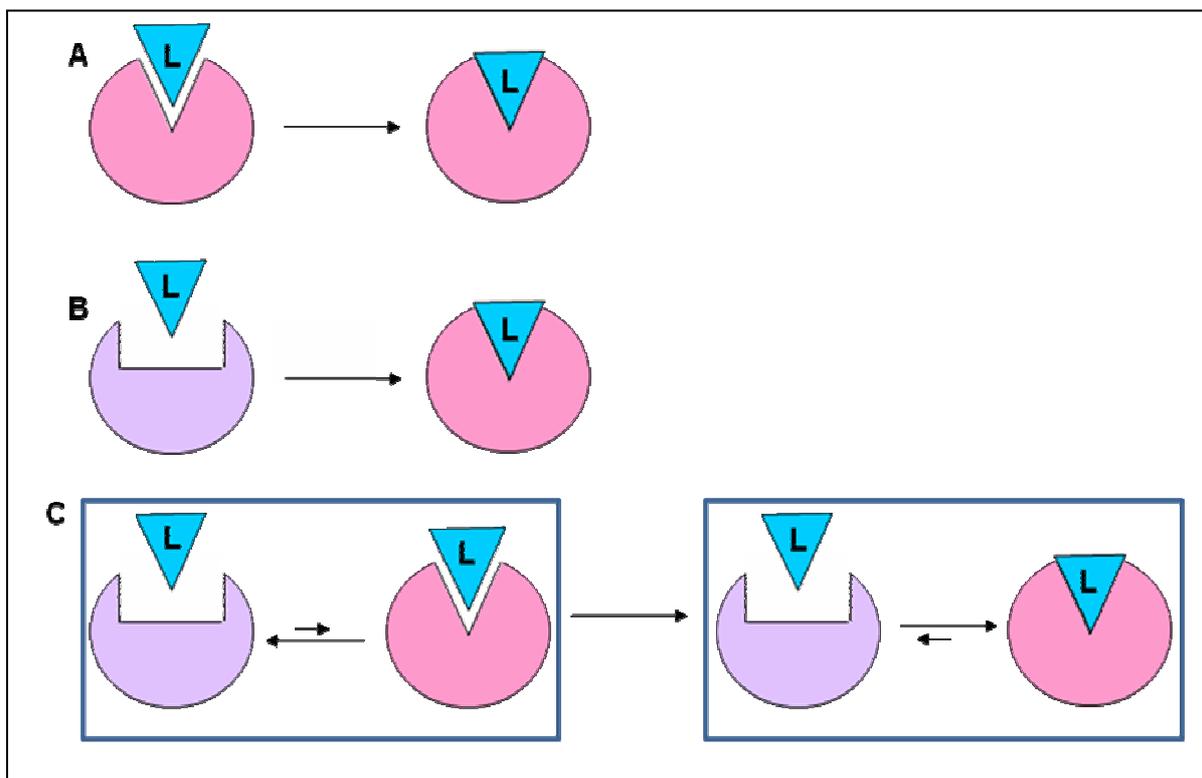


Figure 3 : Modèle de différents mécanismes d'interaction protéine-protéine/ligand. (A) Modèle classique de la clé et de la serrure. (B) Modèle de l'ajustement induit. (C) Modèle de la sélection conformationnelle. L = ligand. D'après [17].

La base de ces modèles est l'état non lié, qui existe comme un ensemble de conformations appelé isomères conformationnels ou conformères. Les conformères existent dans un équilibre avec une barrière d'énergie variable entre eux. Si toutes les barrières d'énergie entre les conformères sont faibles, l'ensemble peut être décrit comme une simple distribution Gaussienne avec seulement une structure moyenne détectable. Si les barrières d'énergie entre certains conformères ou sous populations de conformères sont grandes, deux ou plusieurs structures distinctes peuvent être observées à température ambiante.

C. Flexibilité et fonction protéique

Un grand nombre de systèmes est décrit dans la littérature où la flexibilité joue un rôle clé dans la fonction d'une protéine. Cette flexibilité peut représenter de petits mouvements comme des plus grands. On peut citer par exemple une étude faite sur les mouvements de chaînes latérales de résidus aromatiques situés près du site actif dans l'acétylcholine estérase (AChE) [18]. C'est une enzyme qui permet la dégradation de l'acétylcholine qui est un neurotransmetteur impliqué dans les processus de mémorisation et donc de grand intérêt dans l'étude de la maladie d'Alzheimer [19-20]. A l'aide des structures cristallographiques disponibles ainsi que des expériences de dynamique moléculaire, les auteurs ont pu montrer que deux de ses résidus possédaient une grande flexibilité. Ainsi, un grand nombre de conformations existent dans la protéine native permettant à un ligand donné de choisir sa conformation préférentielle parmi celles préexistantes [18].

Une autre étude montrant la présence d'un équilibre préexistant est celle de James *et al* sur un anticorps, Spe7 [21]. Cet anticorps existe dans deux conformations très différentes dans sa forme non liée. Les deux conformations ont été trouvées liant des ligands différents structurellement en utilisant différents sites de liaison. On peut voir également dans cette étude, la présence de deux mécanismes, la sélection conformationnelle comme explicitée précédemment mais suivie ensuite d'un ajustement induit. En effet, une conformation lie un type de ligand alors que la deuxième conformation ne le fixe pas. Le complexe résultant de cette interaction a été cristallisé dans une troisième conformation. On obtient ainsi le schéma de fixation du ligand suivant :

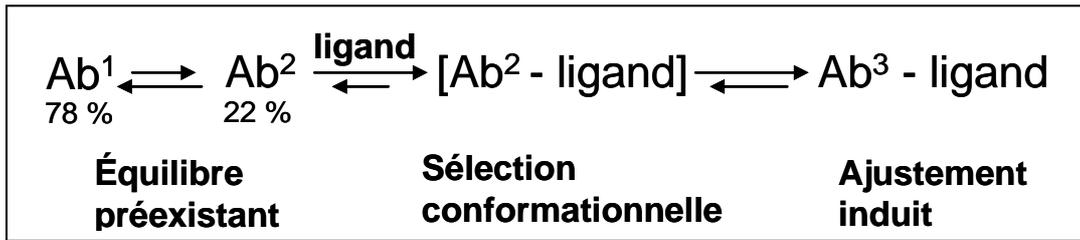


Figure 4 : Interaction d'un ligand avec l'anticorps Spe7. Deux conformations Ab^1 et Ab^2 sont en équilibre et seul Ab^2 lie le ligand. Le complexe ainsi formé subit un ajustement induit résultant dans un complexe stable [21].

Cette étude souligne le rôle potentiel de la diversité conformationnelle dans la réactivité croisée qui mène à des maladies auto-immunes et des allergies [22]. Certaines protéines subissent de forts réarrangements pour se trouver dans leur forme active, c'est le cas de l'exotoxine streptococcique pyrogénique B (SpeB). SpeB est une cystéine protéase qui est sécrétée comme un zymogène inactif (précurseur protéique d'une enzyme) [23]. Comme pour beaucoup de protéases, l'activation de SpeB implique une digestion protéolytique qui va libérer un pro-domaine pour donner l'enzyme active. Le déplacement de ce pro-domaine induit un grand réarrangement intramoléculaire. Une boucle se déplace de plus de 25 Å d'un pôle à un pôle opposé de la protéine, certaines contraintes stériques du site actif sont ainsi libérées. Une deuxième boucle, qui contient l'histidine catalytique, est ensuite libre de se déplacer loin du site de fixation du substrat. La conformation active de l'enzyme est atteinte et elle peut remplir sa fonction.

1.2 Les protéines intrinsèquement désordonnées (PID)

1.2.1 Le dogme de la relation structure-fonction et la découverte des PID

En biologie, l'un des piliers est le dogme de la relation entre la structure et la fonction des protéines et a été largement étudiée. Il a longtemps été admis que la séquence d'une protéine dictait sa structure tridimensionnelle et que cette structure impliquait une seule fonction [24]. Cependant, dans les années 1990, la découverte de protéines qui à l'état natif ne sont pas ou peu structurées commence à faire vaciller le dogme. Le développement des techniques spectroscopiques a permis d'accélérer l'étude des structures tridimensionnelles des protéines désordonnées. L'idée que des protéines pouvaient être actives en étant non structurées devenait de plus en plus forte. C'est ainsi qu'en 1999 paraît un article de Jane Dyson et Peter Wright qui réévalue le dogme structure-fonction établissant qu'une protéine

devait être structurée pour être active [25]. Il est maintenant admis qu'une protéine peut être partiellement ou totalement déstructurée et active. Depuis, l'importance du rôle biologique de ces protéines ne cesse de croître et une base de données appelée Disprot a même été créée (<http://www.disprot.org/>) [26]. En juillet 2011, 645 protéines et 1388 régions désordonnées y étaient référencées. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques, en particulier dans la régulation de processus cellulaires clefs. De plus, les PID semblent particulièrement importantes dans de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington [27].

1.2.2 Caractéristiques des PID et classification

La présence de désordre au sein des PID est due à leur composition particulière en acides aminés. En effet, les protéines globulaires, bien structurées, possèdent des résidus hydrophobes permettant de former le cœur de la protéine et des résidus plutôt chargés à la surface. Une étude a été faite entre la composition en acides aminés de protéines globulaires et de protéines intrinsèquement désordonnées (tableau 1) [28]. On observe que les PID sont significativement enrichies en acides aminés P (proline), E (acide glutamique), K (lysine), S (sérine) et Q (Glutamine) et appauvries en W (tryptophane), Y (tyrosine), F (phénylalanine), C (cystéine), I (isoleucine), L (leucine) et N (asparagine). Elles ont une charge nette élevée et une faible hydrophobicité excluant la formation de cœur hydrophobe et favorisant une conformation étendue par répulsion électrostatique.

Dans le cas de la CP12, la composition en acides aminés est proche de celle des protéines intrinsèquement désordonnées à quelques exceptions près. En effet, on peut remarquer que la CP12 possède 4 cystéines, proportion élevée pour une protéine désordonnée. Mais c'est grâce à la présence de ces résidus que la CP12 possède quelques éléments de structure lorsqu'elle est oxydée comme nous le verrons dans le chapitre 5. En ce qui concerne NarJ, sa composition en acide aminé est semblable, à quelques exceptions près, à celle d'une protéine globulaire avec un fort pourcentage de résidus hydrophobes qui lui permet d'être majoritairement structurée.

Tableau 1 : Pourcentage en acides aminés pour des PID [28], des protéines globulaires [28], la protéine CP12 et la protéine NarJ (les deux protéines étudiées au cours de cette thèse). Les valeurs en bleu représentent les acides aminés au moins deux fois plus présents dans les PID que les protéines globulaires, les valeurs roses les acides aminés deux fois moins représentés.

Acides aminés	PID	Protéine Globulaire	CP12	NarJ
Ala (A)	7,15	8,15	18,75	13,1
Arg (R)	4,21	4,61	1,25	5,50
Asn (N)	2,06	4,66	1,25	1,70
Asp (D)	5,05	5,78	15,00	8,10
Cys (C)	0,61	1,64	5,00	0,40
Gln (Q)	4,46	3,69	2,50	7,60
Glu (E)	14,26	5,98	8,75	8,10
Gly (G)	4,31	7,99	2,5	4,70
His (H)	1,51	2,33	1,25	3,40
Ile (I)	3,67	5,43	0,00	4,20
Leu (L)	5,44	8,37	5,00	14,80
Lys (K)	10,43	6,05	10,00	3,40
Met (M)	1,30	2,03	0,00	1,70
Phe (F)	1,66	3,95	1,25	3,40
Pro (P)	12,07	4,61	3,75	3,80
Ser (S)	6,91	6,31	5,00	4,70
Thr (T)	5,14	6,15	5,00	3,40
Trp (W)	0,32	1,55	1,25	0,80
Tyr (Y)	1,42	3,64	1,25	3,00
Val (V)	8,02	7,00	11,25	4,20

A l'inverse des protéines globulaires, les protéines intrinsèquement désordonnées ne possèdent pas de structure unique, mais un ensemble de conformations qui s'interconvertissent les unes avec les autres. Cette dynamique de conversion est très variable selon les protéines, ce qui implique un désordre structural plus ou moins important. Il était donc nécessaire de classer les différentes formes de PID pour mieux comprendre leur

mode de fonctionnement. C'est ainsi que de nouveaux termes, « molten globule », « premolten globule » et « random coil » ont fait leur apparition. C'est ce qui fut appelé la « trinité des protéines ». Les « molten globule » possèdent toutes leur structure secondaire mais leur structure tertiaire est fluctuante. Le désordre est relativement faible. Les « premolten globule » n'ont plus de structures secondaires stables mais des interactions entre des chaînes peptidiques maintiennent la protéine dans une ou plusieurs conformations plus ou moins compactes. Cet état correspond à des protéines possédant un désordre structural important mais avec des structures résiduelles irrégulières, stables ou transitoires possibles. Le terme « random coil » est employé pour une PID quand aucune structure résiduelle n'a été détectée dans la protéine libre en solution.

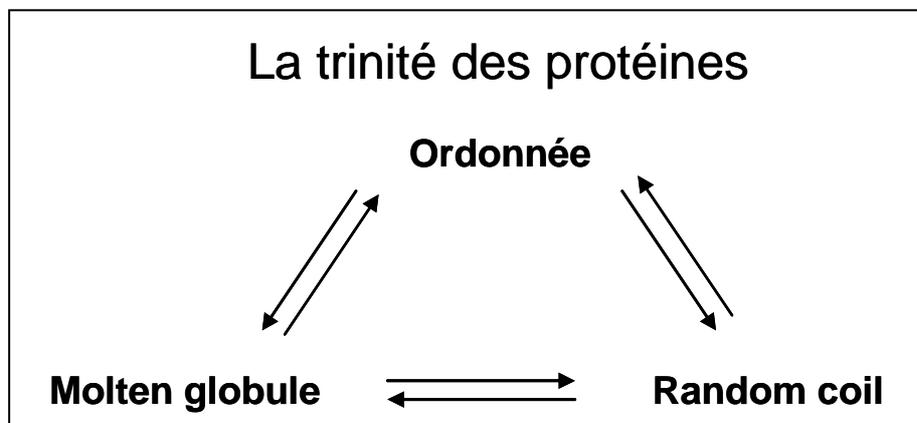


Figure 5 : Vision de la « trinité des protéines » suggérant que la structure de l'état natif d'une protéine inclut ces trois états et que la fonction d'une protéine peut être portée non seulement par l'état natif mais également par une de ces trois transitions [29].

Ces trois nouveaux termes ont été regroupés dans ce qui fut appelé la « trinité des protéines » (figure 5) [29]. Dans ce schéma, les protéines peuvent exister dans un de ces trois états thermodynamiques. Le point clé de cette « trinité des protéines » est qu'une fonction particulière peut dépendre d'un de ces trois états ou d'une transition entre deux états. Dans ce schéma, ce n'est pas seulement l'état ordonné mais n'importe lequel de ces trois états qui peut être l'état natif de la protéine.

1.2.3 Les différentes fonctions des PID

Le mode d'action des PID a permis de les classer en six groupes (figure 6). Cinq d'entre elles font intervenir des mécanismes de reconnaissance moléculaire et sont réparties en deux groupes selon le type d'interaction : transitoire ou permanente [30].

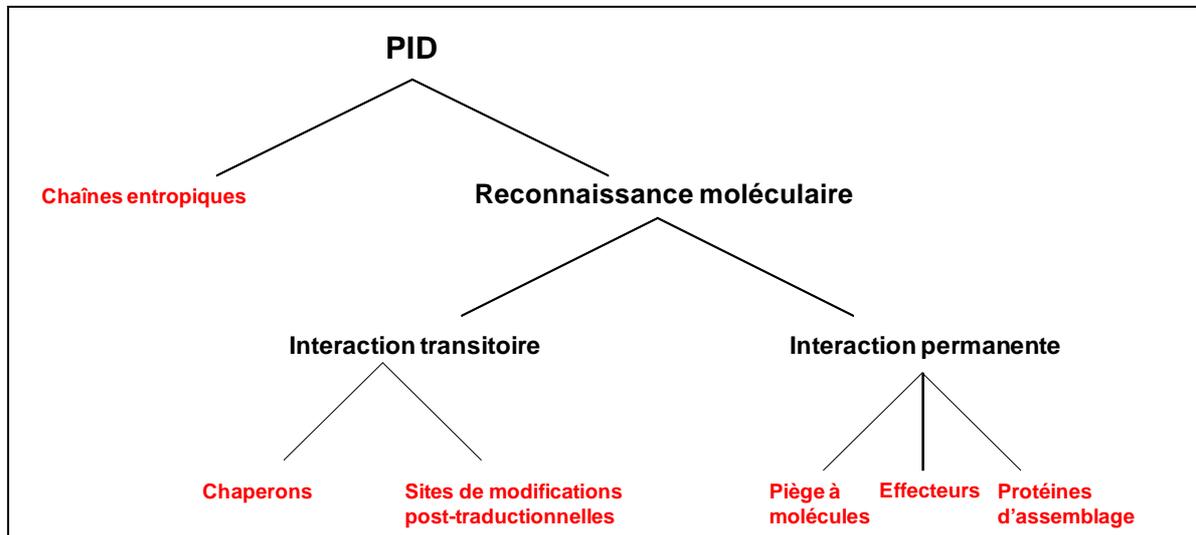


Figure 6 : Classification des PID selon leur fonctions [30].

La première classe fonctionnelle est celle des chaînes entropiques, fonction remplie sans aucune interaction avec un partenaire. Ces protéines (ou linkers) permettent de relier entre eux plusieurs domaines fonctionnels d'une même protéine ou de protéine différente. On peut citer par exemple la protéine MAP2 associée aux microtubules qui permet de maintenir un espace entre les microtubules [31] ou bien la protéine géante titine qui possède une région désordonnée fonctionnant comme un ressort et permettant l'élasticité des muscles [32].

Pour les autres cinq classes, la fonction des PID passe par une reconnaissance moléculaire, c'est-à-dire une interaction transitoire ou permanente avec une autre macromolécule ou un ligand. Dans les interactions transitoires, on a tout d'abord les protéines subissant des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation est la modification la plus souvent rencontrée pour les PID [33]. La deuxième classe de cette catégorie représente les chaperons. Ces chaperons peuvent interagir avec un grand nombre de partenaires et sont capables d'assembler et de replier correctement d'autres protéines sans faire partie de leur structure finale. Le rôle de chaperon pour une PID a été montré pour l' α -synucléine [34] et l' α -caséine [35] qui sont des protéines totalement désordonnées pouvant protéger plusieurs protéines de l'agrégation. A noter qu'une nouvelle structure de

l' α -synucléine a été publiée montrant qu'elle forme en fait un tétramère parfaitement replié [36].

En ce qui concerne les transitions permanentes, on trouve les effecteurs. Ils lient et modifient l'activité de leur partenaire enzymatique [28]. Leur action peut être inhibitrice ou activatrice. Un exemple particulier est la protéine effectrice p21^{Cip1} et son homologue p27^{Kip2}. Ils inhibent les kinases dépendantes des cyclines (Cdk) mais sont aussi capables d'assembler un complexe Cdk-cycline menant à l'activation de Cdk [37]. On trouve également la classe des protéines d'assemblage qui assemblent des complexes. On les trouve intervenant dans l'assemblage de ribosomes, du cytosquelette, de la chromatine, de complexes de pré-initiation de la transcription comme c'est le cas du domaine KID de CREB [38]. Enfin le dernier groupe comprend les protéines pièges à molécules qui stockent et/ou neutralisent de petits ligands. Un exemple de ce mode d'action est la caséine qui permet d'inhiber la précipitation du phosphate de calcium dans le lait en piégeant le calcium [39]. De même, les glycoprotéines riches en proline, présentes dans la salive des animaux, neutralisent les composés polyphénoliques des plantes [40].

La plupart des protéines intrinsèquement désordonnées ont en outre la capacité de se lier à plusieurs partenaires. P. Tompa a rassemblé plusieurs exemples de PID capables d'avoir des effets opposés suivant le partenaire auquel elles se lient, ou capables d'activer et d'inhiber le même partenaire selon la manière dont la PID se lie à lui. Il a rassemblé ces protéines dans la famille des protéines « moonlighting » [41].

1.2.4 Interactions protéine-protéine chez les PID

Avec la découverte des PID vient aussi celle d'un mécanisme d'interaction très original qu'elles possèdent et qui leur permet de se replier et d'obtenir des éléments de structure secondaires stables lors de l'interaction [42]. Ce processus est appelé repliement induit et peut être considéré comme le cas extrême de l'ajustement induit vu précédemment. De nombreux exemples de protéines pouvant réaliser des transitions désordre/ordre existent dans la littérature. Le domaine KID (domaine d'activation de la transcription inductible par les kinases) de CREB (protéine agissant comme facteur de transcription liant l'AMP cyclique) est le plus étudié. Le polypeptide KID est intrinsèquement désordonné quand il est libre en solution [43-44] mais se replie pour former une paire d'hélice orthogonales lorsqu'il interagit avec la protéine CBP (figure 7) [38]. On peut également citer les nucléoprotéines de virus tels que le virus de la rougeole, le virus de Sendai ou Henipavirus. En effet, le domaine C-terminal de ces nucléoprotéines est

totalement désordonné lorsqu'il est seul en solution. La présence de son partenaire induit la formation d'une hélice α et la protéine se retrouve dans un état plus ordonné [45-47].

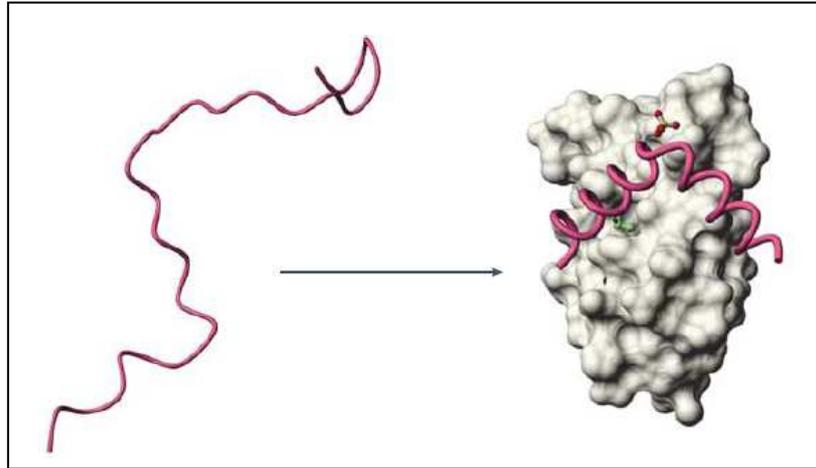


Figure 7 : Repliement induit du polypeptide KID lors de son interaction avec CBP. On observe une transition désordre \rightarrow paire d'hélices α [38].

Depuis 2008, un nouveau terme est apparu regroupant les protéines intrinséquement désordonnées qui se lient de manière floue « fuzzy » à leur partenaire. En effet, certaines protéines gardent des régions plus ou moins mobiles bien qu'impliquées dans l'interaction, adoptant ainsi quelques conformations alternatives. C'est ce que P. Tompa a appelé le polymorphisme qui conduit à des « fuzzy complexes » [48].

1.3 Techniques expérimentales pour étudier la flexibilité structurale des protéines

1.3.1 La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Le contenu en structure secondaire d'une protéine peut être déterminé par la spectroscopie RMN. La RMN mesure les propriétés magnétiques de certains noyaux comme le proton ^1H , l'azote ^{15}N ou le ^{13}C .

La détermination de la structure des protéines à partir des données RMN passe par deux étapes. La première consiste à établir la liste des déplacements chimiques de tous les noyaux observables de la protéine, ^1H , ^{15}N , ^{13}C , en utilisant les spectres à trois dimensions corrélant les atomes au travers des liaisons chimiques. La seconde étape comprend l'analyse des expériences NOE (Effet nucléaire Overhauser) qui édite les corrélations résultant de la

proximité spatiale des différents noyaux. Les corrélations sont attribuées à des couples de noyaux et sont introduites sous forme de contraintes de distance dans une procédure de modélisation moléculaire. L'ensemble de ces contraintes de distance représente un maillage avec lequel le modèle structural de la protéine doit être compatible (figure 8). Autrefois limité à l'étude de petites protéines de moins de 70 résidus, la méthode a été élargie plus récemment à la résolution de structures de complexes entre macromolécules [49] ou de complexes de protéines en interaction avec des petites molécules, comme par exemple des composés pharmaceutiques.

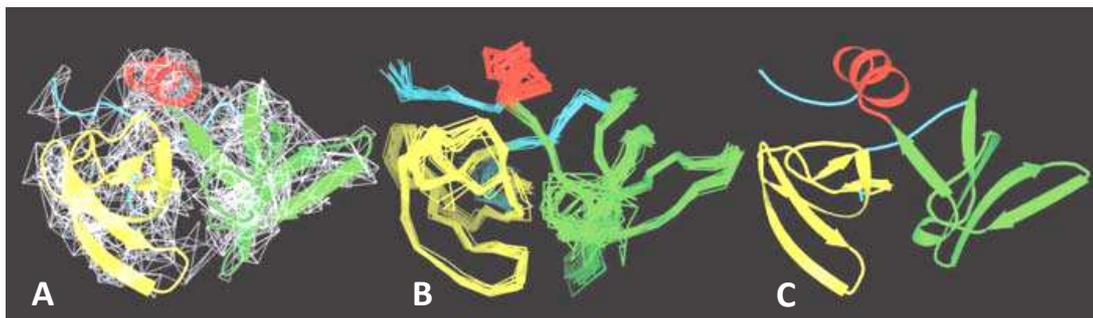


Figure 8 : Détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine 53BP1 [50]. (A) Ensemble de contrainte établissant un maillage de distances (en blanc) qui définissent la structure de la protéine. (B) Ensemble de structures très proches compatibles avec les données expérimentales. (C) Représentation de la structure de la protéine : deux feuillets β (jaune et vert), une hélice α (rouge) et deux liens flexibles (bleu).

Cependant, l'étude de protéines flexibles avec plusieurs conformations en solution ou de protéines intrinsèquement désordonnées par RMN reste délicate. En effet, le spectre RMN de ces protéines est très complexe à analyser car les pics sont très peu éclatés et souvent difficiles à distinguer d'un résidu à l'autre. Cependant de grands progrès sont en cours avec notamment l'établissement d'une procédure pour une attribution automatique des pics de résonance de protéines désordonnées d'au moins 150 résidus [51]. Deux techniques sont de plus en plus utilisées pour obtenir des informations sur la structure globale de protéines ainsi que la dynamique : la RDC (Residual Dipolar Coupling) et la PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement). La RDC a été fortement développée depuis le début des années 2000 avec un grand nombre de revues traitant de cette technique [52-55]. Le couplage résiduel dipolaire provient d'une légère anisotropie d'orientations des molécules dans le champ magnétique. Cette technique peut être aussi bien utilisée pour déterminer l'orientation de domaines indépendants structurés [56], ou pour déterminer le

repliement de structures d'acides nucléiques [57]. Elle est également très bien adaptée à l'étude des protéines intrinsèquement désordonnées [58-59]. La PRE est une technique qui nécessite l'introduction d'une sonde paramagnétique. Elle permet d'accélérer (et donc faire disparaître les signaux RMN) les propriétés de relaxation des noyaux magnétiques se trouvant dans l'environnement du radical. L'observation de l'influence de cette sonde sur les signaux RMN permet de détecter des contraintes à longue distance (de 5 à 30 Å). Depuis les premiers travaux de Gillespie et Shortle [60-61], la PRE ouvre aujourd'hui de nouvelles perspectives dans la recherche de structures résiduelles de protéines désordonnées [62-63].

1.3.2 Le Dichroïsme Circulaire (CD)

L'estimation du contenu en structure secondaire permet de distinguer les « molten globule » des « random coils » et des « premolten globule ». Le dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (180 – 250 nm) est une technique qui est utilisée pour déterminer et suivre la structure secondaire des protéines en solution [64]. Cette technique est basée sur la capacité des molécules ayant une activité optique d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche. Ainsi, si après le passage de la lumière polarisée à travers l'échantillon, les composantes droite et gauche sont d'absorbances équivalentes, on obtiendra la même résultante que pour la lumière polarisée initiale. Par contre, si l'échantillon contient une molécule optiquement active, on pourra obtenir un signal car la résultante sera différente, la polarisation deviendra elliptique après la traversée de l'échantillon. Le spectromètre mesure la différence d'absorbance entre la composante de la lumière de polarisation circulaire droite et la composante de la lumière de polarisation circulaire gauche, A_D et A_G . On a donc :

$$\Delta A = A_G - A_D$$

La grandeur mesurée est l'ellipticité θ exprimée en degrés et la relation entre ΔA et θ est :

$$\theta = 32,98 \Delta A$$

Un spectre CD est obtenu en mesurant θ en fonction de la longueur d'onde λ . Cette grandeur est notée θ_λ .

Dans les protéines, il y a deux types de chromophores optiquement actifs : les liaisons peptidiques (absorption dans une gamme de 180 à 240 nm) et les groupements latéraux des acides aminés aromatiques (absorption dans une gamme de 260 à 320 nm). Les spectres CD reflètent la symétrie de l'environnement de la liaison peptidique et indiquent le contenu de structure secondaire dans la protéine. Les hélices α , les feuilletts β , les boucles et les régions désordonnées donnent des spectres CD caractéristiques facilement identifiables

quand un de ces éléments est dominant. Généralement, les protéines contiennent un ensemble de ces éléments et des méthodes de déconvolution ont été développées pour analyser les spectres CD d'une protéine et déterminer le contenu relatif de chaque élément [65-66]. Le spectre CD d'une protéine contenant des hélices α est caractérisé par deux minima à 208 et 222 nm, ainsi qu'une bande fortement positive à 192 nm. Le spectre CD d'une PID est caractérisé par l'absence de structure secondaire. Il possède une bande négative intense à 200 nm, une bande assez faible négative ou positive à 222 nm et une ellipticité proche de 0 vers 185 nm. Le spectre CD d'un feuillet β est situé entre l'hélice α et l'état désordonné, avec une bande positive à 192 nm mais moins intense que dans le cas de l'hélice α ainsi qu'une large bande négative à 218 nm (figure 9).

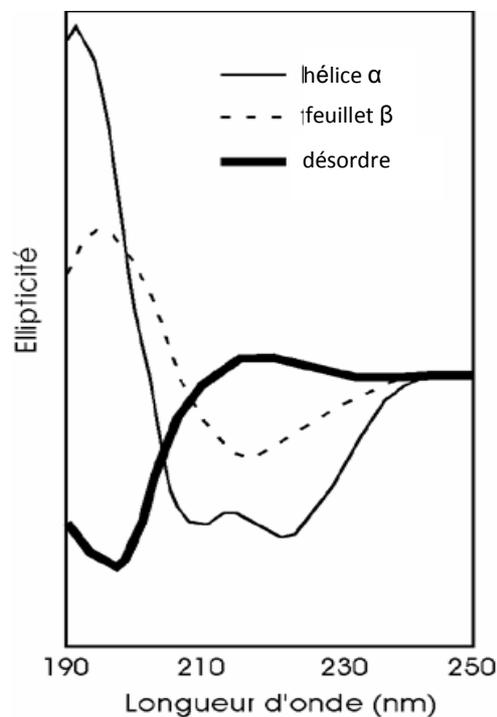


Figure 9 : Spectres CD UV-lointain typiques de protéines désordonnées, et de protéines contenant majoritairement des hélices α ou des feuillets β .

Les protéines qui possèdent des régions désordonnées avec des domaines structurés sont plus nombreuses que celles qui sont entièrement déstructurées [29]. La caractérisation de ces régions par CD est par conséquent un problème complexe. Une approche consiste à déterminer les régions structurées qui sont résistantes à la digestion protéolytique [67], de cloner et d'exprimer les régions de protéines qui sont entre ces régions résistantes, et de les caractériser. Une autre méthode est l'introduction de mutations qui déstabilisent ou stabilisent des types spécifiques de structures secondaires.

Un exemple d'application de détermination de domaine structuré par digestion protéolytique est la protéine MeCP2 qui possède au moins un domaine ordonné et des régions étendues désordonnées [68]. Cette protéine est un répresseur transcriptionnel qui est capable de moduler l'expression de certains gènes dans le noyau des cellules qui l'expriment. Il a été montré que des mutations de MeCP2 entraînaient des maladies neurologiques sévères comme le syndrome de Rett [69]. Adams *et al* [70] ont étudié MeCP2 avec différentes techniques biophysiques dont le CD avec digestion protéolytique pour élucider le domaine structuré. Le spectre CD de la protéine entière a été analysé [71], puis des expériences de digestion de protéase [70] ont été réalisées donnant plusieurs fragments, dont deux coïncidaient avec des domaines identifiés auparavant : MBD, un domaine liant la méthylcytosine [72] et le TRD, un domaine de répression transcriptionnelle [73]. Les spectres CD de ces domaines sont montrés sur la figure 10 : le spectre de MBD correspond à un domaine en grande partie structuré [71]. La structure de MBD a été déterminée par RMN [74] et les données CD sont en accord avec cette structure. Le spectre de TRD est quant à lui caractéristique d'une protéine désordonnée. A partir de ces résultats, complétés par d'autres obtenus par différents tests biochimiques, Adams *et al* suggèrent que la structure tertiaire de MeCP2 est majoritairement composée de feuillets β connectés par des régions désordonnées.

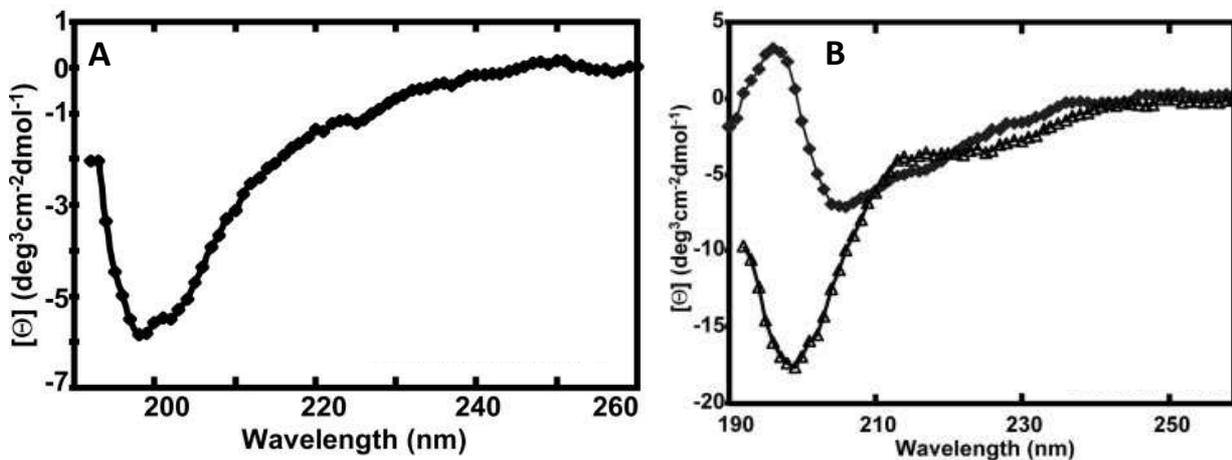


Figure 10 : Spectres CD de la MeCP2 (A) et de deux de ses fragments (B) : MBD (◆) et TRD (▲). Les spectres ont été analysés avec le logiciel CDPro permettant la quantification des structures secondaires [70].

Le CD peut également être utilisé pour mettre en évidence un repliement induit sur une protéine totalement désordonnée. Une illustration de repliement induit est vue avec le

domaine C-terminal de la nucléoprotéine du virus de la rougeole (Ntail) en présence ou en absence de TFE (2,2,2-trifluoroéthanol) [45, 75] (figure 11). Le spectre CD de la protéine seule est typique d'une protéine désordonnée. L'ajout de TFE, un solvant qui mime l'environnement hydrophobe présent lors d'interactions protéine-protéine, induit un repliement de type α -hélicale détectable par CD [76]. Plus précisément, un gain d' α -hélicité est observé indiquant une transition d'un état déstructuré vers une structure en hélice α .

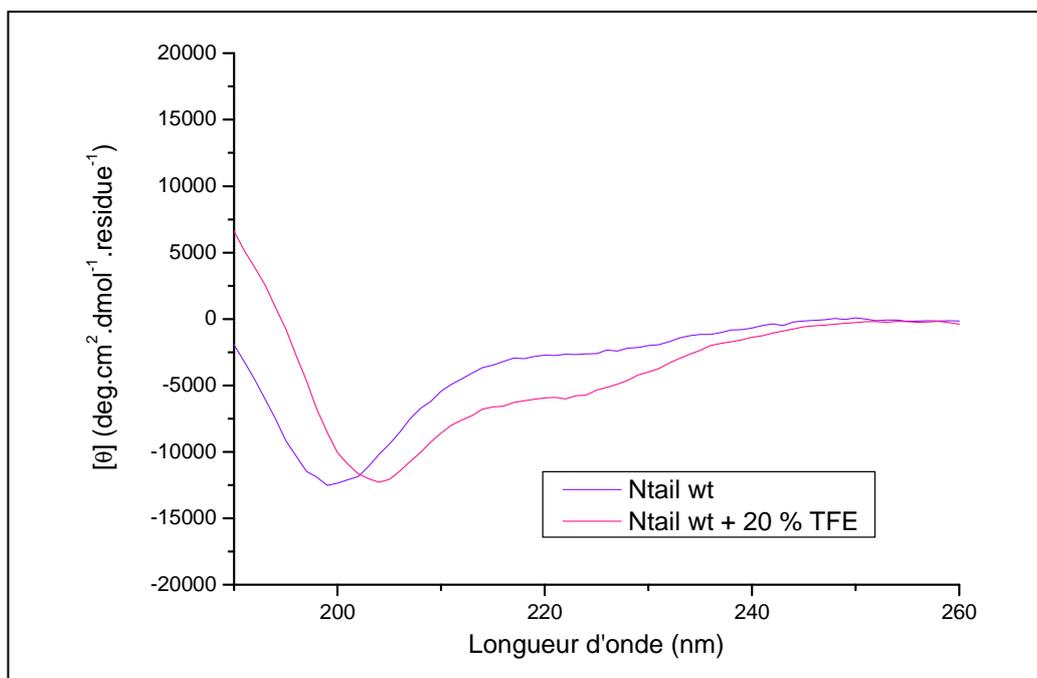


Figure 11 : Spectres CD du domaine C-terminal de la nucléoprotéine du virus de la rougeole : Ntail wt, seule en solution (violet) ou en présence de 20 % de TFE (rose) d'après [77].

L'accès à la structure locale secondaire peut apporter des informations cruciales sur la localisation de structures résiduelles qui pourraient représenter de possibles sites de repliements induits. Les spectres de Dichroïsme Circulaire dans la région du proche ultraviolet (proche-UV CD, 250 – 350 nm) reflètent la symétrie de l'environnement des résidus aromatiques et caractérisent la structure tertiaire des protéines ordonnées. Les signaux dans la région 250 – 270 nm sont attribuables aux résidus phénylalanines, tandis que les signaux dans les régions 270 – 290 nm et 280 – 300 nm sont attribuables aux résidus tyrosines et tryptophanes respectivement [74]. Enfin, les ponts disulfure créent des signaux larges et de faible intensité dans tout le spectre proche-UV [78]. Les spectres CD proche-UV apportent donc une empreinte détaillée de la structure tertiaire autour de ces résidus spécifiques. Les protéines avec une structure tertiaire rigide sont caractérisées par un spectre CD intense, avec une unique structure fine, qui reflète l'environnement asymétrique

unique des résidus aromatiques individuels. D'autre part, le manque de structure ordonnée dans une protéine contenant des résidus aromatiques peut être facilement détecté. En fait, il a été montré que la diminution du spectre CD avec une faible intensité et une faible complexité était une caractéristique particulière des protéines partiellement structurées. Cependant, dans quelques cas, des PID peuvent posséder un spectre plutôt complexe suggérant que leurs résidus aromatiques sont dans un environnement relativement asymétrique, c'est-à-dire que ces protéines contiennent quelques structures tertiaires résiduelles dans ces régions comme par exemple la caldesmone nativement déstructurée [79].

Enfin la spectroscopie CD UV proche et lointaine combinée ensemble peuvent permettre de distinguer si une protéine est structurée, « molten globule » ou « random coil ». Cependant, ces méthodes sont seulement semi-quantitatives et fournissent des informations structurales globales.

1.3.3 La spectroscopie de Fluorescence

La spectroscopie de Fluorescence est une technique largement utilisée pour étudier diverses protéines, incluant les protéines intrinsèquement désordonnées, ainsi que pour révéler les transitions structurales des protéines. Les protéines contiennent seulement trois chromophores intrinsèques fluorescents, qui sont ordonnés selon leur rendement quantique de la façon suivante : tryptophane > tyrosine > phénylalanine. La fluorescence la plus utilisée est celle du tryptophane car le rendement quantique de la phénylalanine est extrêmement faible et la fluorescence de la tyrosine est fortement éteinte dans la majorité des cas [80]. Le tryptophane a une absorbance maximale proche de 280 nm et une émission maximale qui dépend fortement de la polarité de son environnement. En particulier, un tryptophane dans un environnement non polaire (c'est-à-dire enfoui dans une protéine) a une émission maximale proche de 320 nm, tandis que pour un environnement polaire (c'est-à-dire exposé au solvant) il a une émission maximale proche de 350 nm [80-81]. La valeur de la longueur d'onde au maximum d'émission λ_{\max} , peut ainsi donner des informations sur la compacité d'une protéine. Cependant, l'intensité de fluorescence d'un tryptophane dépend des interactions avec les groupements voisins, qui peuvent mener à un partage et un transfert de l'énergie d'excitation [82]. Ce phénomène a pour effet de réduire fortement le rendement quantique et de diminuer l'intensité de fluorescence, phénomène connu sous le nom d'extinction de la fluorescence. Ainsi, le spectre de fluorescence d'une PID apporte des informations utiles sur l'environnement du fluorophore, et donc sur la présence de structure ordonnée résiduelle dans son voisinage [83]. Cependant, de nombreuses protéines

possèdent plusieurs résidus tryptophanes et l'émission totale de la protéine apporte alors des informations moyennes sur l'ensemble de la protéine. Extraire et évaluer la contribution de chacun, et ainsi suivre les changements conformationnels se déroulant dans différentes régions de la macromolécule, est un défi difficile à relever.

On peut citer en exemple l'étude faite par Permyakov *et al* sur l'interaction entre le domaine C-terminal de la caldesmone et la calmoduline. La caldesmone est une protéine impliquée dans la régulation des muscles lisses, dans la motilité non musculaire et dans la formation du cytosquelette [84-85]. Le domaine C-terminal de la caldesmone de gésier de poulet (CaD136) a fait l'objet de cette étude. Lorsqu'elle est libre, la CaD136 n'a pas de structure globulaire, possède un faible contenu en structure secondaire, et n'est pas compacte ce qui la classe dans la famille des protéines nativement dépliées [79]. Il est clairement visible que le spectre de CaD136 libre a un maximum vers 350,2 nm, valeur proche de celle du tryptophane dans l'eau (353 nm) (figure 12). Ceci indique que les résidus tryptophanes de CaD136 sont presque totalement exposés à l'eau. Lorsque la calmoduline est ajoutée, on observe une augmentation considérable (1,9 fois) du rendement quantique de fluorescence et un déplacement prononcé dans le bleu du spectre de fluorescence (17 nm) de la CaD136, reflétant le passage des tryptophanes dans un environnement moins mobile et/ou moins polaire, du à l'interaction entre les deux partenaires.

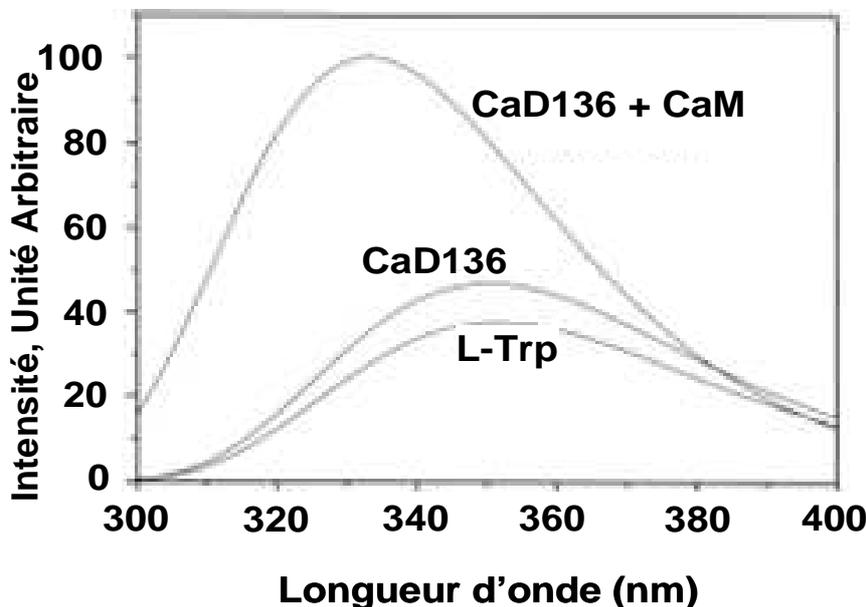


Figure 12 : Spectres de fluorescence de la protéine CaD136 libre et liée à la calmoduline. La longueur d'excitation est de 296,7 nm. Le spectre du tryptophane en solution dans l'eau (L-Trp) est montré pour comparaison [79].

En effectuant un titrage de la calmoduline une constante de dissociation K_d a pu être mesurée et une valeur de $1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a été trouvée [79].

1.3.4 La Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La spectroscopie FT-IR est une méthode efficace pour étudier la structure secondaire des protéines, leur stabilité et leur agrégation à travers l'analyse du spectre d'absorption de la protéine dans l'infrarouge. Le spectre infrarouge d'une protéine peut être mesuré par différentes techniques de préparation d'échantillon : en solution (mesures en transmission ou en réflexion totale atténuée) ou en film protéique (mesure en réflexion totale atténuée). Les principales bandes d'absorption des protéines en infrarouge sont dues aux modes vibrationnels des groupements amide de la chaîne polypeptidique de la protéine, et sont appelées bande amide I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$), bande amide II ($1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) et bande amide III ($1400 - 1200 \text{ cm}^{-1}$) [86]. La bande amide I est la plus utilisée pour l'analyse de la structure secondaire des protéines. La bande amide II est particulièrement adaptée pour étudier la flexibilité de la structure de protéines [87].

Une des difficultés principales de la technique est l'attribution des différentes bandes d'absorption du spectre. Il est possible d'attribuer distinctement des composantes de la bande amide I à des éléments spécifiques de structures secondaires d'une protéine selon la position de leurs pics [88] :

- Les hélices α sont trouvées dans la région $1660 - 1648 \text{ cm}^{-1}$. La position de cette bande dépend de la longueur de l'hélice, de sa flexibilité et de son hydratation. En particulier, pour des grands nombres d'onde, les hélices sont courtes et flexibles, tandis que les petites valeurs sont associées à des structures longues et rigides [89]. Par exemple, la phospholipase A2 libre en solution possède une seule bande d'absorption pour les hélices α autour de 1650 cm^{-1} ; cependant quand elle est liée à la bicouche lipidique, une valeur de 1658 cm^{-1} est trouvée, reflétant une plus grande flexibilité des hélices α lorsqu'elle est liée [90]. Cette augmentation de flexibilité a été confirmée par des expériences d'échanges H/D [90].
- Les feuillets β intramoléculaires possèdent deux bandes d'absorption de différentes intensités. Pour les structures antiparallèles, une bande basse fréquence est trouvée autour de 1633 cm^{-1} et une bande haute fréquence autour de 1686 cm^{-1} . Pour les feuillets β parallèles, la bande à basse fréquence est légèrement plus grande tandis que la bande à haute fréquence est plus faible que les feuillets antiparallèles [88]. Les structures en feuillets β intermoléculaires dans les protéines assemblées possèdent également deux bandes d'absorption mais avec des positions décalées (1625 cm^{-1} et 1695 cm^{-1}).

- L'absorption du groupement C=O dans les « random coil » est due aux contributions des liaisons peptidiques dans différents environnements, menant par conséquent à une bande large centrée autour de 1654 cm^{-1} . Cependant, cette bande est superposée à celle correspondant aux hélices α . Par échange H/D, un déplacement vers 1645 cm^{-1} est observé permettant de discriminer cette bande par rapport à celle des hélices [86].

Un exemple d'application de la spectroscopie FT-IR est la caractérisation de transitions conformationnelles du domaine AF1 du récepteur androgène [91]. La dérivée seconde du spectre FT-IR de AF1 montre une large enveloppe dans la région de la bande amide I, où quelques composantes de faible intensité peuvent être observés, suggérant une structure totalement désordonnée. Parmi les partenaires physiologiques du récepteur androgène, on trouve la protéine RAP74, sous unité du facteur de transcription TFIIIF. La figure 13-A montre la dérivée seconde du spectre des deux protéines libres en solution ainsi que du mélange des deux. Le spectre de AF1 indique un état déstructuré de la protéine tandis que le spectre de son partenaire est caractérisé par une composante typique d'une hélice α autour de 1656 cm^{-1} . Le spectre du mélange est lui aussi dominé par une forte composante à 1656 cm^{-1} qui n'est cependant pas obtenu en additionnant les spectres individuels des deux partenaires (figure 13-B). Ce résultat indique qu'une transition conformationnelle vers une structure en hélice α est induite par l'interaction avec la protéine RAP74 [91].

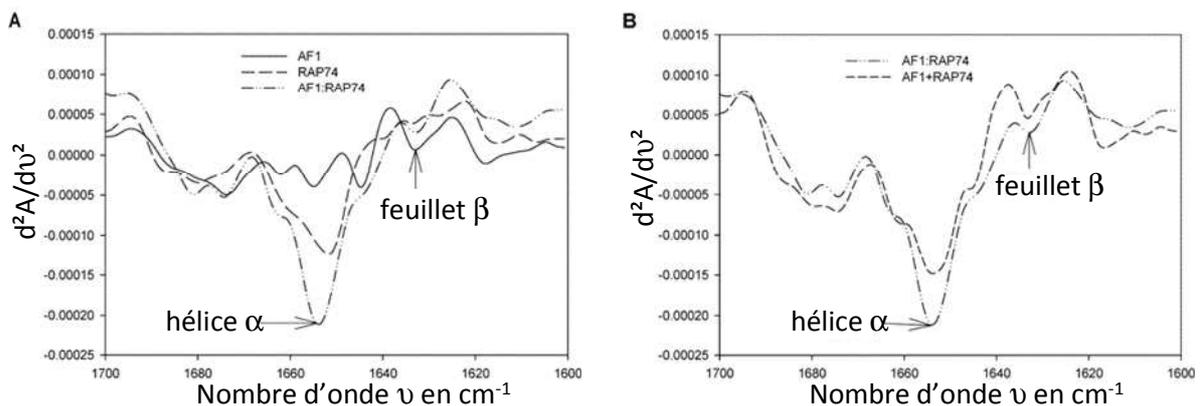


Figure 13 : Repliement induit du domaine AF1. (A) Dérivée seconde du spectre de AF1 (trait plein), de la protéine RAP74 (tirets) et du mélange des deux (tirets espacés). (B) Somme algébrique du spectre des deux protéines seules en solution (tirets) et spectre du mélange des deux protéines (tirets espacés) [91].

1.3.5 Méthodes pour accéder à la taille et à la forme des protéines

Plusieurs méthodes permettent la détermination de la taille et de la forme de macromolécules et ainsi leur degré d'extension et de désordre.

A. La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Cette méthode est une des plus puissantes pour accéder aux dimensions des protéines. Elle permet d'obtenir la forme en solution d'une protéine ou d'un complexe et également d'étudier la flexibilité d'une chaîne polypeptidique ou ses propriétés conformationnelles.

Cette technique est basée sur l'interaction élastique des photons X avec les nuages électroniques. Les photons sont diffusés en traversant l'échantillon et fournissent des informations sur la fluctuation des densités électroniques dans la matière hétérogène. Un faisceau monochromatique illumine un échantillon et l'intensité de lumière diffusée est mesurée à des angles très petits afin d'étudier des systèmes de taille allant de quelques angströms à quelques microns. Elle permet la mesure du rayon de giration, R_g défini par la racine carrée de la moyenne quadratique des distances atomiques r dans le volume v de la protéine à partir du centre de gravité de la molécule :

$$R_g^2 = \frac{\int \rho(\vec{r}) r^2 d^3 r}{\int_v \rho(\vec{r}) d^3 r} \quad \rho(r) \text{ étant la densité de longueur de diffusion.}$$

Des relations entre R_g et le nombre de résidus d'une protéine native globulaire ou de protéines fortement dénaturées ont été établies [92]. La comparaison entre R_g expérimental et calculé permet la discrimination entre des protéines repliées, des « random coils » et des « pré-molten globules » [93]. Enfin, le rayon de giration d'une protéine peut être comparé à son rayon hydrodynamique déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Il a été montré que le rapport entre le rayon de giration et le rayon hydrodynamique est de l'ordre de 0,7 pour une protéine globulaire et de 1,5 pour un « random coil », les valeurs intermédiaires correspondent à des protéines possédant une part plus ou moins importante de structures résiduelles. Cette technique a par exemple été mise en œuvre pour l'étude du domaine C-terminal intrinsèquement désordonné de la caldesmone [79], ou des α -, β - et γ -synucléines [94].

Une autre information importante apportée par le SAXS est la fonction de distribution de distances $P(r)$, qui représente l'histogramme de toutes les distances interatomiques à l'intérieur de la molécule. La valeur maximale de r pour laquelle $P(r)$ est

non nulle, D_{\max} , correspond au diamètre maximal de la protéine. Cet histogramme ainsi que la valeur du D_{\max} donnent des informations très intéressantes sur la forme, l'anisotropie et le degré de compacité de la protéine.

Enfin, les propriétés conformationnelles de la chaîne polypeptidique peuvent être obtenues avec le SAXS par la représentation du motif de diffusion dans un graphique dit de Kratky. Alors que le tracé de Kratky d'une protéine globulaire donne une forme typique de courbe en cloche, la courbe d'un « random coil » n'atteint pas de maximum et suit un plateau dans les grands angles. Cette particularité permet de distinguer clairement les conformations globulaires (ordonnées ou « molten globule ») de celles qui ne le sont pas (« random coil » ou « prémolten globule »).

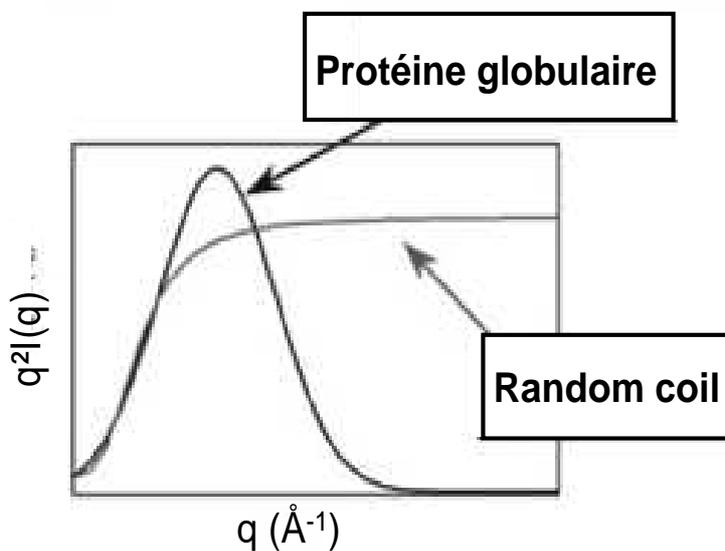


Figure 14 : Représentation de Kratky des spectres de diffusion obtenus par des études de diffusion des rayons X aux petits angles. Sont représentés les tracés de Kratky caractéristiques pour une protéine globulaire et un « random coil » [74]. $I(q)$ correspond à l'intensité de diffusion, q est le vecteur de diffusion avec $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$, θ angle de diffusion, λ longueur d'onde.

B. La diffusion statique (SLS) ou dynamique de la lumière (DLS)

Les paramètres moléculaires tels que la taille, la masse moléculaire ou les interactions intermoléculaires peuvent être obtenus par la diffusion dynamique de la lumière permettant de déterminer le rayon hydrodynamique ou rayon de Stokes (R_s) d'une protéine. La DLS mesure le coefficient de diffusion translationnelle D d'une protéine qui est relié au rayon de Stokes par l'équation de Stokes-Einstein suivante :

$$R_s = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

où k est la constante de Boltzmann, T est la température en Kelvin et η est la viscosité du solvant.

Avant l'émergence de la DLS, une autre technique a largement été utilisée pour la détermination de la masse moléculaire de protéines : la SLS (Diffusion Statique de la Lumière). La combinaison des deux méthodes offre deux principaux avantages pour l'étude des états conformationnels des protéines. Le premier concerne la fiabilité des mesures des dimensions hydrodynamiques et joue un rôle important lors des recherches de repliement ou dépliement des protéines, en particulier pour les PID. Les changements observés du R_s ou les grandes valeurs inattendues du R_s mesurés par DLS peuvent résulter partiellement ou entièrement d'un phénomène d'agrégation. De tels effets peuvent être clairement identifiés si l'expérience de DLS est couplée à la SLS qui déterminera la masse moléculaire des protéines contenues dans l'échantillon [95]. Par exemple, ceci fut montré avec l'étude du répresseur Cro du bactériophage λ qui intervient dans la lyse de virus. La protéine se déstructure sous l'effet de l'augmentation de la température en passant par un état intermédiaire. Les auteurs ont pu mettre en évidence ce processus par l'utilisation de la DLS/SLS [96]. Le deuxième avantage de combiner les deux méthodes est leur capacité à mesurer des masses moléculaires de protéines dans des solutions qui sont turbides et qui contiennent des protéines monomériques et une petite quantité d'agrégats. Cette situation est souvent rencontrée durant des processus de repliement. Dans de tels cas, la SLS seule mesurerait une masse moyenne dénuée de sens. Les rayons de Stokes des monomères et d'agrégats sont bien séparés et permettent de déterminer la contribution des monomères et des agrégats dans l'intensité totale de diffusion, et ainsi la masse moléculaire correcte peut être obtenue [95]. Cette situation est illustrée sur la figure 15, qui montre l'intensité relative de diffusion en fonction du rayon de Stokes de la protéine prion recombinante du hamster Syrien à pH 4,2. Dans ce cas, 82 % de l'intensité totale de diffusion résulte de la protéine monomérique, et 18 % proviennent d'agrégats. La soustraction de la contribution des agrégats donne une masse molaire de 18000 g/mol, ce qui est proche de 16400 g/mol, valeur calculée à partir de la composition en acides aminés. Sans correction, une masse moléculaire erronée de 22000 g/mol aurait été obtenue [97].

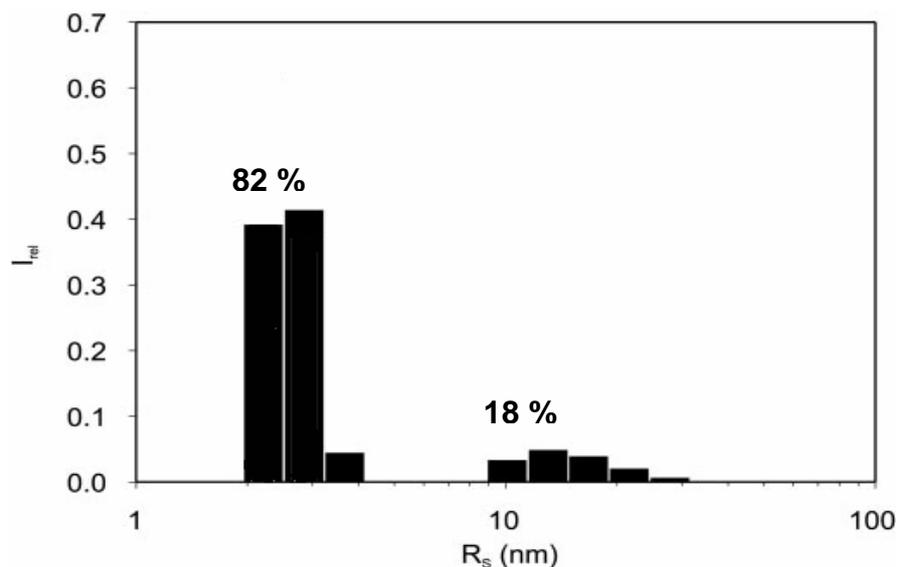


Figure 15 : Intensité relative de diffusion (I_{rel}) en fonction du rayon de Stokes (R_s) pour la protéine prion recombinante du hamster Syrien dans l'état natif à pH 4,2 [97].

Des applications des techniques de SLS ou de DLS sont également réalisées en étudiant la dénaturation thermique des protéines comme le lysozyme [98] ou la ribonucléase T1 [99] dont la transition repliée/dépliée est complètement réversible. De la même manière, la dénaturation chimique a été étudiée par ces techniques par Dubin *et al* sur le lysozyme [100]. La SLS et la DLS permettent également de mettre en évidence la présence d'une protéine native totalement désordonnée car elle possède un rayon de Stokes plus grand que ceux obtenus par calcul [94].

C. La chromatographie par filtration sur gel

En chromatographie, les composants à séparer sont généralement partagés entre deux phases : une phase stationnaire et une phase mobile. La phase stationnaire est typiquement chargée sur la colonne, tandis que la phase mobile contient l'échantillon dissout et s'infiltré à travers la phase stationnaire dans une direction définie. Les phases sont choisies de manière à ce que les capacités des composants d'un échantillon à interagir avec les deux phases soient différentes. La séparation en chromatographie d'exclusion stérique est faite grâce à l'utilisation de billes poreuses, avec une gamme bien définie de taille de pores, comme phase stationnaire.

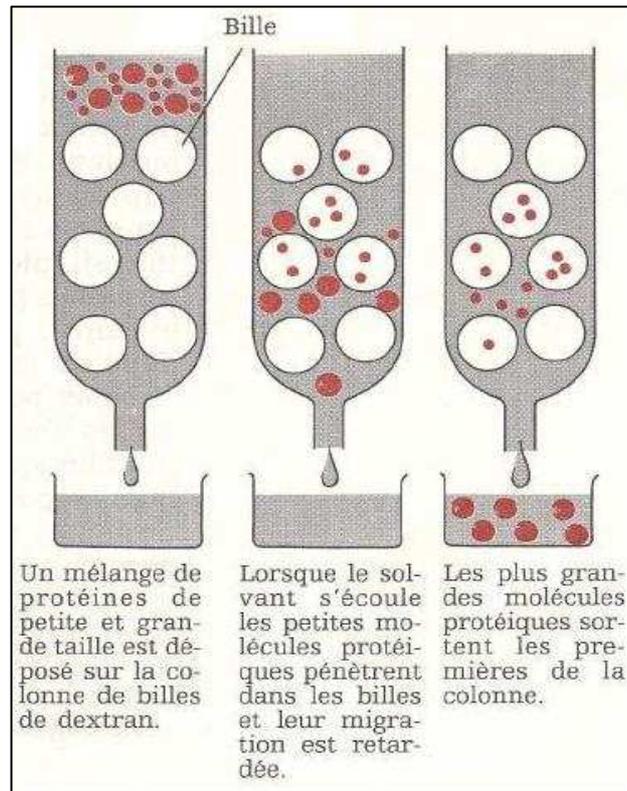


Figure 16 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique.

Les molécules dont le volume est supérieur à celui des billes ne peuvent y pénétrer et sont éluées rapidement. Tandis que les molécules dont le volume est inférieur à celui des billes y pénètrent et y subissent des frottements qui les retardent (figure 16).

La chromatographie par filtration sur gel ou chromatographie d'exclusion stérique (SEC) peut être utilisée pour l'estimation des dimensions hydrodynamiques des protéines, pour l'évaluation de l'état d'association d'une protéine, pour l'analyse des interactions des protéines avec des partenaires et pour les études de repliement induit des PID. Elle peut être aussi utilisée pour séparer les conformères de PID en se basant sur leurs dimensions hydrodynamiques.

Les utilisations les plus fréquentes de la SEC sont la séparation des protéines en fonction de leur taille et l'estimation de leur poids moléculaires. De nombreuses autres techniques existent pour obtenir les dimensions hydrodynamiques des protéines (SAXS, DLS, sédimentation...), cependant elles possèdent toutes quelques difficultés de mise en place comme la quantité nécessaire de protéine, le coût des appareils et logiciels de traitement, la préparation de l'échantillon (homogénéité)... L'application de la SEC permet de surmonter ces difficultés expérimentales et est largement utilisée. Par exemple, les processus de

dénaturation et de dépliement des protéines sont souvent analysés par SEC soit en mesurant le changement dans les temps de rétention (qui sont liés aux changements du rayon de Stokes) [101], soit en suivant l'apparition de nouvelles espèces [102]. Les dimensions hydrodynamiques des PID sont aussi étudiées par SEC [103]. La technique SEC est également un outil puissant pour suivre les changements conformationnels des protéines. Les rayons de Stokes déterminés par SEC ont été trouvés en bon accord avec ceux obtenus par d'autres techniques [101]. L'exactitude des mesures de SEC est assez grande et permet d'obtenir des informations fiables sur les dimensions hydrodynamiques de protéines dans différentes conformations.

D. L'ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique apporte des informations sur les propriétés hydrodynamiques d'une molécule. Deux types d'expérience existent : la mesure de la vitesse de sédimentation et de l'équilibre de sédimentation. L'instrumentation est identique à une ultracentrifugation classique à laquelle on a ajouté un système de détection optique. Le premier type d'expérience permet de déterminer un certain nombre de paramètres hydrodynamiques : coefficient de sédimentation, de diffusion et de friction. Ces paramètres renseignent sur la forme de la macromolécule. Le second type d'expérience permet de déterminer la masse moléculaire apparente des macromolécules et les constantes d'association/dissociation de complexes.

Les expériences de mesure de vitesse de sédimentation sont réalisées à une grande vitesse de rotation angulaire (de 10 000 à 60 000 rpm) créant une frontière entre les sédiments de molécules. Les profils de sédimentation sont mesurés par absorbance et/ou interférence et analysés en fonction du temps. Un exemple d'utilisation de cette technique est l'étude de Grezla *et al* [104] sur la protéine VPg des potyvirus qui sont un groupe de virus végétaux entraînant la nécrose de la plante infectée. La protéine VPg est multifonctionnelle et nativement déstructurée. Les monomères et dimères lient leur partenaire (eIF4E) avec une efficacité similaire. Une expérience de mesure de vitesse de sédimentation a été réalisée pour évaluer la forme et l'état oligomérique de VPg dans des conditions non dénaturantes. Les valeurs obtenues sont plus petites par rapport à celles calculées pour des espèces compactes et globulaires suggérant une structure allongée à la fois pour la protéine VPg monomérique et dimérique [104].

Les expériences d'équilibre de sédimentation sont une des meilleures voies pour déterminer la masse moléculaire de protéines incluant les PID. C'est aussi une méthode de choix pour l'étude des équilibres d'association monomère-multimère [105]. Par rapport à la technique de vitesse de sédimentation, la vitesse angulaire est assez faible. Quand les macromolécules sédimentent, les processus de diffusion s'opposent aux forces gravitationnelles. Une expérience d'équilibre de sédimentation se déroule ainsi :

- Au début, on a une répartition homogène des molécules de la solution. Les molécules vont ensuite se déplacer vers le fond par sédimentation, des couches successives vont se former au fond. La concentration du fond du godet va donc augmenter et il va s'établir un gradient de concentration.
- Le gradient est responsable d'une diffusion des molécules en sens inverse de la sédimentation. A un moment donné, le flux dû à la sédimentation sera égal au flux dû à la diffusion. L'équilibre est atteint et la sédimentation s'arrête.

On peut citer comme exemple la détermination de l'état oligomérique de la protéine de stress de la tomate, ASR1, par des expériences de mesure d'équilibre de sédimentation. Cette protéine possède une activité d'interaction avec l'ADN dépendante du zinc. Il a été montré que la protéine passait d'une forme monomérique en absence de zinc à une forme dimérique en sa présence avec une transition d'un état désordonné à un état ordonné lors de l'interaction de la protéine avec l'ion métallique [106].

Chapitre 2 : Sondes paramagnétiques et spectroscopie RPE : le marquage de spin

2.1 Spectroscopie RPE des radicaux nitroxydes

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique est une spectroscopie d'absorption permettant d'étudier des espèces contenant des centres paramagnétiques, c'est-à-dire possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Les radicaux nitroxydes sont des centres paramagnétiques anisotropes caractérisés par l'interaction entre un spin électronique $S = \frac{1}{2}$ et un spin nucléaire $I = 1$ provenant du magnétisme du noyau d'azote situé à proximité de l'électron célibataire. Pour simplifier, nous traiterons dans un premier temps le cas de centres isotropes, puis dans un second temps, celui des nitroxydes.

2.1.1 Spectre RPE d'un centre isotrope ($S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$)

Pour un système de spin électronique $S = \frac{1}{2}$, les deux orientations possibles du spin déterminent deux états ($M_s = +\frac{1}{2}$ et $M_s = -\frac{1}{2}$) qui sont dégénérés en absence de champ magnétique extérieur \vec{B} . L'interaction entre un champ magnétique \vec{B} et le système de spin considéré est appelée interaction Zeeman et provoque l'apparition de deux niveaux d'énergie, $M_s = +\frac{1}{2}$ et $M_s = -\frac{1}{2}$. La différence d'énergie ΔE entre les deux états est proportionnelle à l'amplitude du champ appliqué (figure 16). A cette interaction, se rajoute un terme représentant l'interaction entre le spin électronique du centre paramagnétique et les spins nucléaires non nuls environnants. Ce phénomène, appelé interaction hyperfine, induit une multiplicité des raies. Dans le cas $S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$, chaque niveau ($M_s = +\frac{1}{2}$ et $M_s = -\frac{1}{2}$) est subdivisé en trois niveaux correspondant à chaque valeur possible de M_I ($M_I = -1$, $M_I = 0$ et $M_I = +1$). Pour un système isotrope, l'hamiltonien de spin qui décrit les interactions auxquelles est soumis ce système est :

$$H = H_{Zeeman} + H_{Hyperfine}$$

$$H = g\beta\vec{B}\vec{S} + A\vec{S}\vec{I}$$

avec le facteur g égal à 2,0023 pour un électron isolé, β le magnéton de Bohr électronique ($9,274 \cdot 10^{-24}$ J/T), A la constante de couplage hyperfin, \vec{B} le champ magnétique extérieur et \vec{S} et \vec{I} les opérateurs de spin électronique et nucléaire respectivement.

Le terme Zeeman est largement supérieur au terme de structure hyperfine qui peut être considéré comme une perturbation de ce dernier. Les énergies au premier ordre sont données par l'expression :

$$E = M_s (g\beta B + AM_I)$$

avec $M_s = \pm \frac{1}{2}$ et $M_I = -1, 0, +1$.

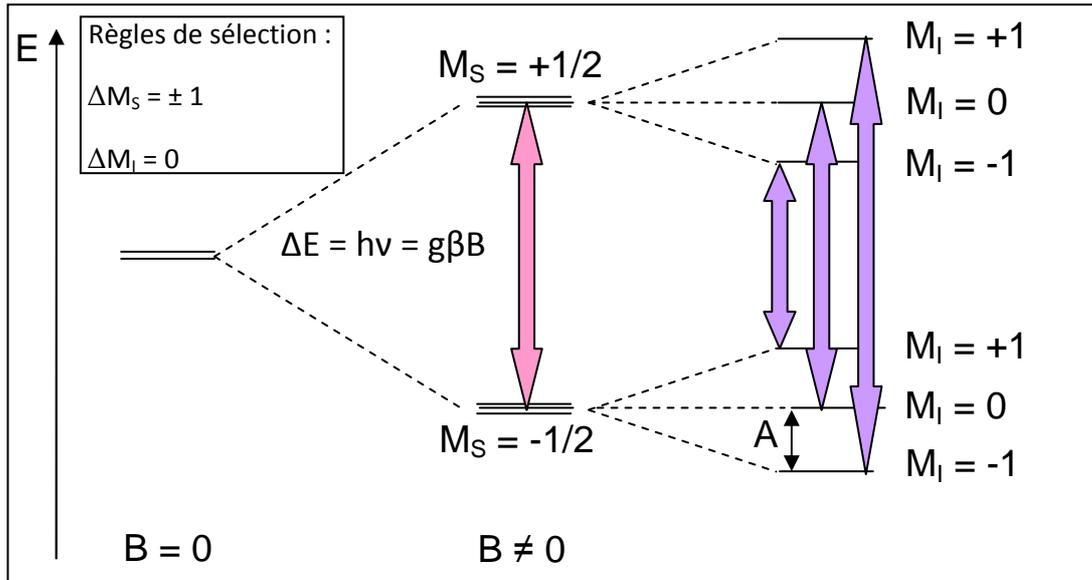


Figure 17 : Diagramme des niveaux d'énergie pour un système de spin $S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$. Les flèches violettes indiquent les trois transitions possibles.

Une expérience de spectroscopie RPE est basée sur l'application d'un rayonnement électromagnétique à une fréquence ν fixe. En onde continue, un spectre RPE est enregistré en gardant ν constant et en variant continûment le champ magnétique. La condition de résonance n'est réalisée que lorsque les règles de sélection $\Delta M_S = \pm 1$ et $\Delta M_I = 0$ (figure 17) sont vérifiées et lorsque l'écart d'énergie entre les deux niveaux équivaut exactement à l'énergie du rayonnement électromagnétique appliqué :

$$\Delta E = h\nu = g\beta B + AM_I$$

Dans le cas étudié, les conditions de résonance sont vérifiées pour trois valeurs différentes du champ magnétique extérieur, appelé champ magnétique résonant BM_I et donné par :

$$B_{M_I} = \frac{(h\nu - AM_I)}{g\beta}$$

Ce qui donne en développant :

$$B_{+1} = (h\nu - A) / g\beta$$

$$B_0 = h\nu / g\beta$$

$$B_{-1} = (h\nu + A) / g\beta$$

avec $B+1$ la raie à bas champ, B_0 la raie à champ central et $B-1$ la raie à haut champ (figure 18). Le spectre RPE que l'on obtient est composé de trois raies équidistantes et séparées d'un même écartement en champ déterminé par $A/g\beta$ et centré en $B = \frac{h\nu}{g\beta}$.

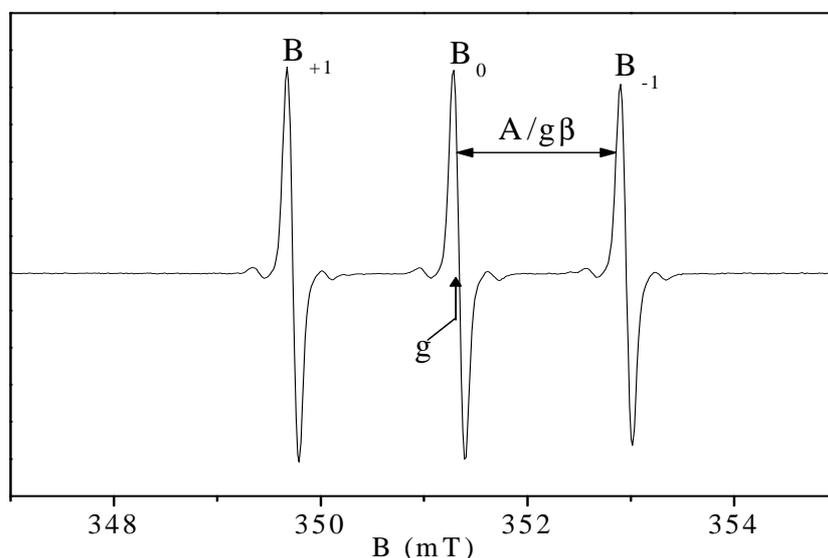


Figure 18 : Signal RPE d'un système $S = \frac{1}{2}$ et $I = 1$. (Pour des raisons techniques d'enregistrement ce spectre correspond à la dérivée première du signal d'absorption).

2.1.2 Spectre RPE d'un centre anisotrope ($S = \frac{1}{2}$, $I = 1$)

Un radical nitroxyde est un centre anisotrope. Dans ce cas, le facteur g et la constante hyperfine A ne sont plus des scalaires mais deviennent des tenseurs notés \tilde{g} et \tilde{A} . Les valeurs principales de \tilde{g} et \tilde{A} suivent les inégalités suivantes : $g_z < g_y < g_x$ et $A_x \approx A_y < A_z$. Les axes magnétiques (x, y, z) sont tels que l'axe x est dans la direction de la liaison N-O, l'axe z est perpendiculaire au plan du groupement pyridinyle et l'axe y au plan xz (figure 19) [107].

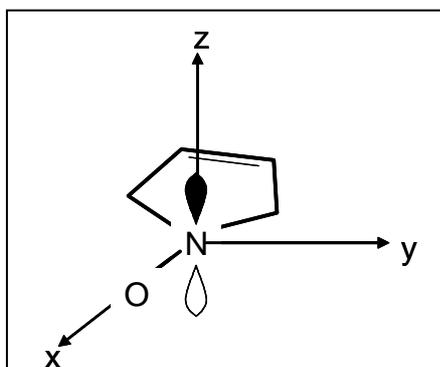


Figure 19 : Directions x, y et z des axes magnétiques d'un radical nitroxyde.

L'hamiltonien de spin qui décrit les interactions magnétiques de ce système en présence d'un champ magnétique s'écrit alors :

$$H = \beta \vec{B} \tilde{g} \vec{S} + \vec{S} \tilde{A} \vec{I}$$

Pour une collection de radicaux nitroxydes répartis de manière aléatoire dans toutes les directions de l'espace (cas d'une solution gelée), les valeurs des champs résonants pour chaque valeur de M_I couvrent une gamme de valeurs (figure 20-A). Pour des radicaux nitroxydes, l'anisotropie du tenseur g est faible (g_x , g_y et g_z sont très proches du facteur g de l'électron libre) alors que celle du tenseur hyperfin est relativement importante et de nature axiale ($A_x/g_x\beta$ et $A_y/g_y\beta$ sont proches et de l'ordre de 0,5 mT alors que $A_z/g_z\beta$ est plus grand et de l'ordre de 3,5 mT). Ainsi, un spectre RPE de radicaux nitroxydes en solution gelée est montré par la figure 20-C.

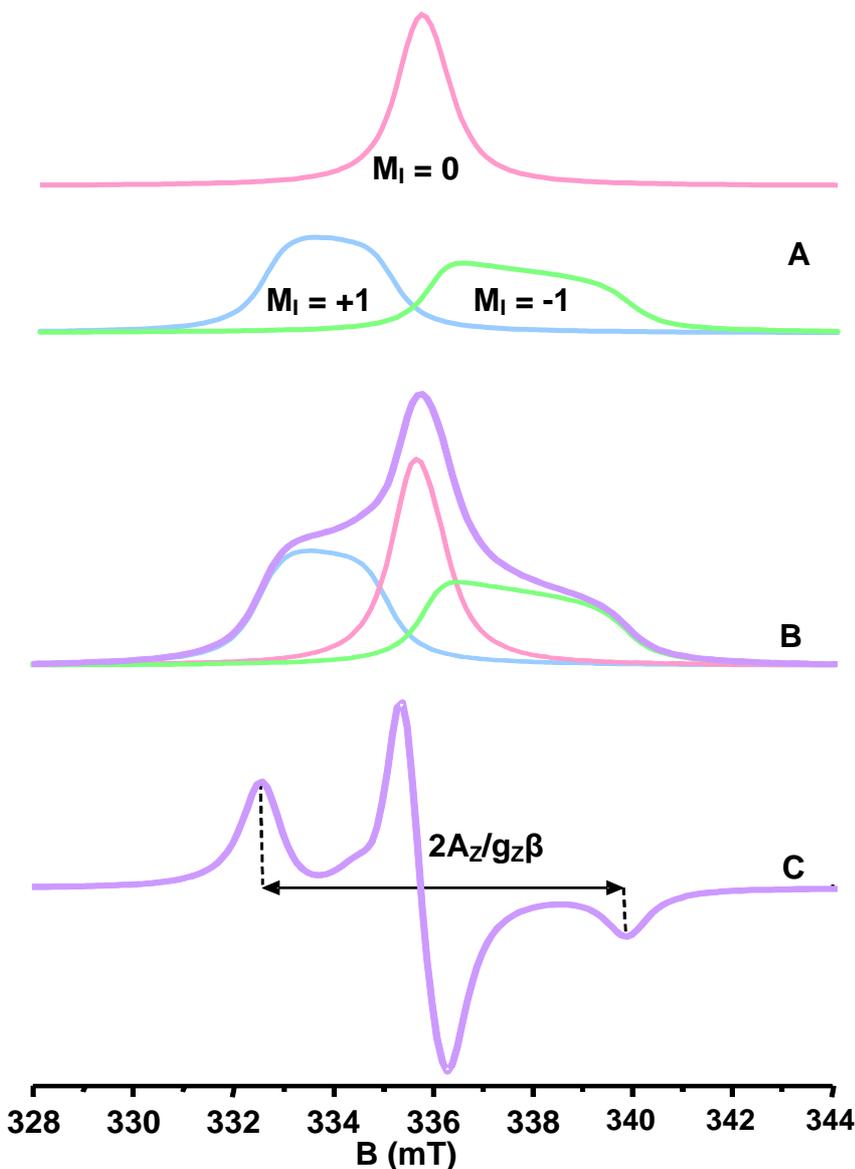


Figure 20 : Spectres RPE simulés pour des nitroxydes en solution gelée. (A) Spectres d'absorption correspondant aux trois plages de champ résonant. (B) Spectre d'absorption résultant de la somme de ces trois raies. (C) Dérivée première du spectre d'absorption [108].

2.1.3 Influence de la mobilité du radical nitroxyde sur le spectre RPE

Dans le paragraphe 2.1.2, les radicaux nitroxydes étaient en solution gelée donc totalement immobilisés. Or, l'anisotropie de ces radicaux est plus ou moins moyennée selon leur vitesse de rotation en solution. En conséquence, les spectres RPE reflètent la mobilité des radicaux. Cette mobilité est caractérisée par un temps de corrélation de rotation τ_r . En travaillant en bande X (9,5 GHz), on peut observer un ensemble de spectres qui vont traduire différents régimes de mobilité (figure 21). Lorsque les radicaux peuvent se mouvoir rapidement et de manière isotrope, comme c'est le cas à température ambiante, le spectre RPE sera identique à celui d'un centre isotrope. Les interactions magnétiques sont moyennées, avec les valeurs de g et A résultant des moyennes suivantes :

$$g = \frac{1}{3}(g_x + g_y + g_z) \text{ et } A = \frac{1}{3}(A_x + A_y + A_z)$$

On se trouve alors dans le cas A de la figure 21 avec des temps de corrélation de rotation de $\tau_r \leq 10^{-11}$ s. Le spectre RPE est similaire à celui décrit dans le paragraphe 2.1.1 avec trois raies étroites et équidistantes. Si maintenant on diminue petit à petit la mobilité du radical (soit en diminuant la température, soit en augmentant la viscosité), l'anisotropie magnétique n'est plus totalement moyennée et on observe un élargissement des raies sur place avec une variation des amplitudes. Ceci correspond à la figure 21-B c'est-à-dire au régime de mobilité rapide tel que 10^{-11} s $< \tau_r < 10^{-9}$ s. Si le temps de corrélation de rotation diminue encore, jusqu'à $\tau_r < 10^{-6}$ s, l'effet de moyenne devient de moins en moins efficace et l'on observe un élargissement du spectre RPE avec déplacement des motifs caractéristiques (figure 21-C). On se situe dans le régime de mobilité intermédiaire. Enfin pour $\tau_r > 10^{-6}$ s, les effets de l'anisotropie des matrices g et A est totalement observée, c'est le régime de mobilité lent (figure 21-D). Le spectre obtenu est celui de radicaux en solution gelée, similaire à celui décrit dans la partie 2.1.2.

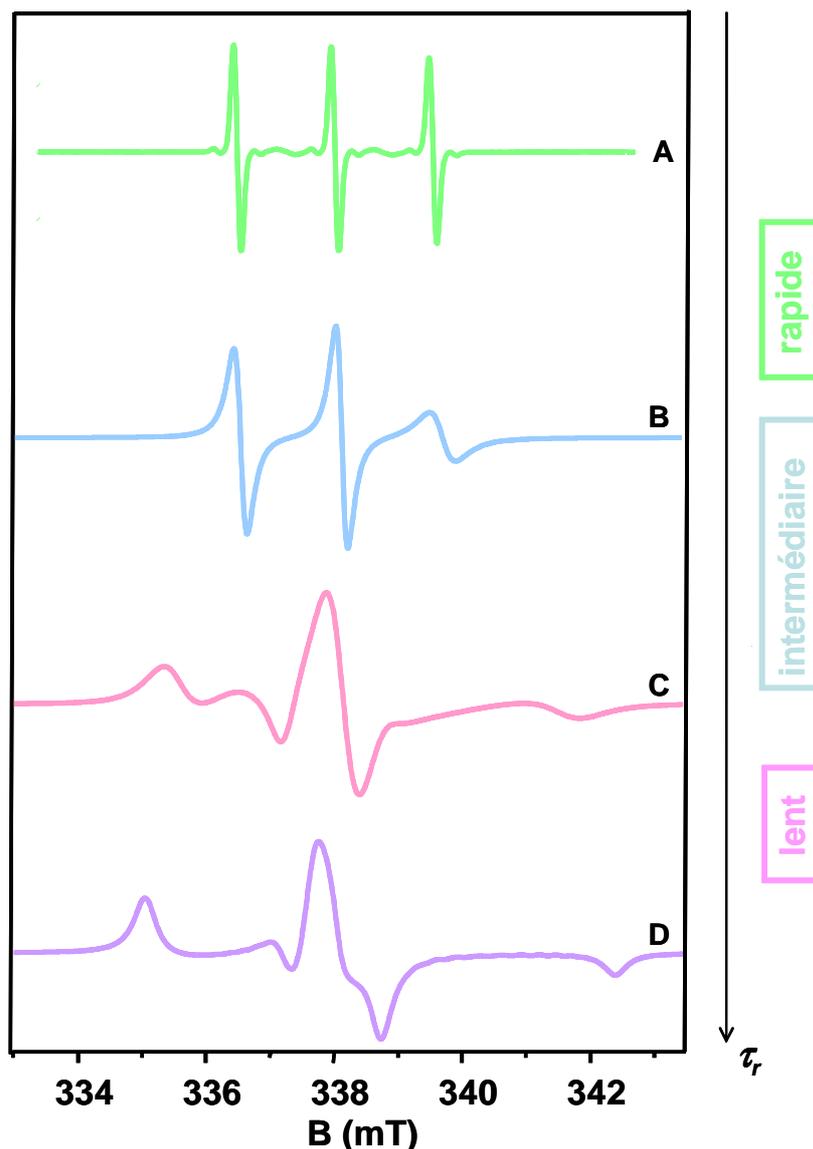


Figure 21 : Spectres RPE de radicaux nitroxydes en fonction de la mobilité caractérisée par le temps de corrélation de rotation τ_r . Spectres simulés avec le logiciel EasySpin [109] avec les paramètres suivants : $\nu = 9,5$ GHz ; $(g_x ; g_y ; g_z) = (2,0089 ; 2,0064 ; 2,0027)$; $(A_x/g_x\beta ; A_y/g_y\beta ; A_z/g_z\beta) = (0,49 ; 0,49 ; 3,51)$ mT et $\tau_r = 10^{-12}$ s (A) ; 10^{-9} s (B) ; 10^{-8} s (C) ; 10^{-5} s (D).

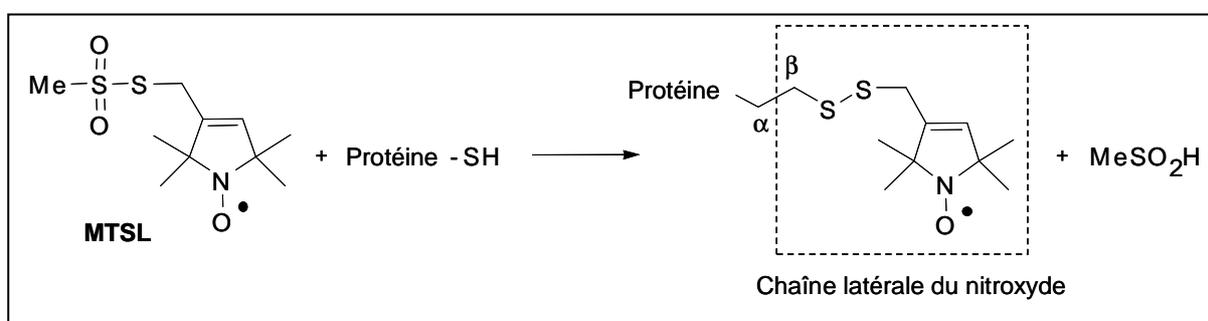
2.1.4 Mobilité des marqueurs de spin greffés sur des protéines

A. Principe du marquage de spin

La première étude utilisant des sondes paramagnétiques date de 1965 [110]. Il s'agissait alors d'obtenir des radicaux nitroxydes fonctionnalisés capables de réagir avec des résidus ciblés (lysines) et donc de marquer les protéines en utilisant des résidus natifs. Cependant, il était impossible de cibler une zone spécifique de la protéine si cette zone ne

contenait pas le résidu nécessaire au marquage. De plus, si la protéine possédait plusieurs de ces résidus cibles il n'était pratiquement pas possible de faire du marquage unique.

Depuis une vingtaine d'années, le rapide développement des techniques de biologie moléculaire a permis l'émergence de la technique dite « marquage de spin ». L'acronyme anglais couramment utilisé, et qui le sera par la suite, est : SDSL pour Site-Directed Spin Labeling. Le principe repose sur l'insertion de sondes paramagnétiques, principalement des radicaux nitroxydes, en des positions prédéfinies d'une protéine, généralement une (ou des) cystéine(s) libre(s), naturelle(s) ou introduite(s) par mutagenèse dirigée [111-112]. La sonde paramagnétique la plus couramment utilisée est le 1-oxy-2,2,5,5-tetraméthyl- Δ^3 -pyrroline-3-méthyl méthanethiosulfonate généralement appelé MTSL qui réagit spécifiquement avec les cystéines selon la réaction suivante :



Cette technique est applicable aussi bien pour l'étude des biomolécules solubles (protéines ou acides nucléiques) que pour les protéines membranaires, qu'elles soient solubilisés dans des détergents ou incorporés dans des membranes lipidiques. La taille du système n'est pas limitante car on obtient des informations locales avec les sondes paramagnétiques, d'où un champ d'application vaste et varié. Cette technique est particulièrement bien adaptée à l'étude des transitions structurales qui ont lieu au sein des protéines et qui peuvent être induites soit par un partenaire physiologique soit par un événement physique externe (comme une illumination, un changement de pH...) [113-114].

B. Caractérisation de la mobilité

Lorsqu'un radical est libre en solution, sa mobilité n'est influencée que par la température et la viscosité du milieu. Ainsi, un seul paramètre suffit à caractériser la rapidité de son mouvement, le temps de corrélation de rotation τ_r . Dans le cas d'un radical greffé sur une protéine, sa mobilité est en plus affectée par le mouvement global de la protéine, par le mouvement de la chaîne latérale de l'acide aminé sur lequel il est greffé, par les fluctuations de la partie de la chaîne polypeptidique où est situé cet acide aminé, et enfin par les

contraintes stériques dues à la présence d'acides aminés voisins [115-117]. Le terme « mobilité » peut alors être décrit par le temps de corrélation de rotation suivant :

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_{prot}} + \frac{1}{\tau_{local}}$$

dans laquelle τ_{prot} est le temps de corrélation rotationnel lié au mouvement de la protéine sur elle-même et τ_{local} celui qui contient l'ensemble des autres contributions au mouvement. Comme le but de cette technique est d'observer des modifications locales, l'influence du mouvement de la protéine est à prendre en compte. Cette influence devient négligeable lorsque la masse molaire de la protéine d'intérêt est supérieure à 50 kDa et lorsque τ_{local} est de l'ordre de la nanoseconde. Pour les protéines de petite taille, cette influence peut être diminuée en augmentant la viscosité du milieu, par l'ajout de 30 % de saccharose par exemple [118].

C. Analyse de la mobilité

Les changements de mobilité du radical peut être efficacement caractérisée à l'aide de la mesure de paramètres semi-quantitatifs issus des spectres expérimentaux : l'amplitude pic à pic des raies ou la largeur de la raie centrale. Dans le régime de grande mobilité, on peut utiliser le rapport des amplitudes pic à pic des raies latérales, que l'on note $h(M_i = +1)$ ou $h(M_i = -1)$, et celle de la raie centrale notée $h(M_i = 0)$ (figure 22). Pour un mouvement isotrope, il a été montré que le rapport $h(-1)/h(0)$ était le meilleur indicateur de la mobilité du marqueur [119] tandis que pour un mouvement anisotrope, c'était le rapport $h(+1)/h(0)$ [75]. Dans tous les cas, on mesurera l'amplitude de chacune des raies afin de choisir le rapport le plus sensible à la variation de la mobilité.

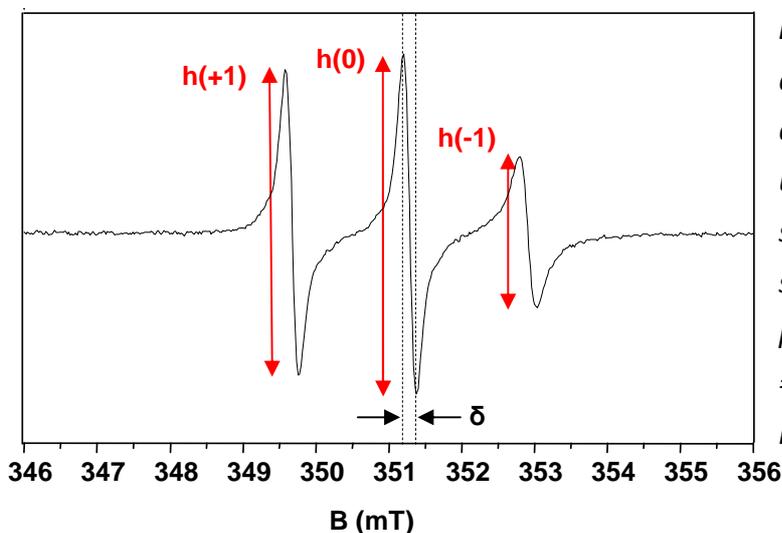


Figure 22 : Représentation des différents paramètres semi-quantitatifs pouvant être mesurés sur un spectre RPE d'un marqueur greffé sur une protéine. $h(+1)$, $h(0)$ et $h(-1)$ sont respectivement les amplitudes pic à pic des raies correspondant à $M_i = +1$, 0 et -1. δ est la largeur de la raie centrale (unité : mT).

Il existe un autre paramètre semi-quantitatif qui peut être utilisé quel que soit le régime de mobilité dans lequel se trouve le radical (rapide, intermédiaire ou lent). Ce facteur, bien indiqué lorsque l'on est en présence d'un marquage successif sur un grand nombre de sites individuels, est noté M_s et est calculé comme suit :

$$M_s = \frac{\delta_{\text{rapide}}^{-1} - \delta_{\text{lent}}^{-1}}{\delta_{\text{rapide}}^{-1} - \delta_{\text{lent}}^{-1}}$$

avec δ_{lent} et δ_{rapide} les largeurs pic à pic de la raie centrale pour les sites où le marqueur est le moins rapide et le plus mobile respectivement [115]. On a ainsi un indicateur normalisé ($0 \leq M_s \leq 1$) de la mobilité du marqueur rencontré en différents sites.

Si l'on souhaite une interprétation plus quantitative des données expérimentales, les spectres RPE peuvent être simulés. Parmi les différents programmes de simulation, certains utilisent un temps de corrélation de rotation effectif lié à la vitesse du mouvement et un paramètre qui décrit l'amplitude du mouvement [120]. D'autres utilisent un temps de corrélation effectif ($\delta_{\text{effectif}} < 3$ ns) et un paramètre qui décrit l'espace conformationnel que peut explorer le radical [121-122].

2.1.5 Influence des agents relaxants sur les sondes paramagnétiques

L'utilisation d'agents relaxants permet d'étudier l'accessibilité du radical nitroxyde au solvant. Cette approche est basée sur la modification des propriétés de relaxation du marqueur à l'aide de complexes métalliques ou encore d'oxygène moléculaire. Le choix de l'agent relaxant dépend des caractéristiques du système étudié. Par exemple, l'oxygène, qui se concentre dans les membranes du fait de son apolarité, sera utilisé pour l'étude de complexes protéiques membranaires [107]. Les agents relaxants polaires comme le nickel (II) éthylènediaminediacétate (NiEDDA) ou l'oxalate de chrome (III) (CROX) seront eux employés en milieu aqueux [123-124].

La méthode expérimentale la plus utilisée pour mesurer les propriétés de relaxation du radical est la méthode dite de saturation continue du signal RPE [125]. Le temps de relaxation électronique spin réseau T_1 caractérise le retour à l'équilibre thermique des populations des niveaux Zeeman électroniques. Chaque centre paramagnétique est caractérisé par sa valeur T_1 . A une température donnée et à faible puissance P , l'amplitude du signal RPE est proportionnelle à $(P)^{1/2}$. Lorsque la puissance augmente, l'absorption modifie la répartition des populations des niveaux Zeeman obtenue à l'équilibre thermique : la différence de population entre ces deux niveaux diminue. Au-delà d'un certain seuil de puissance, on observe une chute de l'intensité du signal RPE, c'est le phénomène de

saturation. En pratique, cela consiste à mesurer l'amplitude A du signal RPE en fonction de la puissance micro-onde P . A partir des courbes $A/P^{1/2} = f(P^{1/2})$, on peut facilement mesurer la puissance à mi-saturation $P_{1/2}$ définie comme la puissance à laquelle le rapport $A/P^{1/2}$ est divisé par 2. Les agents relaxants vont modifier la puissance à partir de laquelle on a apparition du phénomène de saturation. Ils vont diminuer le temps T_1 de sorte que le retour à l'équilibre va se faire plus rapidement. Il sera alors nécessaire d'avoir une puissance $P_{1/2}$ plus élevée pour atteindre le phénomène de saturation. Pour observer un effet des agents relaxants, il faut que ces derniers entrent en collision avec les radicaux nitroxydes. Or ce choc dépend de l'accessibilité des radicaux. Plus l'effet des agents relaxants sera important, plus la puissance à mi-saturation sera élevée et plus l'accessibilité des radicaux sera grande. La comparaison entre $P_{1/2}$ en absence et en présence d'une concentration connue en agent relaxant permet de déterminer l'accessibilité de la sonde paramagnétique [123].

2.1.6 Influence de l'interaction dipolaire

Le regain d'intérêt pour la technique SDSL est dû à la possibilité de mesurer des distances intra ou intermoléculaire entre deux radicaux. La mesure de distance entre deux radicaux donne des informations sur la structure des protéines ainsi que sur leur variation de structure. Cette mesure repose sur l'observation des interactions magnétiques dipolaires entre deux électrons non appariés.

Il est possible de sonder cette interaction dipolaire à l'aide de deux techniques différentes. Pour des distances inférieures à 20 Å, on utilisera la RPE en onde continue, avec laquelle on observe un élargissement des raies sous l'effet de l'interaction dipolaire. Pour des distances plus grandes, la méthode utilisée sera la RPE impulsionnelle pour laquelle le rayonnement sera émis suivant une séquence d'impulsions convenablement choisies, d'intensité et de durée bien déterminées.

A. Analyse en onde continue

L'hamiltonien décrivant l'interaction dipolaire entre deux centres paramagnétiques de spins S_A et S_B (cas où les deux centres sont isotropes $g_A \cdot g_B$) est :

$$H_{dip} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_A g_B \beta^2}{r^3} \left(\vec{S}_A \cdot \vec{S}_B - \frac{3(\vec{S}_A \cdot \vec{r})(\vec{S}_B \cdot \vec{r})}{r^2} \right)$$

Dans le cas où $H_{dip} \ll H_{zeeman}$, on peut utiliser l'expression de l'interaction dipolaire approchée au premier ordre :

$$D = \frac{\mu_0}{4\pi} \beta^2 \frac{g_A g_B}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

Avec g_A et g_B les facteurs g des deux centres A et B et où l'angle θ est l'angle entre le champ B et l'axe reliant les deux centres paramagnétiques (figure 23).

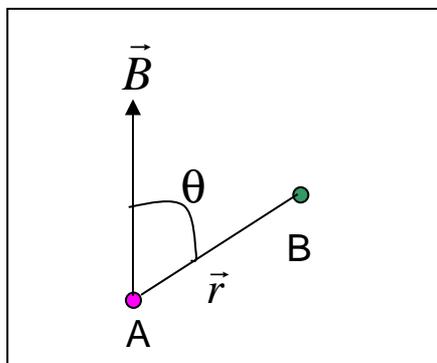


Figure 23 : Représentation de l'angle θ entre le champ magnétique \vec{B} et l'axe reliant les centres paramagnétiques A et B.

D'un point de vue spectral, chacune des raies d'absorption des centres A et B sera dédoublée. Si on considère des échantillons de protéines marquées en solution gelée, l'interaction dipolaire conduit à un élargissement des raies détectable jusqu'à 20 Å. La distance entre sondes peut être obtenue soit par la simulation du spectre RPE calculé numériquement à partir de l'hamiltonien de spin $H = H_{\text{Zeeman}} + H_{\text{Hyperfin}} + H_{\text{dipolaire}}$, soit par une méthode de déconvolution du signal élargi [126-127]. Pour de très courtes distances (< 8 Å), cette technique n'est plus utilisable car l'interaction d'échange n'est plus négligeable devant l'interaction dipolaire.

La RPE en onde continue permet donc de mesurer des distances interspins typiquement comprises entre 8 Å et 20 Å. Cependant, lors d'un marquage de protéine, il est difficile d'obtenir un marquage total et donc, seule une partie des protéines sont bi-marquées. L'interaction dipolaire est alors en partie masquée par les spectres des protéines monomarquées ce qui rend la détermination de distance interspin difficile. Pour détecter des distances plus grandes, l'utilisation de la RPE impulsionnelle devient nécessaire.

B. Analyse en RPE impulsionnelle

Cette seconde approche est basée sur l'utilisation des techniques de RPE pulsée, qui se développent de façon importante depuis ces dernières années [128]. Ainsi les techniques

de double résonance électron-électron (DEER ou PELDOR) ont rendu possible la mesure de distances interspins comprises entre 18 et 80 Å. Avec la RPE en onde continue, le spectre enregistré est la superposition des signaux provenant des protéines monomarquées et des protéines bi-marquées. L'avantage de la RPE impulsionnelle est qu'elle permet d'accéder au couplage dipolaire sans les autres contributions de l'hamiltonien de spin, ceci grâce à des séquences d'impulsions adaptées [128]. La séquence d'impulsions la plus utilisée est la séquence DEER (Double Electron Electron Resonance) à quatre impulsions (figure 24-A) [129-130] basée sur l'irradiation sélective de deux populations de spins A et B. La population A est excitée à une fréquence ν_{obs} que l'on observe par un écho de spin, tandis que la population B est excitée par une impulsion d'inversion à une fréquence ν_{pompe} qui se déplace pendant la séquence. Le déplacement de cette impulsion induit une modulation de l'amplitude de l'écho à la fréquence angulaire du couplage dipolaire. Comme cela est illustré sur la figure 24, la transformée de Fourier du signal temporel permet d'obtenir un « pattern de Pake », permettant la mesure de la distance r à l'aide de l'expression :

$$r = \sqrt[3]{\frac{\mu_0 g_A g_B \beta^2}{4\pi h \nu_{\perp}}}$$

Dans les protéines, du fait de la fréquente distribution des distances inter-spins, l'analyse des données est souvent plus difficile et nécessite des traitements de données plus élaborés. Plusieurs méthodes d'analyse ont ainsi été développées dont la plus utilisée : DEER Analysis développé par G. Jeschke et collaborateurs [131].

2.2 Utilisations de ces sondes paramagnétiques : quelques exemples

Il ne s'agit pas ici de faire une liste exhaustive des études ayant utilisé la technique de marquage de spin mais plutôt de donner quelques exemples illustrant les applications qu'offrent ces sondes paramagnétiques [113-114]. Deux enzymes modèles ont été particulièrement étudiées, le Lysozyme du bactériophage T4 et la Rhodopsine.

2.2.1 Changements conformationnels d'une protéine

L'étude des modifications spectrales d'un radical nitroxyde greffé sur une protéine permet d'étudier les changements de conformation de cette dernière [116-117]. La mobilité du radical va être affectée par les mouvements internes de la chaîne latérale sur laquelle il

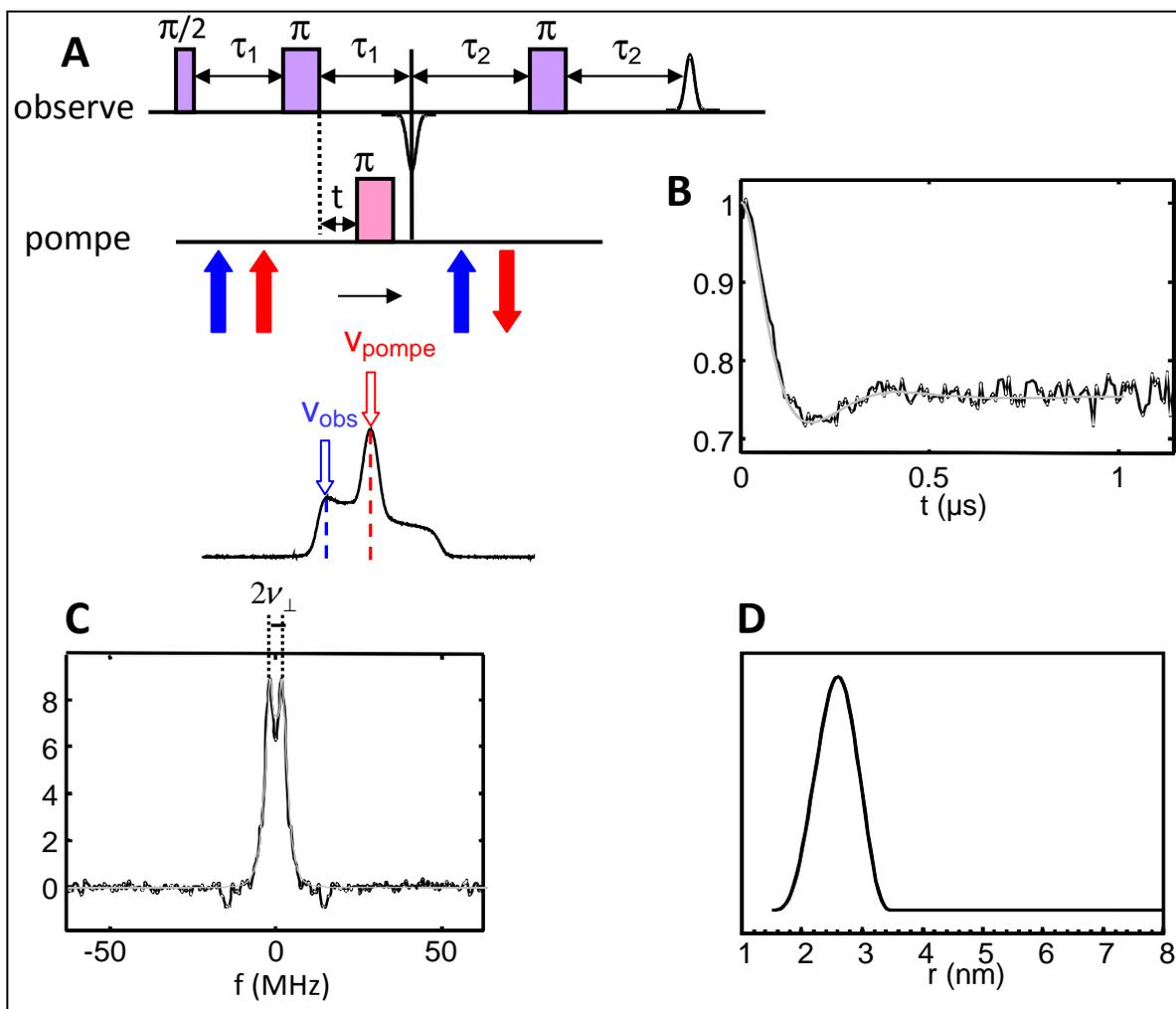


Figure 24 : Expérience de DEER. A) Séquence DEER à quatre impulsions. Sont représentés les deux fréquences d'irradiation (ν_{obs} et ν_{pompe}) sur le spectre d'absorption de nitroxydes en solution gelée. Le temps t varie au cours de la séquence tandis que τ_1 et τ_2 sont fixés. B) Signal temporel montrant la modulation de l'écho sous l'effet de l'interaction dipolaire. C) « Pattern de Pake » après transformée de Fourier du signal temporel. D) Distribution de distances interspins obtenue après régularisation de Tikhonov.

est greffé, par les fluctuations de la chaîne carbonée, par l'encombrement stérique et par le mouvement de la protéine.

L'observation de la variation de la mobilité de radicaux nitroxydes a permis ainsi l'étude de cas aussi divers que la fermeture d'une hélice dans les canaux à ions potassium bactérien [132], le mouvement de domaine lors de l'induction des répresseurs Tet [133] ou les mouvements des hélices lors du photocycle de bactériorhodopsine [134-135]. Une belle illustration de l'application de la technique SDSL pour observer des changements

conformationnels de protéines, est l'étude des deux conformations de la lipase pancréatique humaine qui consiste en l'ouverture et la fermeture d'un volet réalisée au laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines. Les données cristallographiques ne fournissant que des informations statiques, l'utilisation de sondes paramagnétiques est une technique de choix pour accéder à la dynamique du mouvement de ce volet. Cette méthode a permis également de mieux comprendre les facteurs influençant ces changements conformationnels comme le pH (figure 25) ou la présence de son cofacteur protéique et des sels biliaires [136-137].

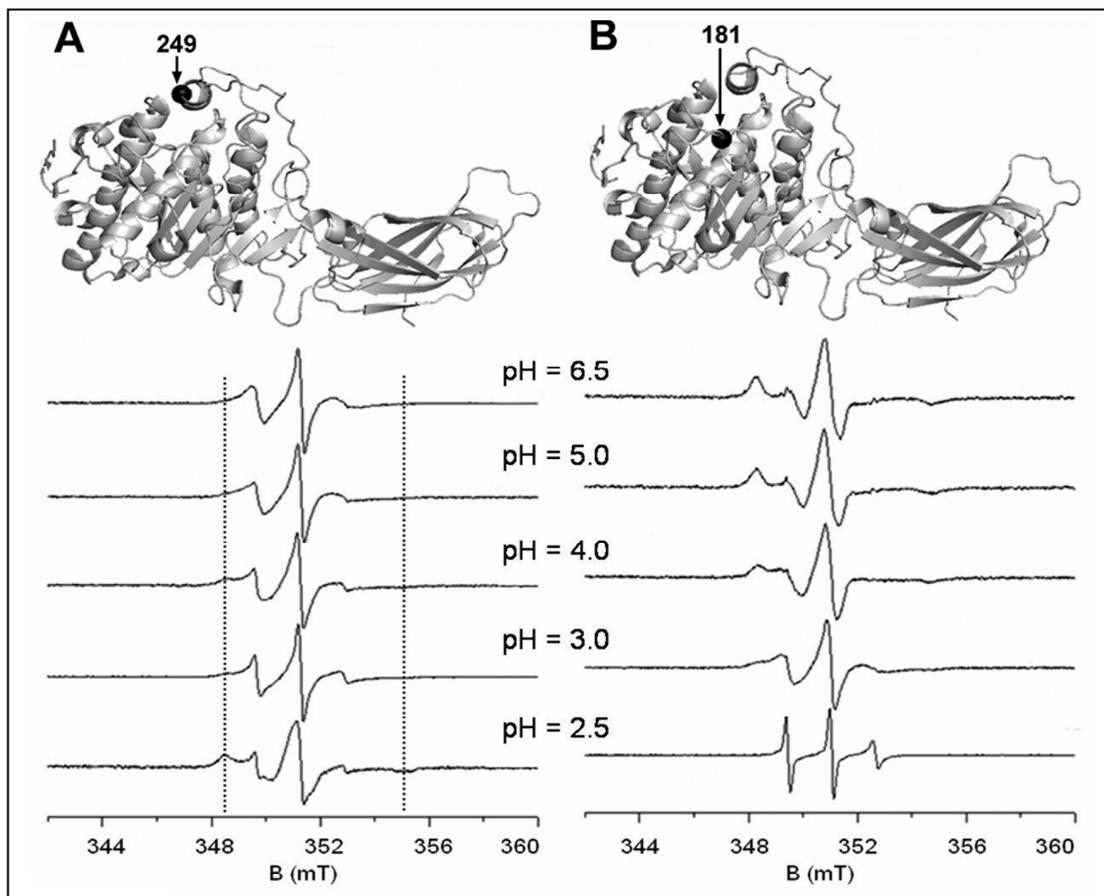


Figure 25 : Spectres RPE de la LPH marquée en position 249 (A) et 181 (B) en fonction du pH. Les pointillés en A indiquent la position des raies à bas et haut champs de la composante large du spectre RPE [137].

2.2.2 Interaction protéine-protéine ou protéine-ligand

Plusieurs études ont utilisé la mobilité des radicaux nitroxydes pour étudier des interactions protéine-protéine et ainsi cartographier la zone d'interaction. En effet, si le site de greffage choisi se situe dans une zone d'interaction, la mobilité du radical va diminuer lorsque le partenaire sera ajouté à la protéine marquée. Par exemple, une étude a été

menée pour cartographier précisément la zone d'interaction entre la protéine de myéline (rmMBP) et la calmoduline [138]. Sans le partenaire, le spectre RPE de la protéine rmMBP est caractéristique d'un marqueur avec une mobilité rapide et cela pour tous les sites marqués. En présence de calmoduline, un spectre composite a été observé. Celui-ci étant constitué d'une forme large, preuve de l'interaction et d'une forme rapide indiquant que toute la protéine ne s'était pas liée.

La technique a été appliquée à l'étude des interactions entre la protéine d'arrestine et l'état phosphorylé de la rhodopsine [139]. 28 mutants marqués de l'arrestine ont été utilisés pour caractériser le complexe. Les auteurs ont pu décrire des complexes uniques dans l'état non actif de la rhodopsine (à l'obscurité) et dans son état actif (à la lumière), et identifier les sites clés de reconnaissance lorsque l'arrestine interagit avec la rhodopsine activée (figure 26).

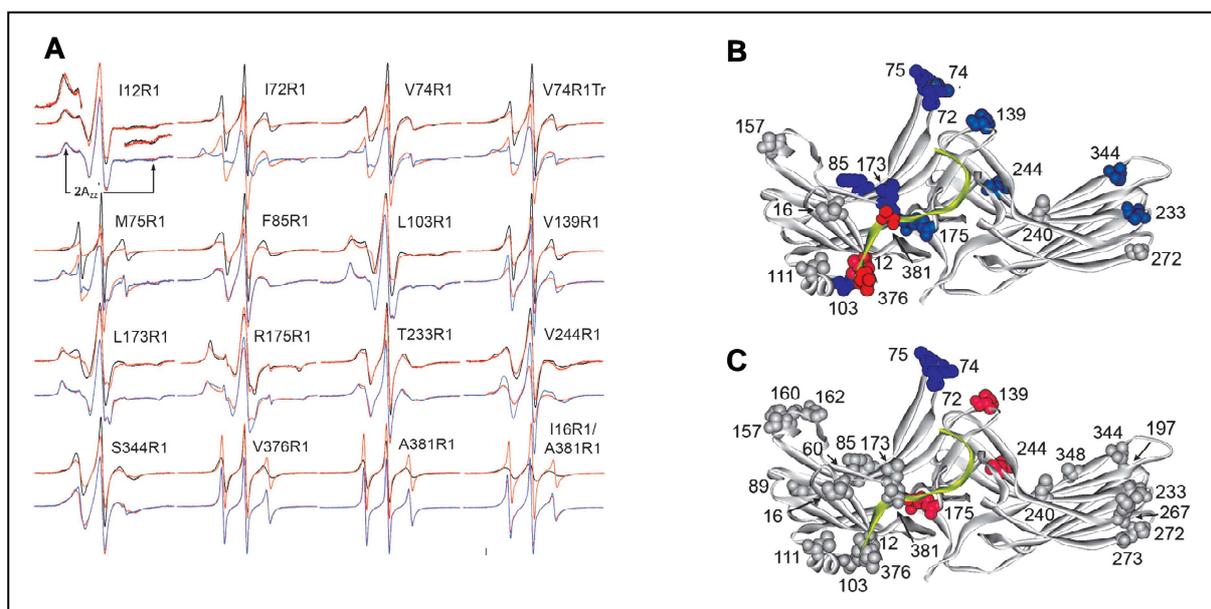


Figure 26 : (A) Spectres RPE de mutants marqués de l'arrestine en solution ou lié à la rhodopsine active ou inactive. Pour chaque mutant, les spectres normalisés en absence (noir) ou en présence de rhodopsine inactive (rouge) sont représentés sur la première ligne ; et les spectres en présence de rhodopsine inactive (rouge) ou active (bleu) sont représentés sur la deuxième ligne. (B) et (C) Résumé des changements de mobilité induit par l'interaction arrestine/rhodopsine. Les changements de mobilité sont caractérisés par des couleurs : gris, pas de changements ; rose/rouge, petite et grande augmentation de mobilité respectivement ; bleu clair/bleu foncé, petite et grande diminution de mobilité respectivement. (B) Changements sous interactions avec la rhodopsine inactive. (C) Changements supplémentaires lors de l'activation de la rhodopsine par la lumière. (Le domaine C-terminal est en jaune) [139].

En 2005, les interactions entre SecA, protéine indispensable à la translocation des protéines membranaires, et SecB, protéine chaperon aidant à l'association entre SecA et la protéine membranaire, dans les systèmes sécréteurs des bactéries à Gram-négatif ont été analysées [140]. 41 mutants marqués de SecB ont été produits, chacun étant apte à se lier à SecA. Les changements spectraux observés ont été attribués à l'interaction de SecA sur l'interface dimérique de SecB. Enfin, l'interaction entre le domaine C-terminal de la nucléoprotéine du virus de la rougeole (appelé Ntail), qui est désordonné, avec le domaine C-terminal de la phosphoprotéine (domaine appelé XD) a été observée à l'aide du marquage de spin et de la RPE. 14 sites ont été marqués afin de localiser la zone d'interaction entre les deux partenaires (figure 27). Cette étude a permis de cartographier le repliement α -hélicale que subit Ntail en présence de XD, montrant ainsi la capacité de la technique à révéler des processus de repliement induit, c'est-à-dire des transitions désordre-ordre survenant au sein de protéines désordonnées lors de leur association avec un partenaire physiologique [45].

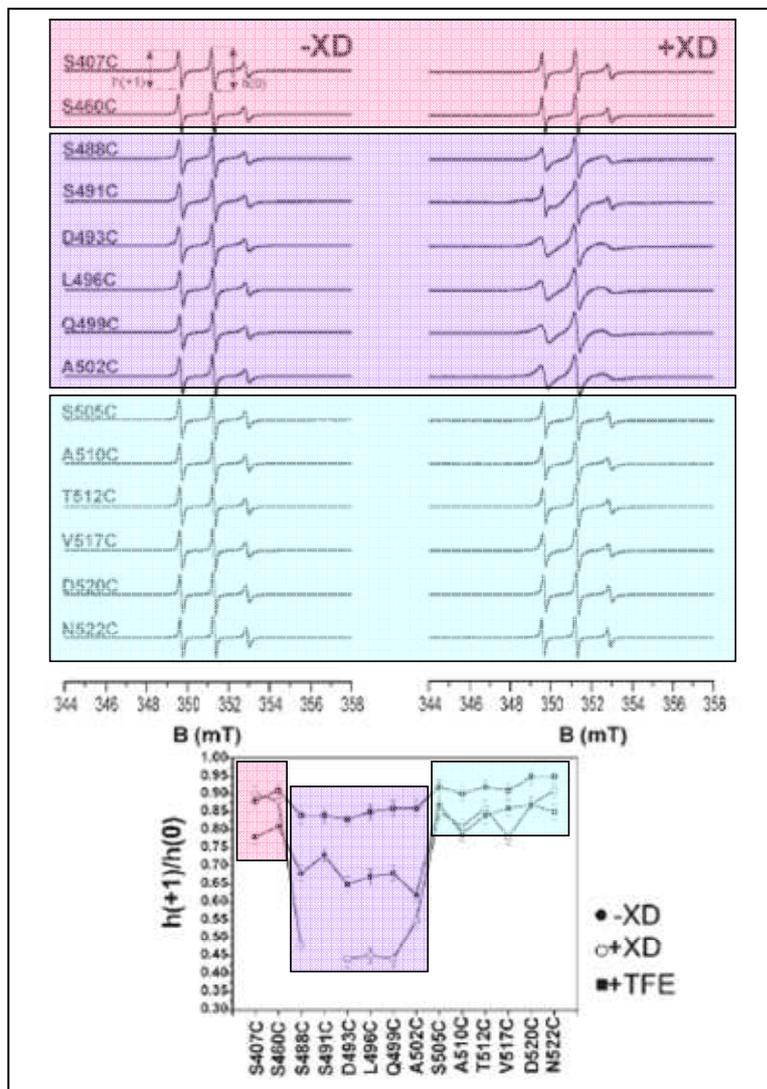


Figure 27 : Spectres RPE des mutants marqués de la protéine Ntail en absence (gauche) ou en présence (droite) de son partenaire XD. (Bas) Représentation du rapport $h(+1)/h(0)$ des protéines Ntail marquées libres et en présence soit de XD soit de TFE en fonction des positions de marquage. Les changements de mobilité sont représentés par des cadres de couleur : rose, pas de changements ; violet, forts changements ; bleu, faibles changements [45].

2.2.3 Mesure de distances entre deux centres paramagnétiques

Comme on l'a vu dans le paragraphe 2.1.6, il est possible de mesurer des distances entre deux espèces paramagnétiques grâce à l'interaction dipolaire qui existe entre elles. Les deux centres paramagnétiques peuvent être de natures diverses : deux radicaux nitroxydes, un radical nitroxyde et ion métallique... Il est ainsi possible d'étudier la dynamique d'un domaine de protéine [141] ou bien de déterminer la distance entre deux protéines en interaction [45]. Les avancées récentes en RPE impulsionnelle ont permis l'émergence des techniques de DEER, qui permettent de sonder des distances beaucoup plus grandes qu'en RPE en onde continue. Voici quelques exemples de travaux ayant utilisé cette technique. Park *et al* [142] ont appliqué la technique de DEER pour comprendre l'arrangement du complexe CheA-CheW chez *Thermotoga maritima*, deux récepteurs transmembranaires responsables de la chimiotaxie de cette bactérie. Ils ont ainsi pu prédire une structure de ce complexe, construite à partir de 40 distances.

En 2009, une étude a été réalisée pour étudier les changements conformationnels d'un transporteur ABC (MalFGK₂-E) (transporteur ATP Binding Cassette). Différents sites de ce transporteur ont été choisis pour être marqués et étudiés en RPE pulsée. Les données obtenues ont mené à trois principales conclusions. Premièrement lorsque MalE est lié au transporteur, il réduit la flexibilité intrinsèque de la boucle périplasmique de MalF (MalF-P2). Deuxièmement, trois conformations différentes de MalF-P2 ont été trouvées. Enfin, et le plus important, il a été mis en évidence une dépendance réciproque des changements conformationnels du côté périplasmique et cytoplasmique du transporteur, c'est-à-dire une communication réciproque. Les auteurs ont suggéré que ce mécanisme soit caractéristique des transporteurs ABC [143].

Comme dit précédemment, on peut mesurer des distances entre un nitroxyde greffé et un cofacteur natif dans son état paramagnétique présent dans une protéine. Des travaux ont été réalisés sur *Rhodobacter sphaeroides* pour déterminer la distance entre un radical nitroxyde greffé sur une cystéine de la sous unité H du centre de réaction photosynthétique et l'état anionique de la semiquinone de l'accepteur primaire (Q_A) [144]. La trace temporelle obtenue en DEER d'un échantillon maintenu dans l'obscurité ne montre aucune modulation du fait que Q_A n'est pas dans son état paramagnétique. L'échantillon illuminé montre clairement une modulation de l'écho dû à la présence de la semiquinone paramagnétique à proximité du marqueur. L'analyse des données a révélé une distance moyenne de 3,05 nm entre Q_A et le marqueur. Cette étude a permis de montrer qu'il était possible de déterminer une distance entre un cofacteur paramagnétique et un marqueur dans une protéine transférant des électrons et ce de manière précise (en accord avec les données

cristallographiques). Cette méthode est donc bien adaptée pour détecter les changements dans la conformation d'une protéine lors du transfert électronique.

2.2.4 Etude de deux cas particuliers

A. Le lysozyme T4

Le lysozyme du bactériophage T4 (ou T4L) est une enzyme de 164 acides aminés dont la fonction est d'hydrolyser les polysaccharides. C'est un système modèle idéal car il existe un grand nombre de données thermodynamiques et structurales, notamment une étude sur l'influence que peuvent avoir les mutations sur la stabilité de l'enzyme [145]. Il est composé de deux domaines constitués d'hélices α reliés par une hélice et on recense un très grand nombre de structures cristallographiques de l'enzyme sauvage et mutée [146-147]. A partir de cette protéine modèle, les bases de l'interprétation des spectres RPE du T4L marqués en de nombreux sites ont été posées, grâce aux travaux respectifs de Hubbell et Mchaourab [148-149]. Les auteurs ont pu montrer que la mobilité du radical augmentait en fonction du degré de structuration des éléments où se trouvait le marqueur : sites enfouis, sites avec interactions tertiaires, sites accessibles au solvant et sites sur boucle (figure 28).

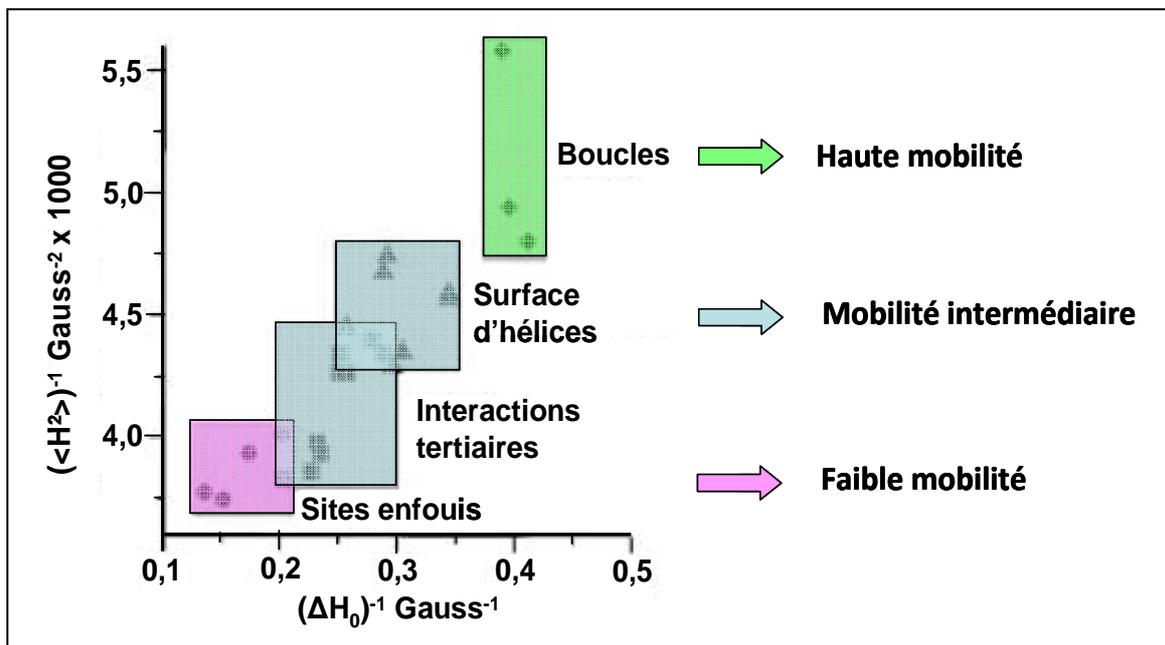


Figure 28 : Représentation des paramètres semi-empiriques décrivant la forme spectrale de la sonde greffée en différents sites du T4L. (ΔH_0) est la largeur pic à pic de la raie centrale et $\langle H^2 \rangle$ le second moment du spectre [149].

Ils ont également analysé la mobilité du marqueur à la surface des structures secondaires en hélices α et montré que cette mobilité dépendait peu des acides aminés voisins mais plutôt de la dynamique interne de la chaîne polypeptidique et des interactions tertiaires. Les auteurs ont également proposé que l'origine de la mobilité de la chaîne latérale du marqueur soit due à l'immobilisation de la liaison S-S, probablement par interaction avec la chaîne carbonée de la protéine. Ce résultat a pu être confirmé par la résolution de structures cristallines portant un marqueur sur différents sites du T4L [150]. En 1997, Mchaourab poursuit son étude sur cette protéine afin de déterminer les différentes conformations du lysozyme T4 en solution [151]. Les résultats obtenus mettent en évidence un mouvement de courbure d'une charnière dans le T4L qui traduit le passage d'une conformation ouverte à fermée de la protéine, comme observé dans différentes formes cristallographiques. La technique SDSL a permis d'affirmer que la structure en solution du T4L ressemble à celle de l'état cristallographique ouvert, tandis que celle du T4L liée au substrat correspond à la forme fermée. Cette étude montre la capacité de la technique SDSL à cartographier des réarrangements conformationnels impliquant de petits déplacements d'hélices. Enfin, plus récemment, une étude de la dynamique du T4L a été faite en utilisant la RPE à plusieurs fréquences et différentes températures [152].

Cette protéine a également été utilisée pour montrer l'influence des fluctuations de la chaîne polypeptidique sur les spectres RPE des sondes paramagnétiques [153], pour tester une nouvelle stratégie de marquage (cf chapitre 5) [154], et pour mettre en évidence la présence de rotamères de la chaîne latérale de la sonde [155]. Ces rotamères sondent des environnements locaux différents, ce qui mènent à des spectres RPE composites similaires à ceux que l'on peut obtenir lorsque l'on est en présence de deux conformations de la protéine avec un marqueur dans un seul état. Discriminer les deux phénomènes n'est donc pas facile mais des solutions existent néanmoins comme des calculs de dynamique moléculaire [141] ou des mesures de T_1 [156].

B. La rhodopsine

La rhodopsine est une protéine photoréceptrice contenue dans les bâtonnets situés dans les yeux des vertébrés et transforme l'énergie lumineuse en signal électrique. Cette protéine est constituée de 348 acides aminés formant sept hélices α transmembranaires. La lumière induit l'isomérisation du chromophore 11-cis-rétinal qui conduit à un changement conformationnel de la rhodopsine du côté cytoplasmique qui mène à l'activation de la protéine G transducine [157]. En absence de structure cristallographique, un modèle avait été construit donnant une idée du motif général de la rhodopsine, mais il manquait des

informations structurales spécifiques, en particulier dans les régions des boucles entre deux hélices impliquées dans l'activation de la transducine. La technique de marquage de spin a donc été appliquée pour essayer de comprendre les changements structuraux mis en jeu lors de la photoactivation de la rhodopsine. Une première étude a été faite en 1995 sur 20 mutants cystéines situés sur une boucle entre les hélices 3 et 4 [158]. La mobilité du marqueur, déduite des spectres RPE, a pu appuyer les observations faites sur un modèle montrant que l'hélice 3 avait beaucoup plus de contact avec le reste de la protéine qu'avec les lipides proches de la surface cytoplasmique de la membrane. Sous photoexcitation, l'analyse des spectres RPE a permis de montrer que le mouvement de l'hélice 3 subissait une rigidification par rapport aux autres hélices. En 1996, Altenbach *et al* complète les données obtenues en identifiant le même phénomène que précédemment mais sur l'hélice 7 cette fois-ci [159]. La même année, Farrens *et al* marquent des doubles mutants de la rhodopsine afin d'étudier les interactions magnétiques dipolaires entre les deux spins en RPE en onde continue. C'est le début des mesures de distances mais avec une limite de 20 Å. Ils démontrent que les extrémités des hélices 3 et 7 côté cytoplasmique sont proches l'une de l'autre sous photoactivation, indiquant un déplacement de ces hélices [160]. Il faudra attendre 2008, pour que la technique de DEER soit appliquée à cette protéine [161]. Pour l'état inactif de la Rhodopsine, cette étude a permis d'identifier un type de structure particulier parmi sept structures différentes présentes dans la base de données. Lors du passage à l'état activé, un éloignement de 5 Å entre deux résidus de l'hélice 6 a été trouvée, impliquant un déplacement de cette hélice. D'autres petits mouvements ont été détectés mais restent difficiles à identifier en terme de changements structuraux.

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

3.1 Purification de la CP12 et de son partenaire la GAPDH

Afin de produire les deux partenaires, la CP12 et la GAPDH, en grande quantité, ces protéines de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* sont produites par la bactérie *Escherichia coli* en système recombinant, au sein de l'équipe « enzymologie de complexes supra-moléculaires » dirigée par le Docteur Brigitte Gontero-Meunier du laboratoire Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP).

La souche d'*Escherichia coli* possède un plasmide contenant la séquence ADN de la CP12 ou de la GAPDH, ce qui permet à la bactérie de produire la protéine. Dans le cas de la CP12, cette protéine est produite avec une étiquette polyhistidine en plus de sa séquence. Les résidus histidines possédant une affinité pour le nickel, cela permet par la suite de purifier la protéine à l'aide d'une colonne appropriée. Il a été montré par cette équipe que cette étiquette n'a pas d'incidence sur la structure de la protéine.

3.1.1 Préparation de la CP12 et de ses mutants

Les cultures sont centrifugées à 4500 rpm pendant 10 min à 4°C et les culots bactériens sont resuspendus dans un tampon Ni-NTA (NaH₂P, 2H₂O 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 10 mM pH8) complété avec du lysozyme 1 mg/mL et des inhibiteurs de protéases (0,5 µL/mL, cocktail Sigma). Les cellules sont ensuite cassées par sonication et l'extrait brut des protéines solubles est obtenu par centrifugation à 11 000 rpm pendant 30 min à 4°C.

Afin de purifier la CP12, une chromatographie d'affinité pour le nickel est réalisée. Ce métal est fixé sur une résine d'acide iminodiacétique insolubilisé sur Sépharose 6B. La colonne, de dimension 1,2 cm (diamètre) X 8 cm (hauteur), est chargée en nickel avec une solution de NiCl₂, 6H₂O à 5 mg/mL puis rincée avant de l'équilibrer avec du tampon Ni-NTA. L'échantillon une fois chargé, la colonne est lavée avec ce même tampon. L'élution des protéines possédant une forte affinité pour le nickel (comme c'est le cas de la CP12 qui possède une étiquette contenant 10 histidines) a lieu grâce à un gradient de concentration d'imidazole (de 10 à 250 mM). Les fractions contenant la CP12 sont réunies puis concentrées et dialysées dans un tampon Tris 50 mM NaCl 0,1 M pH 8 sur centricon dont le seuil de coupure est de 5 kDa.

3.1.2 Préparation de la GAPDH

Les culots bactériens préalablement obtenus après centrifugation à 4500 rpm pendant 10 min à 4°C sont resuspendus dans un tampon TA (Tris 30 mM, EDTA 4 mM) pH 8,8

contenant du NAD 0,1 mM, du DTT 2 mM, de la benzonase, du MgCl₂ 10 mM du lysozyme 40 µg/mL et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Les protéines solubles sont obtenues après sonication puis ultra-centrifugation à 40 000 rpm pendant 40 min à 4°C.

Une chromatographie échangeuse d'anions : DEAE-Trisacryl est ensuite réalisée. Un groupe diéthylaminoéthyl (DEAE) est greffé sur un support. Ce groupe est chargé positivement et permet de fixer les protéines chargées négativement au pH auquel la chromatographie est réalisée. La colonne est équilibrée avec du tampon TA pH 8,8 auquel est ajouté du NAD 0,1 mM et du DTT 2 mM. La GAPDH recombinante est éluée lors du rinçage de la colonne dans le même tampon que celui utilisé pour l'équilibrer.

Les fractions contenant la GAPDH sont rassemblées puis précipitées au sulfate d'ammonium, 60 % dans la solution, pendant 20 minutes à 4°C. La protéine est ensuite centrifugée 30 minutes à 13 000 rpm et le culot est repris dans un tampon S300 (Tris 30 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,1 M) NAD 0,1 mM pH 7,9. Afin d'éliminer le sulfate d'ammonium, l'échantillon est déposé sur une colonne PD10. On récupère un volume de 2 mL que l'on concentre à l'aide d'un centricon de seuil de coupure de 30 kDa à 4 500 rpm jusqu'à obtention d'un volume d'environ 1 mL. La concentration de la GAPDH est déterminée à l'aide du test de Bradford (cf 3.3.1) et un test d'activité (cf 3.4.1) est réalisé pour contrôler que la protéine purifiée est bien la GAPDH.

3.2 Purification de NarJ et synthèse de son peptide partenaire

3.2.1 Obtention de NarJ et de ses différents mutants

La protéine NarJ d'*Escherichia coli* ainsi que les différents mutants utilisés au cours de ce travail ont été produits et purifiés dans l'équipe dirigée par le Docteur Axel Magalon du Laboratoire Chimie Bactérienne (LCB, UPR 9043, équipe Biogenèse des métalloprotéines et respiration anaérobie chez les microorganismes). Chaque protéine contient une étiquette 6 Histidines pour faciliter la purification.

Les cellules sont récoltées puis lavées dans un tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,6. Elles sont cassées à la presse de French. L'extrait brut obtenu est soumis à une étape d'ultracentrifugation (30 min à 45000 rpm) pour séparer la fraction membranaire de la fraction soluble. L'extrait soluble est ensuite filtré à 0,2 µm pour éviter les micros débris qui peuvent endommager une colonne de purification.

L'extrait filtré est chargé sur une colonne à Nickel Ni-NTA superflow de 5 mL (Qiagen) préalablement équilibrée dans le tampon de fixation Tris 50 mM NaCl 0,5 M Imidazole 10 mM pH 7,6. L'éluion des protéines est réalisée par une concentration croissante

d'Imidazole. La protéine NarJ est éluée à la plus haute concentration en Imidazole (250 mM). La protéine purifiée est ensuite dialysée pour éliminer l'Imidazole dans un tampon Tris 50 mM NaCl 0,1 mM pH 7,6.

3.2.2 Synthèse des différents peptides

Le peptide NarG 1-15 (MSKFLDRFRYFKQKG) utilisé dans cette étude, a été synthétisé chimiquement et purifié par l'entreprise Synprosis (Fuveau). La masse moléculaire (1950 Da) du peptide a été vérifiée par spectrométrie de masse.

3.3 Dosage de la concentration des protéines

3.3.1 La méthode de Bradford

Pour la CP12, chaque concentration des protéines étudiées a été déterminée par la méthode de Bradford [162]. Cette méthode est basée sur la propriété du bleu de Coomassie à se lier spécifiquement aux protéines, c'est un dosage colorimétrique. Le bleu de Coomassie change de couleur en fonction de la concentration de protéine, le réactif est rouge quand il n'est pas lié à la protéine et devient bleu lorsqu'il forme une liaison avec une protéine avec une absorption maximale à 595 nm.

x µL de l'échantillon sont prélevés puis ajoutés à 800 µL – x µL d'eau. On rajoute ensuite 200 µL de réactif au bleu de Coomassie concentré (Biorad). Le mélange est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture de la densité optique est ensuite effectuée à 595 nm au spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 25 UV//Vis et la concentration de la protéine est calculée grâce à la relation suivante :

$$[prot] = \frac{A_{595} * 18}{V}$$

avec :

A_{595} : l'absorbance mesurée à 595 nm.

V : le volume prélevé de l'échantillon mis dans le test.

[prot] : la concentration en protéines.

3.3.2 Détermination de la concentration en protéines par la technique de Lowry

Toutes les préparations faites avec NarJ ou un mutant ont été dosées à l'aide de la technique de Lowry [163]. Cette technique colorimétrique dose les acides aminés aromatiques en mesurant la DO d'un échantillon à 750 nm.

La protéine est mise à réagir avec un réactif cuivrique alcalin (mélange d'une solution de carbonate de sodium alcalin et d'une solution de sulfate de cuivre et de tartrate de sodium et potassium) pendant 10 minutes à température ambiante. Le réactif de folin (complexe phosphomolybdique-phosphotungstique) est ensuite ajouté et va permettre la réduction des acides aminés aromatiques, et ainsi conduire à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance, après 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Une gamme étalon avec comme standard protéique la BSA (Bovine Serum Albumine) est réalisée pour permettre la détermination de la concentration de notre échantillon.

3.4 Contrôle des propriétés biochimiques et biophysiques des protéines

3.4.1 Mesure d'activité enzymatique de la GAPDH

Ce test est non seulement utilisé pour contrôler la pureté de la GAPDH mais va aussi servir à évaluer l'effet inhibiteur de la CP12 sur l'activité de la GAPDH. Toutes les mesures de cinétique sont réalisées avec un spectromètre UNICAM UV/VIS UV2 ou un spectromètre Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS. La cinétique de la GAPDH (pour la réaction voir figure 54 partie 5.1.5) est étudiée par mesure d'absorbance à 340 nm, longueur d'onde pour laquelle l'absorption par le NADPH et le NADH est maximale ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les tests cinétiques se font dans un volume total de 1 mL à température ambiante. Le milieu réactionnel est constitué du tampon glycyl glycine 50 mM, EDTA 0,5 mM, MgCl_2 , 10 mM KCl 50 mM, pH 7,7, appelé réactif 7,7.

Le substrat de la GAPDH, le biphosphoglycérate (BPGA), est présynthétisé en présence de 3-phosphoglycérate (PGA) 0,2 M, de phosphoglycérate kinase (PGK) 4,5 u et d'ATP 0,1 M, à 37 °C pendant 20 minutes. Pour la mesure de l'activité de la GAPDH, le milieu comprend du réactif 7,7, du DPH, du BPGA et de la CP12 ou des mutants suivant les tests. La GAPDH est ajoutée en dernier. L'activité ($\Delta A/\text{min}$) est donnée directement par le logiciel du spectromètre.

3.4.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes (gel SDS-PAGE)

Pour contrôler la qualité des protéines après purification et marquage, un gel SDS-PAGE est réalisé. Les protéines sont reprises dans un tampon de dénaturation (SDS 2%, glycérol 4%, Tris-HCl 0,2 M pH 6,8, Bromophénol Blue 0,05 % w/v). Du DTT 20 mM peut être rajouté selon l'état d'oxydoréduction recherché pour la CP12. Suite à ce traitement, les protéines sont chargées négativement et la séparation sur gel ne se fait qu'en fonction de la masse moléculaire. 5 à 15 µg de protéines sont chargés sur un gel de polyacrylamide entre 10 à 15 % selon les échantillons. Les protéines sont chauffées 5 minutes à 100 °C avant d'être déposées sur le gel. La migration a lieu dans un tampon constitué de Tris 50 mM, glycine 380 mM et SDS 0,1 % (1 % pour NarJ) et se fait à 120 V (ou de 90 V à 120 V pour NarJ) grâce à un système Bio-Rad Mini Protean II. Les protéines sont ensuite révélées par coloration au Bleu de Coomassie.

3.4.3 Electrophorèse en conditions natives

Cette technique sépare les protéines sur gel de polyacrylamide sans détruire les interactions entre monomères ou partenaires de complexes macromoléculaires. On va l'utiliser pour contrôler que l'association entre les différentes CP12 et la GAPDH a bien lieu. La migration se fait en fonction de la charge de la protéine et de sa masse moléculaire. Les échantillons ne sont soumis à aucun traitement au préalable et les migrations sont réalisées grâce à l'appareil Phast System, sur des gels de gradient d'acrylamide de 4-15 % prêts à l'emploi (GE Healthcare). Les protéines sont révélées par Bleu de Coomassie ou par immunoempreinte.

3.4.4 Immunoempreinte (luminol ou phosphatase)

La reconstitution du sous complexe CP12 (sauvage, marquée, mutée, mutée et marquée)/GAPDH est réalisée en mélangeant la CP12 et la GAPDH dans un rapport molaire 1 : 3, à 30°C dans un tampon TA NAD 0,1 mM, cys 5 mM. Après une électrophorèse en conditions natives, les protéines sont transférées passivement sur une membrane de nitrocellulose pendant la nuit dans un tampon de transfert : Tris 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 50 mM et DTT 0,1 mM pH 8. La membrane est ensuite saturée avec du lait 5 % dans du tampon PBS (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Tween 20 0,1 % (v/v), pH 7,4). La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre la CP12 (dilution 1/2000^e ou 1/5000^e) pendant 1 h à température ambiante. La membrane est rincée avec du PBS et incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire

(dilution 1/10000^e). Enfin, après rinçage à l'eau, les protéines sont révélées par la phosphatase alcaline. Un deuxième système de révélation a aussi été utilisé, la chimiluminescence (ECL, « enhanced chemiluminescence »). Dans ce cas là, le mélange CP12/GAPDH était équimolaire, la dilution du 1^{er} anticorps était de 1/10000^e et les anticorps secondaires étaient couplés à la peroxydase qui sert de catalyseur lors de la réaction d'oxydation du luminol avec le peroxyde d'hydrogène (production d'une émission lumineuse).

3.4.5 Dichroïsme Circulaire (CD)

L'échantillon est placé dans une cuve de trajet optique de 1 mm à une concentration de 0,09 mg/mL pour la CP12 et de 0,1 mg/mL pour NarJ. Tous les spectres ont été enregistrés à température ambiante à l'aide du spectrophotomètre Jasco J-810. Pour toutes les protéines, les spectres CD ont été obtenus dans les conditions suivantes : λ varie de 260 nm à 190 nm, rapidité du scan = 20 nm/min, 2 ou 4 scans. Le tampon utilisé est un tampon phosphate 10 mM à pH 6,5 (CP12) ou 7 (NarJ) filtré.

Après soustraction du spectre du tampon avec ou sans TFE (2,2,2-trifluoroéthanol, stabilisateur d'éléments de structures secondaires), les spectres acquis correspondant à l'ellipticité θ_λ , sont convertis en ellipticité molaire en utilisant la relation :

$$[\theta]_{mrw,\lambda} = \frac{MR_w * \theta_\lambda}{10 * d * C}$$

Avec :

$[\theta]_{mrw,\lambda}$, l'ellipticité molaire en deg.cm².dmol⁻¹.residus⁻¹

MR_w, la masse moléculaire de la protéine par nombre d'acides aminés

θ_λ , l'ellipticité en mdeg

d, la longueur du trajet optique en cm

C, la concentration en mg/L

3.4.6 Fluorescence

Des expériences de fluorescence ont été réalisées uniquement sur la protéine NarJ, ses mutants ainsi que sur les protéines NarJ mutées ou non et marquées. NarJ possède un tryptophane dans sa crevasse que l'on excite à 285 nm. Son spectre d'émission est mesuré entre 300 et 400 nm. Lors de l'ajout du peptide, un « quenching » du signal est observé.

Plusieurs spectres sont ainsi enregistrés en augmentant la quantité de peptide en solution. La même expérience est faite avec le NATA (tryptophane seul en solution) comme contrôle. L'aire sous la courbe de chaque spectre d'émission des protéines est ensuite calculée puis soustraite à l'aire sous la courbe du spectre du NATA correspondant. Ceci permet d'en déduire la constante de dissociation K_d pour chaque protéine, le K_d correspondant à la concentration pour laquelle on voit une diminution de moitié de la fluorescence. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectromètre Fluorolog-3 Jobin Yvon-Spex.

3.5 Marquage des protéines sur les résidus cystéines

La réactivité spécifique des cystéines et leur faible abondance sous la forme libre (thiol), pour la plupart des protéines, ont fait d'elles une cible de choix pour les applications de marquage de spin. Le marquage spécifique de groupements sulfhydryles utilisant les alkyles thiosulfonates reste le plus fréquent en raison de leur spécificité pour les cystéines et leur réactivité rapide dans des conditions normales. Cependant, dans ce travail, nous avons été amenés à utiliser et à développer d'autres marqueurs.

3.5.1 Réduction des cystéines

Pour un marquage efficace, une étape de réduction des cystéines, préalable au marquage, est nécessaire. Pour cela, on utilise le (2S,3S)-1,4-Bis-sulfanylbuthane-2,3-diol (dithiothréitol ou DTT) (figure 29) à une concentration de 20 mM final. Le mélange est incubé 30 minutes dans la glace. Ainsi les cystéines libres, qui sont en général à l'état oxydé, sont réduites pour permettre la réaction de marquage.

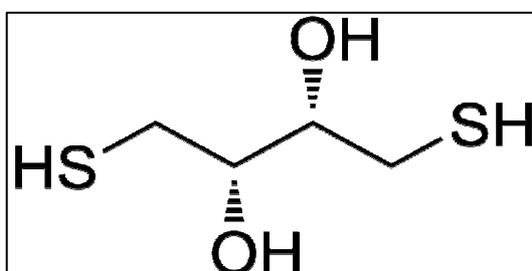


Figure 29 : Formule chimique développée du dithiothréitol (DTT).

Le DTT en excès est ensuite éliminé par chromatographie d'exclusion stérique à l'aide d'une colonne PD10 (1,5 cm X 5 cm) avant d'effectuer le marquage. Les étapes de purification de la protéine réduite sont les suivantes :

- ✓ Charge de l'échantillon (1 mL maximum) sur la colonne préalablement équilibrée avec un tampon Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,9 (NarJ) ou 8 (CP12).
- ✓ Lavage avec le tampon précédemment utilisé
- ✓ Récupération de la protéine (3 fractions de 250 µL) et analyse.

Il est à noter que cette étape n'a pas été réalisée dans le cas des mutants CP12 pour ne pas rompre le pont disulfure restant.

3.5.2 Marquage au MTSL ou au Proxyl

Le marquage spécifique des résidus cystéines s'effectue en présence d'un excès molaire de dix par rapport à la protéine de 1-oxyl-2,2,5,5-tétraméthyl- Δ 3-pyrroline-3-méthyl méthanesulfonate (MTSL, Toronto Research Chemicals Inc.) ou du 3-maleimido-proxyl (Sigma Aldrich) (figure 30).

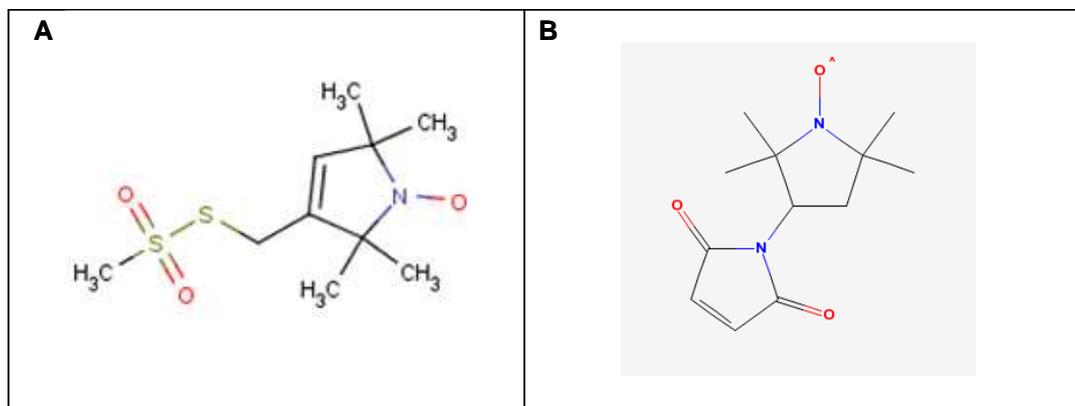


Figure 30 : Formules chimiques du MTSL (A) et du 3-maleimido-proxyl (B).

Le mélange est incubé pendant une heure sous atmosphère inerte (Argon), dans la glace, en absence de lumière et sous agitation. Ce protocole a été utilisé pour la CP12 sauvage, pour NarJ sauvage et ses mutants, et pour les peptides mutés. Un autre protocole a été mis en place pour le marquage des mutants de la CP12 ainsi que des doubles mutants NarJ afin d'augmenter le taux de marquage. Le temps d'incubation est de 4 heures avec une injection toutes les heures apportant ainsi un réactif frais au milieu. Pour les doubles mutants, le rapport molaire est également augmenté passant de 1 : 10 à 1 : 20.

Une fois la réaction finie, le marqueur en excès est éliminé par tamisage moléculaire sur une nouvelle colonne PD10. La colonne est équilibrée avec le même tampon que celui utilisé pour l'élimination du DTT. On dépose ensuite l'échantillon (1 mL) et on récupère plusieurs fractions de 250 μ L. Chacune d'elles est testée en RPE puis rassemblée suivant l'intensité du signal obtenu (figure 31) et la concentration en protéine. Il s'agit de prendre les fractions qui sont les plus concentrées en protéine tout en évitant de récupérer des fractions qui pourraient être contaminées par du radical libre, c'est pourquoi les fractions de fin d'éluion ne sont jamais prises. La détermination de la concentration en protéine est effectuée avec l'un des deux tests présentés précédemment.

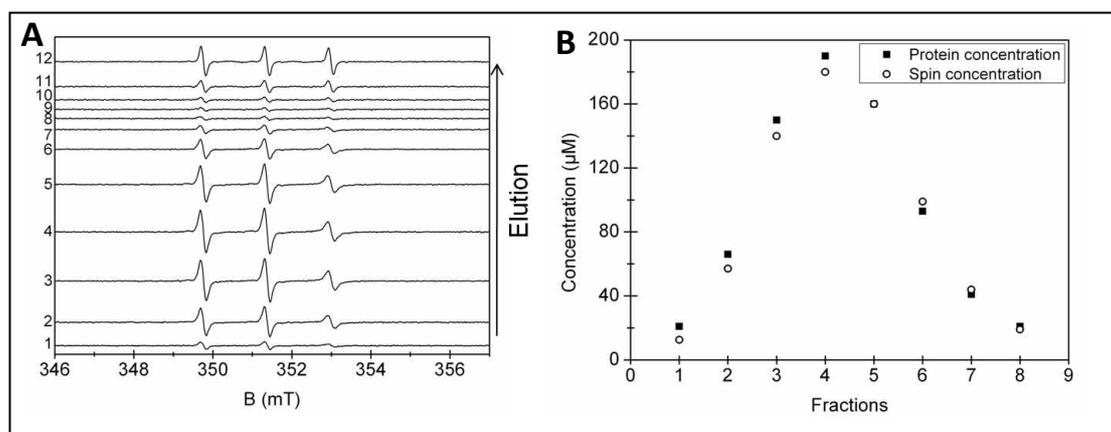


Figure 31 : (A) Spectres RPE de chaque fraction après passage sur colonne. (B) Représentation de la concentration en protéines et en spin en fonction des différentes fractions [164].

Pour les protéines NarJ, la fin du protocole a été changé au cours de ma thèse. Les fractions avec le signal RPE le plus intense sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration en utilisant des membranes de polyéthersulfone (PES) ayant une taille d'exclusion stérique de 10 kDa (vivaspin 500, Sartorius stedim).

3.6 Marquage des protéines sur les résidus tyrosines

Le marquage des cystéines a ses limites notamment quand la protéine d'intérêt possède des cystéines fonctionnelles qui ne peuvent donc pas être marquées. Il est donc nécessaire de pouvoir greffer la sonde sur d'autres résidus notamment des résidus peu abondants comme la tyrosine. La CP12 n'en possède qu'une ce qui a fait d'elle un candidat de choix pour pouvoir tester cette nouvelle stratégie de marquage.

La protéine est d'abord mise dans une solution de NaH_2PO_4 à 0,1 mM. Le formaldéhyde est ensuite ajouté avec un excès de 1250 par rapport à la protéine puis le nouveau marqueur, 4-amino-2,2,5,5-tetraméthyl-3-imidazoline-1-yloxy (noté ANINO, Acros Chemicals) (figure 32), en excès de 10. Enfin, le pH de la solution est ajusté à 6,5 avec une solution de Na_2HPO_4 à 0,1 M. La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant la nuit.

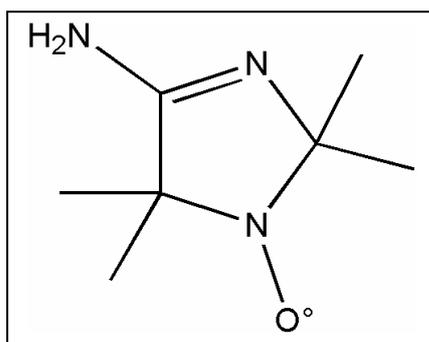


Figure 32 : Formule chimique du marqueur ANINO.

L'élimination des composants en excès est identique à celle effectuée pour les marqueurs de cystéines, en utilisant une colonne PD10. Les fractions sont ensuite rassemblées selon leur intensité spectrale et après détermination de la concentration en protéines pour chacune d'elles.

3.7 Quantification

La détermination du taux de marquage est l'étape ultime de la procédure de marquage. Il permet de juger de la qualité de ce dernier et constitue un guide pour l'optimisation du protocole de marquage. Un fort taux de marquage est plus particulièrement requis pour les doubles mutants nécessitant une forte proportion de protéines bi-marquées qui vont contribuer au signal DEER et permettre la détermination de distances inter-sondes. L'intensité intégrée du spectre RPE est proportionnelle au nombre de centres paramagnétiques. Pour effectuer cette quantification, il faut tout d'abord intégrer une première fois le spectre RPE de l'échantillon pour avoir son spectre d'absorption (figure 33). Ensuite, on mesure l'aire sous le signal d'absorption pour obtenir l'intensité intégrée. Enfin, la concentration en spin est déterminée par comparaison avec un standard, le 3-Carboxy-proxyl, de concentration connue, en tenant compte des paramètres d'enregistrement des spectres.

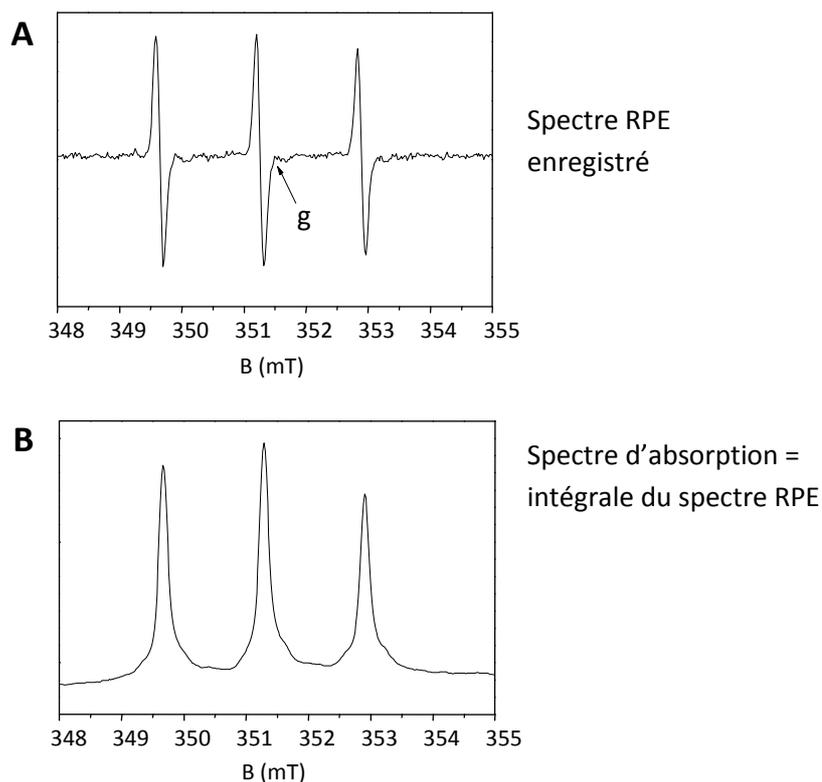


Figure 33 : Spectre RPE d'un radical nitroxyde (A) et intégrale de ce spectre (B).

On peut trouver la concentration en centres paramagnétiques grâce la relation suivante :

$$C = C_s \frac{V_s}{V} \frac{I}{I_s} \frac{RG_s}{RG} \frac{MA_s}{MA} \sqrt{\frac{P_s}{P} \left(\frac{SW}{SW_s} \frac{Rx_s}{Rx} \right)^2} \frac{Ry_s}{Ry} \frac{T}{T_s} \frac{g_s}{g} \frac{NA_s}{NA}$$

Où : C est la concentration de l'échantillon, V est le volume étudié, I est l'intensité intégrée, RG est le gain récepteur, MA est l'amplitude de modulation, P est la puissance d'enregistrement, SW est la plage de champ étudié, Rx est la résolution en x (nombre de points), Ry est la résolution en y (digitaliseur), T est la température en Kelvin, g est la valeur moyenne du facteur g , NA est le nombre d'accumulations. Tous les paramètres indicés par un « s » correspondent aux paramètres du standard, les autres à ceux de l'échantillon étudié.

Un grand nombre de paramètres ont la même valeur pour le standard et la protéine (tableau 2) d'où la simplification de la relation précédente en :

$$C_{spin} = C_s \frac{I}{I_s} \frac{RG_s}{RG} \left(\frac{SW}{SW_s} \right)^2 \frac{MA_s}{MA} \frac{NA_s}{NA}$$

Tableau 2 : Paramètres d'enregistrement pour le standard et indication des paramètres fixes et variables pour les différents échantillons marqués.

Standard : 3-Carboxy-proxyl	Echantillon : protéine marquée
$C_s = 104 \mu\text{M}$	C = variable
$I_s = 3,3.10^6$	I = variable
$V_s = 40 \mu\text{L}$	V = 40 μL
$RG_s = 5.10^3$	RG = variable
$MA_s = 1 \text{ Gs}$	MA = variable
$P_s = 10 \text{ mW}$	P = 10 mW
$SW_s = 200 \text{ Gs}$	SW = 100 ou 150 Gs
$Rx_s = 1024$	Rx = 1024
$Ry_s = 2^{17}$	Ry = 2^{17}
$g_s = 2$	g = 2
$NA_s = 1$	NA = variable

On estime une erreur de 10 % sur la concentration en spin et sur la concentration en protéine d'où un taux de marquage ($C_{spin}/C_{protéine} * 100$) estimé avec 20 % d'erreur.

3.8 Acquisition des spectres RPE

3.8.1 Température ambiante

Les spectres RPE de tous les échantillons ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre BRUKER ESP 300E équipé d'un résonateur ELEXSYS-SHQ à très haute sensibilité en bande X (environ 9,9 GHz). Les spectres sont acquis avec une source hyperfréquence en émission continue de puissance égale à 10 mW (sauf indication contraire sur le spectre) avec une modulation du champ magnétique à la fréquence 100 kHz et une amplitude de

modulation du champ de 0,1 mT (sauf indication contraire). Ces paramètres ont été optimisés pour éviter la saturation et la surmodulation du signal RPE en garantissant un rapport signal sur bruit optimal. Le nombre d'accumulation a été choisi en fonction de la concentration en protéine et en spin allant de 1 accumulation à 27 au maximum (soit un temps de mesure compris entre 1 minutes 20 et 36 minutes). Typiquement, 45 μ L d'échantillon sont placés dans un tube capillaire donnant une hauteur de solution de 4,5 cm afin de remplir la zone de la cavité.

3.8.2 Basse température en onde continue

Les spectres RPE basse température sont enregistrés à l'aide du spectromètre BRUKER ELEXSYS E500, équipé d'un système de refroidissement des échantillons par hélium liquide (cryostat Oxford ESR 900, température variable de 4 K à température ambiante). Tous les spectres ont été enregistrés à 100 K avec une amplitude de modulation de 0,4 mT pour la CP12 et 0,6 mT pour NarJ et une puissance de 0,1 mW. Pour les études en saturation, la puissance incidente varie de 0,01 mW à 40 mW.

3.8.3 Basse température en onde impulsionnelle

Les expériences de DEER ont été réalisées sur un spectromètre BRUKER ELEXSYS E580 en bande X utilisant un résonateur diélectrique standard MD5 et équipé d'une unité de régulation de la température par hélium Oxford. Tous les spectres ont été enregistrés à 60 K. Ces expériences ont été effectuées en utilisant une séquence DEER à quatre impulsions (voir paragraphe 2.1.6.B). La longueur des impulsions $\pi/2$ et π a été fixée à 16 ns et 32 ns respectivement. Les délais τ_1 et τ_2 ont été pris égaux à 200 ns et 1200 ns respectivement. La fréquence ν_{pompe} a été appliquée au maximum de l'intensité du spectre du nitroxyde correspondant à la transition $M_I = 0$, et la fréquence ν_{obs} ajustée à une fréquence de 72 MHz plus basse que ν_{pompe} correspondant à $M_I = +1$. Les signaux DEER des deux mutants NarJ monomarqués (Q104C et H21C) ont été enregistrés afin d'être utilisés pour les corrections de ligne de base des mutants doublement marqués. Le traitement du signal est effectué en utilisant le logiciel DeerAnalysis2011 sous Matlab qui permet d'obtenir une distribution de distances [131]. Une expérience dure environ 12 heures.

3.9 Traitement des spectres enregistrés à température ambiante

3.9.1 Paramètres semi quantitatifs

Pour caractériser la mobilité du radical, on peut calculer deux paramètres (figure 34) :

- ✓ $h(+1)/h(0)$ qui représente le rapport entre les amplitudes pic à pic de la raie à bas champ et de la raie à champ central.
- ✓ $h(-1)/h(0)$ qui représente le rapport entre les amplitudes pic à pic de la raie à haut champ et de la raie à champ central.

Pour toutes les protéines, le rapport $h(-1)/h(0)$ a été mesuré systématiquement car celle-ci est plus précise, la raie à bas champ étant très proche de la raie à champ central.

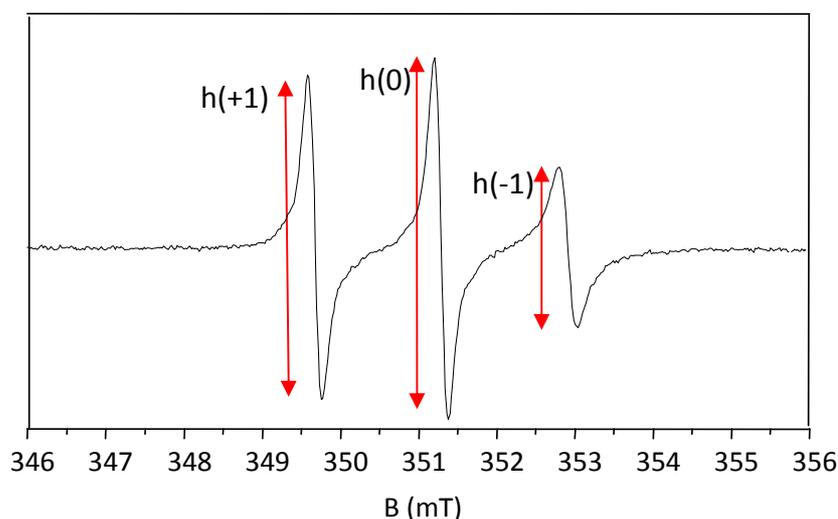


Figure 34 : Représentation des valeurs $h(+1)$, $h(0)$ et $h(-1)$ respectivement les amplitudes pic à pic des raies à bas champ, à champ central et à haut champ.

3.9.2 Simulation des spectres

Le programme EPRSIM-C utilisé pour simuler les spectres RPE nous a été aimablement fourni par le Docteur Janez Strancar (laboratoire de Biophysique, centre RPE – Institut Jozef Stefan, Ljubljana, Slovénie). Ce programme est décrit en détail dans deux articles de J. Strancar [122, 165] et est téléchargeable sur le site http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/EPRSIMC_overview.htm.

Pour un milieu polaire donné, la forme du spectre RPE d'un radical greffé sur une protéine est gouvernée par la moyenne partielle de ses tenseurs g et hyperfin. Dans le modèle proposé par J. Strancar, cette moyenne partielle est décrite par les paramètres suivants : un temps de corrélation de rotation effectif τ et deux angles (θ et ϕ) correspondant

respectivement à l'amplitude et à l'anisotropie du mouvement de rotation du nitroxyde à l'intérieur d'un cône (figure 35). La normalisation de ces deux derniers paramètres géométriques par $\Omega=(\theta.\phi)/(\pi/2)^2$ représente la restriction de mobilité subie par le radical nitroxyde, qui varie de 0 (mouvement totalement restreint) et 1 (mouvement non restreint). Ω correspond ainsi à l'espace conformationnel que le radical peut explorer. Deux autres paramètres sont requis pour la simulation : w pour la largeur de raie et p_A pour l'ajustement de la valeur principale du tenseur hyperfin, paramètre lié à la polarité de l'environnement de la sonde. Dans ma thèse, la simulation des spectres RPE à température ambiante des protéines mono marquées a nécessité au maximum deux composantes. Le logiciel effectue une régression automatique dont la qualité peut être jugée par le paramètre χ^2 .

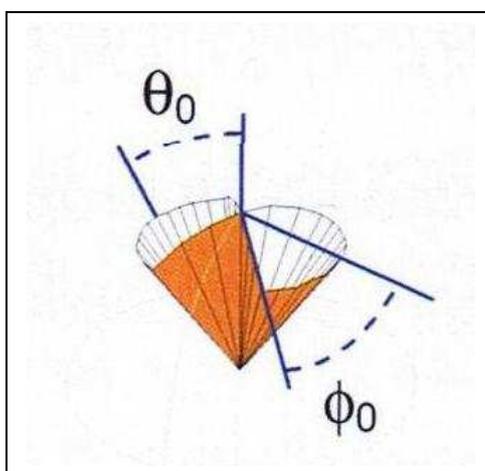


Figure 35 : Représentation des angles ϑ et φ à l'intérieur d'un cône [122].

3.10 Vérification du marquage des protéines par spectrométrie de masse

Cette technique a uniquement été utilisée pour la protéine CP12. Elle a été d'une part utilisée pour connaître la position du marqueur par rapport aux quatre cystéines de la protéine et d'autre part pour montrer le greffage spécifique sur le résidu tyrosine. Il nous fallait une preuve du greffage du nitroxyde sur cet acide aminé. Toutes les expériences ont été réalisées sur un spectromètre de masse MALDI-ToF Microflex II de Bruker (Daltonik, Allemagne)

3.10.1 Masse globale

Une vingtaine de pmoles de protéine est déposée sur un puit d'une plaque MSP 96 « target polished steel » de BRUKER. Une solution saturée de matrice à 10 mg/mL d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique dans acétonitrile/eau (0,1 % TFA) (70/30, V/V) est rajoutée. Les spots sont laissés séchés à l'air. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif et linéaire.

L'étalonnage est effectué au préalable sur les ions moyens d'une solution de protéines standard, Std ProtI (Bruker, Daltonik, Allemagne) déposée sur un spot de la plaque à proximité des échantillons à analyser. Cette solution contient de l'insuline à $[M+H]^+$ de 5734,52, du cytochrome c de $[M+2H]^{2+}/2$ à 6181,05, de la myoglobine de $[M+2H]^{2+}/2$ à 8476,66, de l'ubiquitine de $[M+H]^+$ à 8565,76, du cytochrome c de $[M+H]^+$ à 12360,97 et de la myoglobine de $[M+H]^+$ à 16952,31.

3.10.2 Digestion trypsique

Les protéines sauvages, mutées et marquées sont soit réduites dans 25 mM de bicarbonate d'ammonium à pH 8, 10 mM DTT, pendant 45 minutes à 56 °C dans le noir, puis alkylées par 55 mM d'iodoacétamine pendant 30 minutes à température ambiante, soit elles sont directement soumises à une digestion par la trypsine (Sigma) pendant la nuit à 37°C. Les solutions digérées sont ensuite acidifiées par 1 µL de 12,5 % d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau (V/V), séchées sous vide et reprises dans l'eau/TFA 0,1 % (V/V) avant d'être déposées une plaque MALDI avec addition d'une solution saturée de matrice d'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique dans acétonitrile/eau (0,1 % TFA) (70/30). Les peptides obtenus après digestion sont analysés dans une gamme comprise entre 600 et 5000 Da. L'acquisition des données est faite dans les modes positifs et réflectron. Une liste des pics est générée par une méthode PMF (Peptide Mass Fingerprint) à partir du logiciel FlexAnalysis et vérifiée manuellement. La masse des peptides mesurée expérimentalement est comparée à celle des peptides calculée théoriquement pour la séquence de la CP12, en prenant compte des modifications variables des résidus cystéines dues au groupement carbamidométhyle (CAM, incrément de masse de 57 Da), ou à l'état réduit (S^- ou $-SH$) ou oxydé ($-S-S-$, -2 Da), ou de la présence du marqueur (+ 237 Da pour le Proxyl, + 184 Da pour le MTSL, et + 180 Da pour ANINO) ainsi que de la possible oxydation des résidus méthionines (incrément de masse de 16 Da).

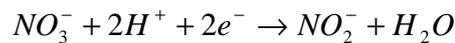
Chapitre 4 : Interaction de la protéine chaperone NarJ et de l'extrémité N-terminal de la sous-unité catalytique NarG de la nitrate réductase A d'*Escherichia coli*

4.1 Contexte actuel de la protéine NarJ d'*Escherichia coli*

4.1.1 La nitrate réductase A

La nitrate réductase A est un système modèle étudié depuis longtemps (1989) au laboratoire BIP en collaboration étroite avec le Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB). C'est un système modèle pour l'analyse du fonctionnement des complexes respiratoires, des enzymes à molybdène et de la biogenèse des cofacteurs métalliques. De nombreux articles ont ainsi été publiés concernant la caractérisation de centres métalliques de la nitrate réductase [166], le processus d'insertion du cofacteur [167] ou la biogenèse du complexe respiratoire [1].

Si le taux d'oxygène présent dans le milieu est faible, la bactérie *Escherichia coli* utilise en priorité le nitrate comme accepteur terminal des chaînes respiratoires pour respirer grâce à la Nitrate Réductase (NR). Cette enzyme utilise le pool de quinones réduit pour transférer les électrons et permettre la réduction du nitrate en nitrite suivant la réaction présentée ci-dessous. Elle fait ainsi partie des quinol:nitrate oxydoréductases.



Il existe trois NR chez *E. coli* produites dans différentes conditions physiologiques. Une nitrate réductase est périplasmique et soluble, il s'agit de Nap. Deux autres, qui sont des isoenzymes, sont membranaires et cytoplasmiques, et se nomment NarA (inductive) et NarZ (constitutive). Nous nous intéresserons uniquement à la nitrate réductase A.

La NRA est la nitrate réductase la plus étudiée, c'est un complexe multimérique constitué de trois sous-unités, ancré du côté cytoplasmique de la membrane plasmique dont la structure cristallographique est connue [168-169]. Elle a la particularité de contenir huit centres métalliques comme le montre la figure 36.

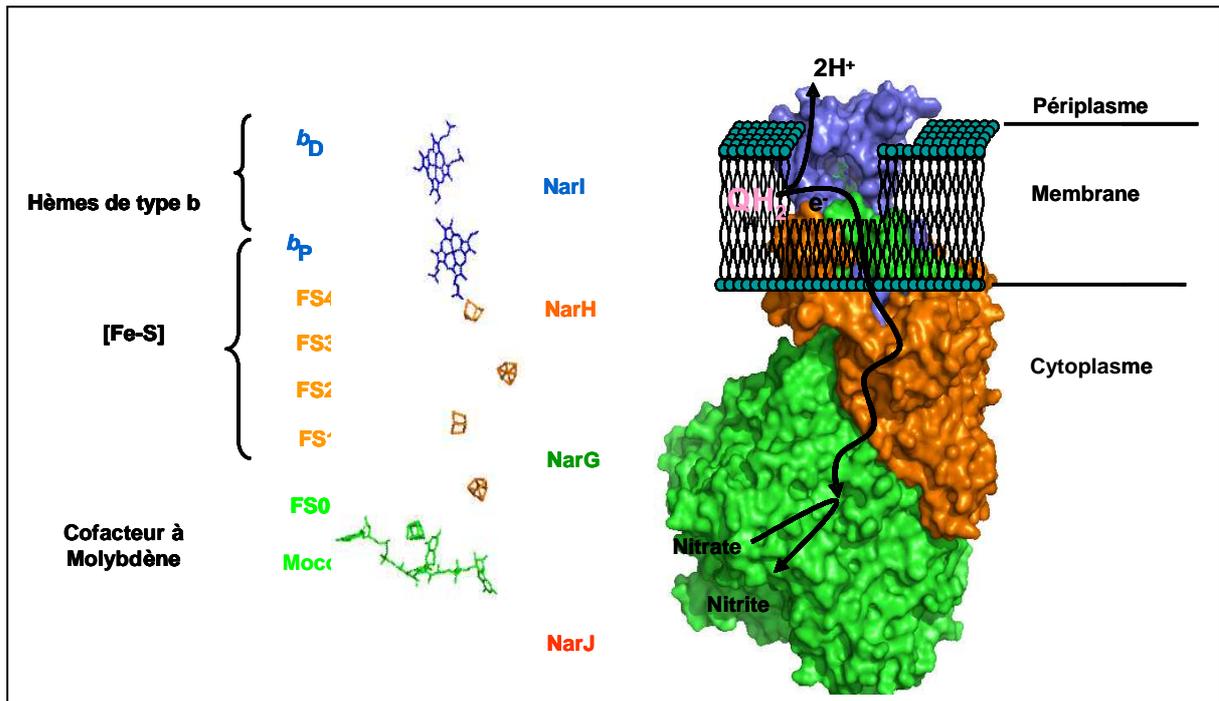


Figure 36 : Structure et composition en centres métalliques de la nitrate réductase A d'*Escherichia coli*.

NarI, la sous-unité d'ancrage du complexe à la membrane, est un cytochrome qui comporte deux hèmes de type b. La sous-unité NarH contient quatre centres [Fe-S] (FS1 à FS4) qui permettent le transfert des électrons de NarI vers la sous-unité catalytique NarG. Cette dernière comporte un centre [Fe-S] noté FS0 qui est un centre FeS particulier avec un ligand histidine [1] et le cofacteur à molybdène, ou Moco, qui est de type Mo-bis(MGD). De plus il a été montré qu'une quatrième protéine, NarJ, était essentielle à la synthèse de ce complexe nitrate réductase A actif mais qu'elle ne faisait pas partie de la structure finale de ce dernier [170-171].

4.1.2 NarJ, une protéine chaperon multifonctionnelle

NarJ est une protéine cytoplasmique qui interagit spécifiquement avec la sous-unité NarG. Blasco *et al* [167] ont montré que NarJ est indispensable à l'insertion du Moco, cette fonction passant par une interaction spécifique avec NarG. En 2004, il a été montré que NarJ permet à l'apocytocytase de se lier avec le complexe multiprotéique chargé de délivrer le Moco [172]. Enfin, plus récemment, on sait que NarJ exerce en réalité deux fonctions distinctes dans la maturation de la NRA, interagissant pour cela au niveau de deux sites distincts de la sous-unité catalytique NarG [173].

L'ensemble de ces études a permis de proposer un modèle de biogenèse. Dans un premier temps, NarJ se fixe sur l'extrémité N-terminal de NarG (les 28 premiers acides aminés) et permet de maintenir le complexe NarGH sous une forme soluble dans le cytoplasme, ceci afin d'empêcher un ancrage prématuré de l'enzyme à la membrane et permettre la réalisation des processus d'insertion des centres métalliques dans NarG. En effet, en l'absence de NarJ, l'apoenzyme (enzyme sans son cofacteur) est principalement associée à la membrane *via* NarI et a acquis un état conformationnel empêchant sa maturation *in vitro*. Le processus d'insertion du Moco est donc un événement cytoplasmique qui doit avoir lieu précisément avant l'ancrage à la membrane du complexe NR. L'interaction avec ce peptide produit vraisemblablement une gêne stérique qui empêche l'adressage de l'enzyme à la membrane. En effet, la structure cristallographique du complexe NarGHI révèle que le peptide de NarG ciblé par NarJ est en contact avec la membrane cytoplasmique lorsque l'enzyme est mature.

Dans un deuxième temps, NarJ se fixe sur la partie globulaire de NarG, dont la localisation reste à définir, pour aider à l'insertion du centre $[Fe-S]_0$ et du Moco car, si on enlève à NarG son extrémité N-terminal, cela conduit à la synthèse d'un complexe NarGH actif ayant incorporé ses divers centres métalliques. Des études ont permis de montrer la présence indispensable de NarJ lors des étapes finales de la biosynthèse du Moco pendant son transfert dans l'apo-NarG. NarJ assisterait le transfert réalisé par les protéines de biosynthèse du Moco et serait donc impliqué dans l'insertion du Moco [6]. Depuis, d'autres études réalisées en RPE au sein de l'équipe sur le contenu en centres métalliques de NarG dans un mutant ne contenant pas NarJ, ont montré l'absence du Moco mais aussi du centre FSO [1]. Cette observation implique NarJ dans l'insertion de ces deux centres métalliques. L'insertion du centre FSO précède celle du Moco et elle est indispensable pour que le Moco puisse l'être à son tour.

Un modèle a pu être proposé pour décrire les interactions séquentielles de NarJ et de l'apoenzyme qui permettent l'assemblage et l'insertion des centres métalliques au sein de ce complexe multimérique (figure 37) [173] :

- Etape 1 : Interaction de NarJ avec l'apoenzyme NarGH en deux sites distincts.
- Etape 2 : Insertion du centre FSO.
- Etape 3 : Interaction du complexe apo-NarGH/NarJ avec la machinerie de biosynthèse du Moco, puis transfert du cofacteur à molybdène.
- Etape 4 : Dissociation de NarJ et des diverses protéines chargées de délivrer le Moco du complexe NarGH qui a adopté un repliement définitif.

- Etape 5 : Ancrage de l'holoenzyme (enzyme possédant son cofacteur) sur NarI conduisant à la formation du complexe NarGHI physiologiquement actif.

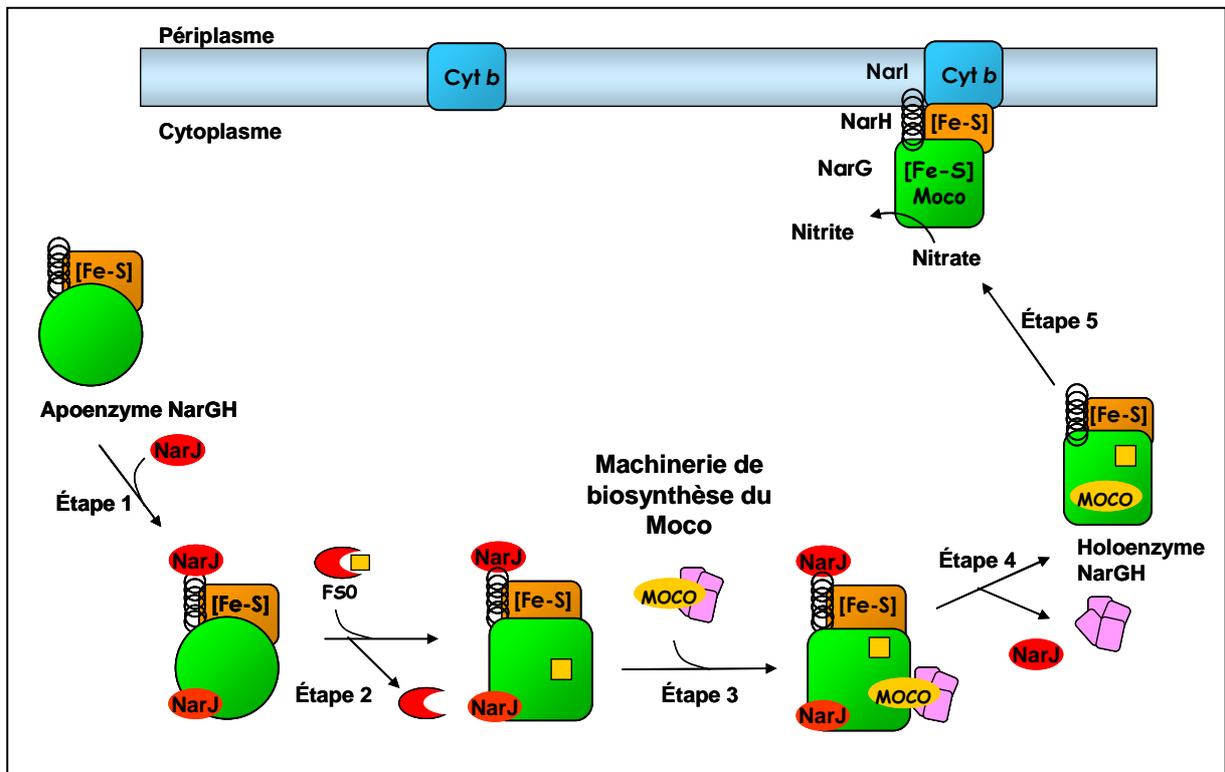


Figure 37 : Modèle de biogenèse du complexe nitrate réductase A présentant en particulier l'insertion du Moco et les différentes étapes d'assemblage des sous-unités, d'après [173].

NarJ est un exemple intéressant de la plurifonctionnalité d'une protéine chaperon spécifique. En interagissant sur deux sites distincts de NarG, elle assure la maturation de l'enzyme sur des plans différents en exerçant des fonctions différentes. Il reste à comprendre comment une même protéine chaperon est capable d'assurer des fonctions distinctes et donc il est nécessaire de suivre son interaction avec les différents sites de fixation et les conséquences structurales de cette interaction. Nous avons ainsi étudié NarJ par la technique de marquage de spin couplée à la RPE.

4.1.3 Changement conformationnel global de NarJ lors de son interaction avec le peptide de NarG

La protéine NarJ est membre d'une nouvelle famille de protéines chaperons spécifiques conservées chez la plupart des organismes procaryotes et impliquées dans la biogenèse de métalloenzymes [174]. Cette famille de protéines présente une structure commune composée uniquement d'hélices α et présentant de nombreuses zones flexibles [175-177], de ce fait la cristallographie aux rayons X est particulièrement difficile à appliquer à ces protéines. La structure cristallographique de NarJ d'*E. coli*, n'est pas connue car les tentatives de cristallisation ont échoué. Une étude par RMN a été réalisée [178] lors d'une collaboration entre A. Magalon (Laboratoire de Chimie Bactérienne) et F. Guerlesquin (Laboratoire Interactions et Modulateur de Réponses) et a montré un spectre HSQC ^1H - ^{15}N de NarJ bien résolu, confirmant que la protéine est principalement structurée. Cependant, 60 pics sur les 271 attendus sont absents sur le spectre, suggérant qu'ils se trouvent probablement dans une ou plusieurs zones flexibles de la protéine.

En l'absence de données structurales pour NarJ d'*Escherichia coli*, un modèle 3D a été construit par homologie de 21 séquences de protéines proches de NarJ dans différents organismes dont une protéine inconnue et NarJ d'*Archaeoglobus fulgidus* ainsi que DmsD de *Salmonella enterica*. A cause d'un manque de similarité, les 50 derniers acides aminés du domaine C-terminal ont été enlevés, donnant ainsi un modèle tronqué de la protéine NarJ (noté NarJT) (figure 38).

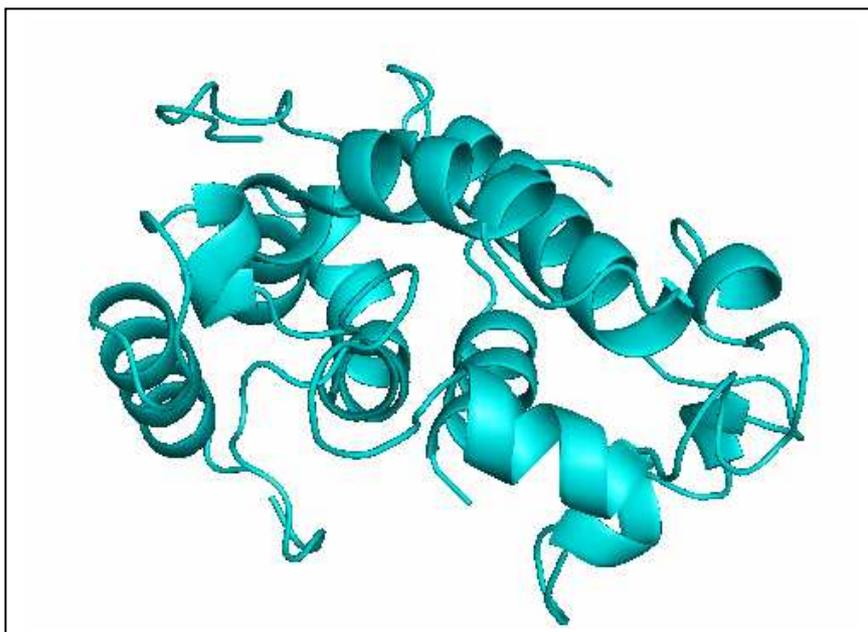


Figure 38 :
Modèle structural
en 3D obtenu pour
la protéine NarJ
tronquée
d'*Escherichia coli*
construit par
homologie de
séquences [178].

Ce modèle structural montre sept hélices α bien définies et confirme que NarJ appartient à la famille dont le repliement est composé uniquement d'hélices α . Le spectre RMN de cette protéine tronquée montre également l'absence de 60 signaux rendant impossible la résolution de la structure aussi bien pour NarJ que pour NarJT.

De précédentes études [173] ont révélé que NarJ cible spécifiquement le domaine N-terminal de NarG durant le processus de maturation. La structure par diffraction des rayons X du complexe NarGHI indique que cette région est constituée d'une hélice α (résidus 2 à 12) suivi de deux feuillets β [168]. Deux peptides ont été synthétisés : un court constitué des résidus 1 à 15 et noté NarG(1-15) et un long, comprenant les résidus 1 à 28 noté NarG(1-28). Les spectres RMN de ces deux peptides ont montré [178] :

- une structure en hélice α pour NarG(1-15)
- une structure en hélice α et une paire de feuillets β pour NarG(1-28), que l'on retrouve dans le complexe mature

Enfin, des expériences de dénaturation thermique par microcalorimétrie (DSC) et des expériences de RMN ont été réalisées sur le complexe NarJ/peptide. L'interaction entre le peptide et la protéine NarJ a tout d'abord été analysée par DSC et a conduit à l'observation d'une augmentation de la température de dénaturation du complexe de 10°C par rapport à la protéine seule. De plus, il a été montré que, lors de l'ajout du peptide de NarG, le spectre HSQC de NarJ est fortement affecté, entraînant un déplacement chimique de presque l'ensemble des pics (figure 39). Ces deux résultats ont été interprétés comme résultant d'un changement conformationnel global de NarJ lors de son interaction avec le peptide de NarG [178].

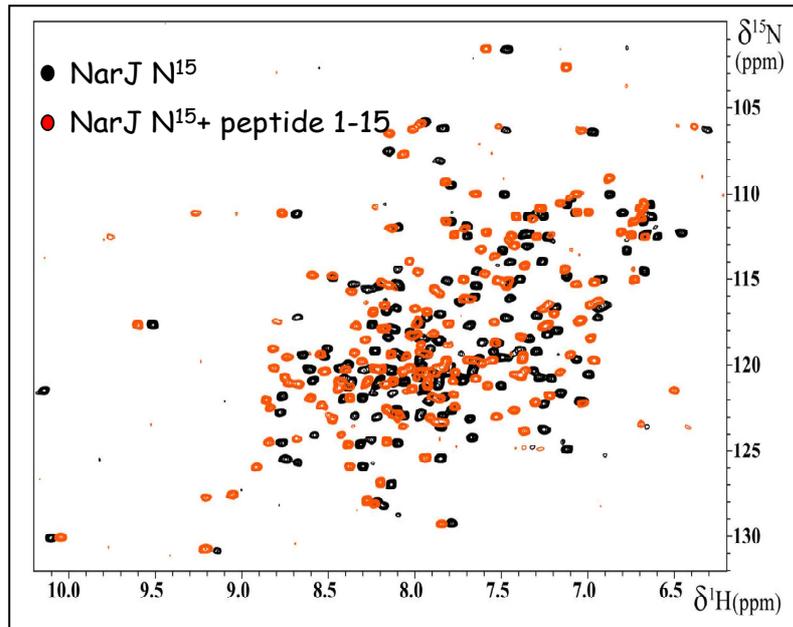


Figure 39 : Spectre HSQC $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ de la protéine NarJ en absence et en présence du peptide de NarG(1-15) [178].

Il est à noter que ces observations ont été faites pour les deux peptides de NarG synthétisés ainsi que pour NarJ et NarJ tronqué.

Afin de prédire le site d'interaction entre NarJ et NarG, des calculs d'arrimage moléculaire ont été réalisés. Six des dix meilleurs scores obtenus par la modélisation sont localisés dans une crevasse hydrophobe du modèle de NarJT (figure 40).

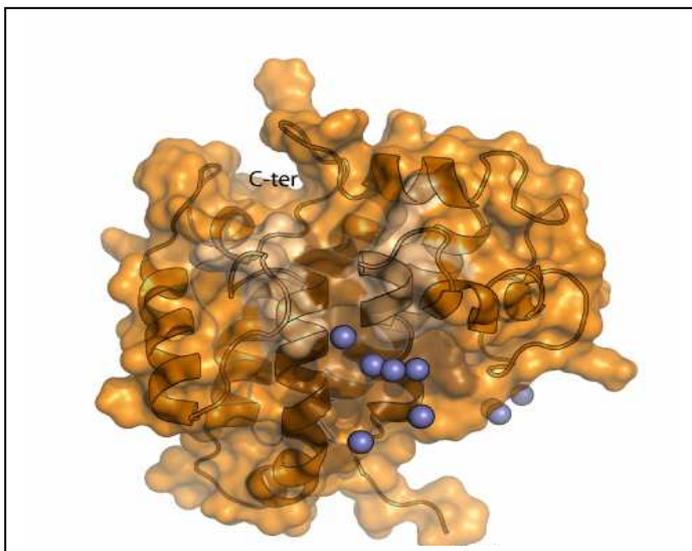


Figure 40 : Sites d'interaction entre NarJT et le domaine N-terminal de NarG prédits par des calculs d'arrimage moléculaire. Les sphères bleues représentent le centre géométrique du peptide NarG (1-15). Les dix meilleurs scores obtenus sont représentés dont six se trouvent dans une crevasse hydrophobe [178].

Enfin, une étude de répartition des charges du peptide a été réalisée. La répartition des charges du peptide des 15 résidus N-terminaux de NarG a été examinée sur le site : <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html> et ces analyses ont montré le caractère amphiphile de ce peptide. A partir de ces résultats et de ceux obtenus par ITC [178], il a été proposé que la face de l'hélice au contact de NarJ soit la face apolaire. Par ailleurs, les données structurales de la nitrate réductase A ancrée à la membrane chez *E. coli* montrent que c'est par cette même face que le peptide N-terminal de NarG interagit avec la bicouche lipidique. Cette information permet de proposer comment NarJ s'oppose à l'ancrage de l'enzyme à la membrane, sa fonction sur le premier site d'interaction : NarJ masquerait la face apolaire du peptide, empêchant un ancrage prématuré, puis après dissociation de NarG, il permettrait au complexe mature d'interagir de manière stable avec la membrane.

4.2 Etude de la flexibilité de NarJ

Comme nous l'avons vu précédemment, la RMN et la DSC ont montré que NarJ subissait un changement conformationnel global lors de son interaction avec son partenaire. Cependant, l'absence de plus de 20 % des signaux de RMN empêche la résolution de la structure de NarJ et la caractérisation des transitions structurales induites lors de la liaison avec le peptide. L'utilisation de la technique de marquage de spin couplée à la spectroscopie RPE a donc eu pour objectifs de déterminer le site d'interaction entre la protéine NarJ et son peptide partenaire ainsi que les changements conformationnels de NarJ associés à cette interaction. Pour cela, deux stratégies ont été mises en place. Dans un premier temps, un marquage de différents simples mutants a été réalisé pour étudier la mobilité de la sonde en absence et en présence du partenaire. La deuxième stratégie a été de marquer une protéine doublement mutée pour obtenir une protéine bi-marquée et pouvoir mesurer des distances entre deux sondes.

4.2.1 Choix des sites de marquage

Aucune donnée structurale sur NarJ d'*Escherichia coli* n'est disponible, mais un modèle a été construit par homologie de séquences de protéines dont les structures étaient connues, et qui appartiennent à la même famille de protéines impliquées dans la biogenèse de métalloprotéines. Cependant, par manque de similarité de la région C-terminale, ce modèle a été tronqué des 50 derniers acides aminés de ce domaine [178].

Dans cette partie C-terminale, NarJ possède une unique cystéine en position 207 qui est un bon candidat naturel pour le marquage afin d'étudier cette région dont les caractéristiques structurales sont totalement inconnues.

Dans une précédente étude [178], NarJ tronquée a été construite et purifiée et, il a été montré qu'elle conservait les mêmes caractéristiques concernant son interaction avec le peptide NarG(1-15). Dans cette même étude, une crevasse hydrophobe de NarJ a été suggérée comme étant le potentiel site d'interaction avec le peptide partenaire. En se basant sur cette donnée et en utilisant NarJT qui ne possède plus de cystéine naturelle (une seule mutation sera donc nécessaire), quatre positions ont été choisies pour être mutées en cystéines et par la suite marquées avec une sonde paramagnétique : la position 119 localisée à l'intérieur de la crevasse, la position 149 sur le côté opposé, les positions 21 et 104 de part et d'autre de la cavité. Les mono mutants cystéines (E119C, Q149C, H21C, Q104C) ont été construits, exprimés et purifiés puis marqués (Figure 41) afin d'étudier dans différentes conditions la mobilité du radical.

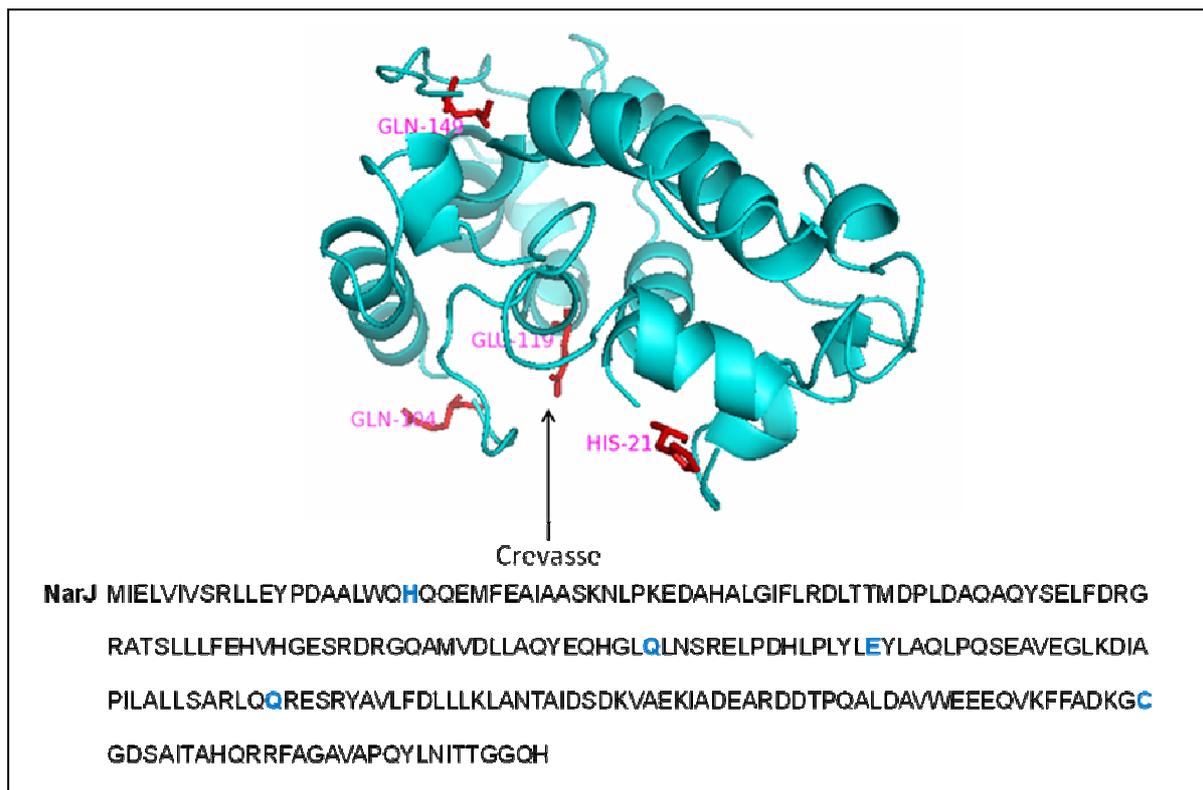


Figure 41 : Localisation des résidus ciblés pour l'introduction d'une cystéine par mutagenèse dirigée dans la protéine NarJT. Le résidu Glu119 est situé dans la crevasse, le résidu Gln149 à l'opposé de cette crevasse et les résidus Gln104 et His21 sont localisés de part et d'autre de la crevasse. La séquence primaire de NarJ est notée avec en bleu les résidus choisis pour la mutation et la cystéine naturelle du domaine C-terminal.

4.2.2 Contrôle des formes mutées et marquées de NarJ

A. Structure secondaire des protéines révélée par CD

La spectroscopie CD a été utilisée pour contrôler la structure globale des différentes protéines NarJ/NarJT mutées et marquées.

La protéine sauvage NarJ possède un spectre CD typique d'une protéine possédant une structure en hélices α avec deux minima caractéristiques trouvés à 222 et 208 nm (voir paragraphe 1.3.2). Après analyse des différents mutants, tous les spectres CD sont similaires à celui de NarJ, montrant une forme typique de protéines ayant une grande proportion d'éléments de structure secondaire de type hélice α . La même observation a été faite pour les protéines marquées (figure 42).

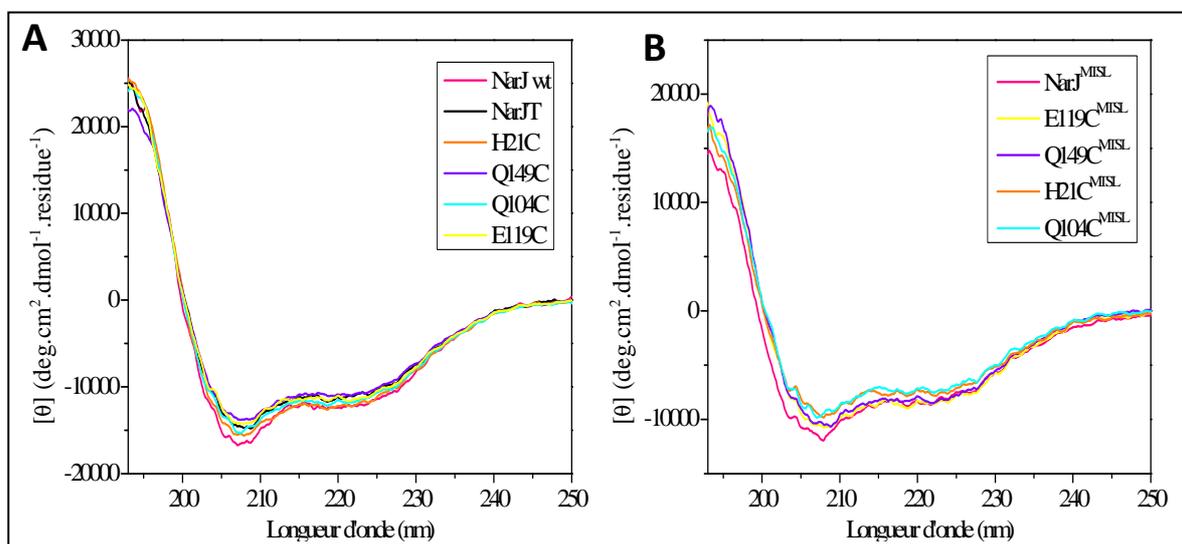


Figure 42 : Analyse par dichroïsme circulaire de la protéine NarJ, NarJT, des différents mutants avant (A) et après (B) marquage avec le MTSL.

Cette analyse de structure globale permet de contrôler que ni la mutation ni le marquage n'a donc d'effet sur le repliement majoritairement α -hélicale de la protéine.

B. Correcte fixation du peptide malgré la mutation et le marquage de NarJ

Afin de vérifier que ni l'effet de la mutation, ni la présence du marqueur n'a modifié la formation du complexe entre NarJ et son peptide partenaire, la spectroscopie de fluorescence (voir 3.4.6) a été utilisée pour mesurer les constantes de dissociation K_d du peptide avec NarJ, NarJT ainsi que tous les mutants de NarJT avant et après marquage (Tableau 3). Pour NarJ, la présence d'un tryptophane en position 194 dans le domaine C-

terminal empêche de détecter la fluorescence du deuxième tryptophane de NarJ, présent quant à lui près de la crevasse (W19), et de savoir si la fixation du peptide s'est faite correctement ou pas. La construction d'un mutant (mutation du tryptophane 194 en phénylalanine) a donc été nécessaire pour mesurer le K_d . Une valeur de 0,57 μM a été trouvée pour NarJ-W194F et de 0,49 μM pour NarJT. On remarque que l'absence des 50 derniers résidus n'a que peu d'influence sur la bonne fixation du peptide. En ce qui concerne les protéines mutées puis marquées, les valeurs de K_d déterminées sont du même ordre de grandeur à un facteur 2 près que celles obtenues pour NarJT. Ces résultats complètent ceux obtenus par CD et montrent que ni la mutation, ni le marquage n'a eu d'influence sur la capacité de la protéine à interagir avec le peptide NarG (1-15).

Tableau 3 : Valeurs des constantes de dissociation K_d des différentes protéines mutées et marquées de NarJ obtenues par spectroscopie de fluorescence.

Protéines	Q149C	Q149C [*]	E119C	E119C [*]	NarJ_W194F	NarJT
Kd (μM)	0,35	0,18	0,54	0,32	0,57	0,49
Protéines	H21C	H21C [*]	Q104C	Q104C [*]		
Kd (μM)	0,79	0,45	0,30	0,35		

4.2.3 Marquage de NarJ entier et analyse des formes spectrales

A. Le domaine C-terminal : une région désordonnée

Comme dit précédemment, la protéine NarJ entière est un bon candidat au marquage car elle possède une unique cystéine en position 207, dans la région C-terminale. Cette cystéine a donc été marquée au MTSL avec un rendement de 65 % selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes (paragraphe 3.5). La protéine NarJ marquée a été ensuite analysée par RPE à température ambiante (figure 43). Le spectre obtenu a les caractéristiques d'un radical nitroxyde ayant un régime de mobilité très rapide avec trois

raies fines séparées par un écartement de $2\bar{A} = 3,2$ mT entre les deux raies externes (voir paragraphe 2.1.4). La mesure du rapport $h(+1)/h(0)$ donne une valeur de 0,96 et celui de $h(-1)/h(0)$ de 0,61 ce qui est typique de spectres obtenus dans des régions désordonnées [45]. Le marqueur se trouve donc dans une région désordonnée.

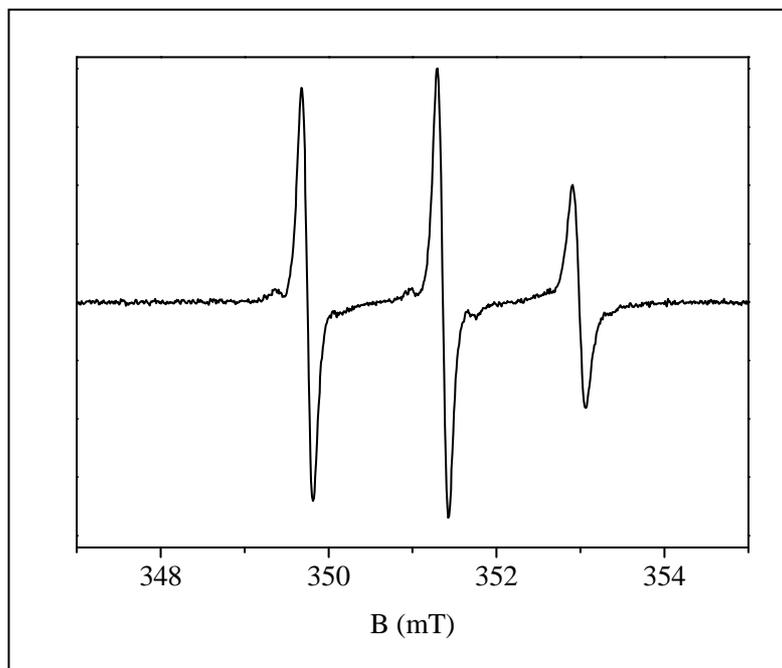


Figure 43 : Spectre RPE à température ambiante de la protéine NarJ marquée en position 207 dans la région C-terminale.

B. La présence du peptide n'induit pas de structuration de la partie C-terminale

Après avoir étudié la protéine NarJ seule, celle-ci a été mise en présence d'un excès de peptide NarG(1-15) (1 : 10) puis analysée par RPE (figure 44-A). Comme pour le spectre de la protéine seule en solution, celui obtenu pour le complexe NarJ/peptide est typique d'une sonde paramagnétique ayant une grande mobilité. Le rapport $h(-1)/h(0)$ étant plus grand pour le spectre de NarJ en présence de peptide (0,61 au lieu de 0,49 pour NarJ seule) (figure 44-B), ceci peut traduire une plus grande mobilité de la sonde dans le cas du complexe. On est en présence d'une région très flexible (désordonnée) et qui reste très flexible après association avec le peptide. La région C-terminale ne participe donc pas directement à l'interaction NarJ/peptide.

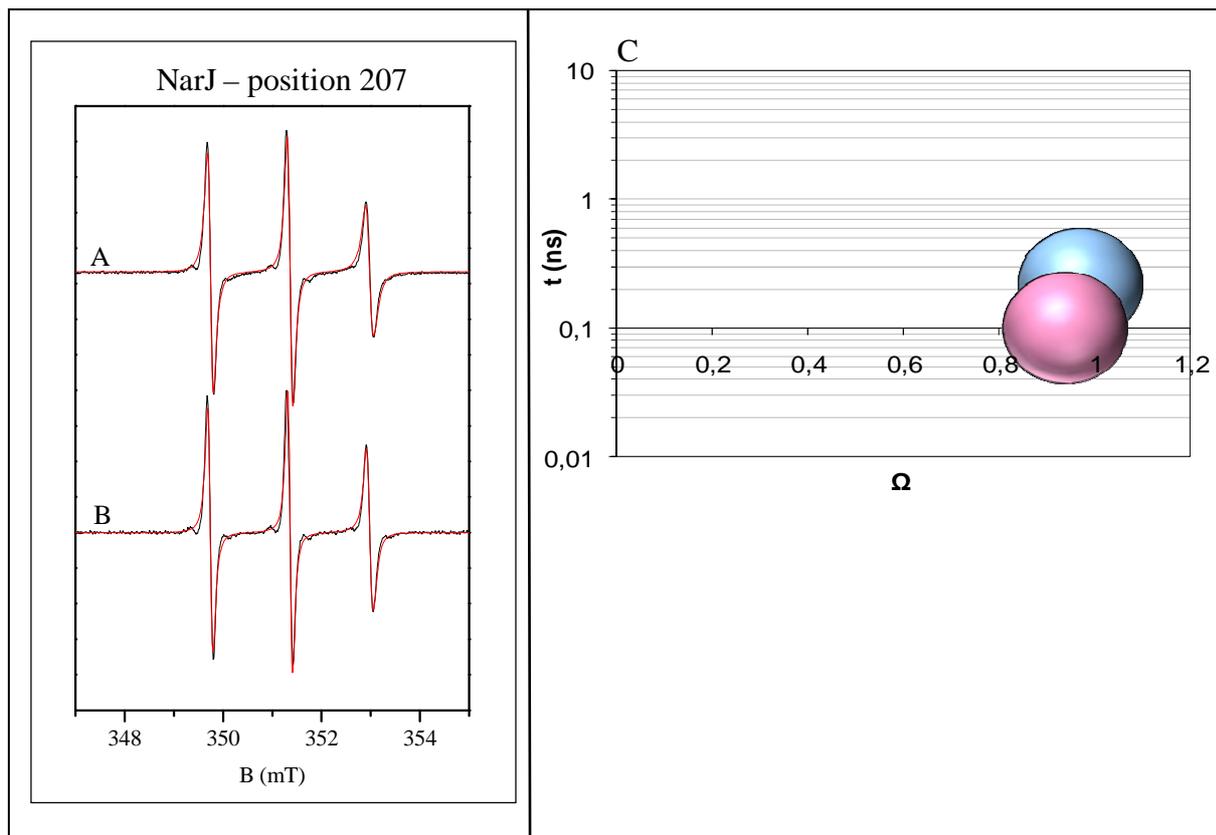


Figure 44 : Spectre RPE de la protéine NarJ marquée en position 207 en absence (A) et en présence (B) du peptide NarG(1-15). Les spectres noirs correspondent aux spectres expérimentaux, les rouges sont ceux simulés à l’aide du programme EPRSIM-C. (C) Représentation des paramètres de simulation τ et Ω pour la protéine NarJ seule en solution (sphère bleue) et pour la protéine NarJ en présence du peptide NarG(1-15) (sphère rose).

C. Analyse du désordre du domaine C-terminal par simulation

Pour aller au-delà de l’analyse des paramètres semi-quantitatifs, les spectres RPE ont été simulés (figure 44-A) à l’aide du programme EPRSIM-C en utilisant une seule composante spectrale (voir partie 3.9.2). Les deux principaux paramètres indiquant la dynamique et l’espace conformationnel de la sonde nitroxyde sont représentés par un graphique [τ - Ω] (figure 44-B). La grande valeur de Ω (espace conformationnel normalisé) et la faible valeur de τ (temps de corrélation de rotation effectif) indiquent que l’environnement local sondé par le marqueur est très large, suggérant que la partie C-terminale de NarJ est très flexible, au moins dans la région à proximité de la cystéine 207. La présence du peptide NarG(1-15) induit de faibles changements à la fois pour le paramètre Ω et pour le paramètre τ , indiquant que la sonde reste dans le même régime de mobilité très rapide et dans un espace

conformationnel très ouvert. Ces observations confirment les résultats obtenus par l'analyse simple des paramètres semi-quantitatifs et mènent à la conclusion que cette partie de NarJ est désordonnée et le reste après association avec le peptide. En conséquence, cette région n'est pas impliquée dans l'interaction avec le peptide partenaire.

4.2.4 Localisation du site d'interaction et mise en évidence du caractère flexible de la protéine

A. Différentes mobilités du radical nitroxyde selon le site de marquage de NarJT

Les différents mutants de NarJ tronqué ont été marqués, avec des taux de marquage de 85 % en moyenne, puis leurs spectres RPE ont été enregistrés (figure 45). Les positions 21, 104, 119 et 149 possèdent des spectres RPE avec une mobilité de la sonde restreinte par rapport à NarJ, la mobilité la plus restreinte correspondant à la position 119 typique d'un site plus enfoui dans la protéine [149], ce qui est en accord avec le modèle de la protéine NarJT.

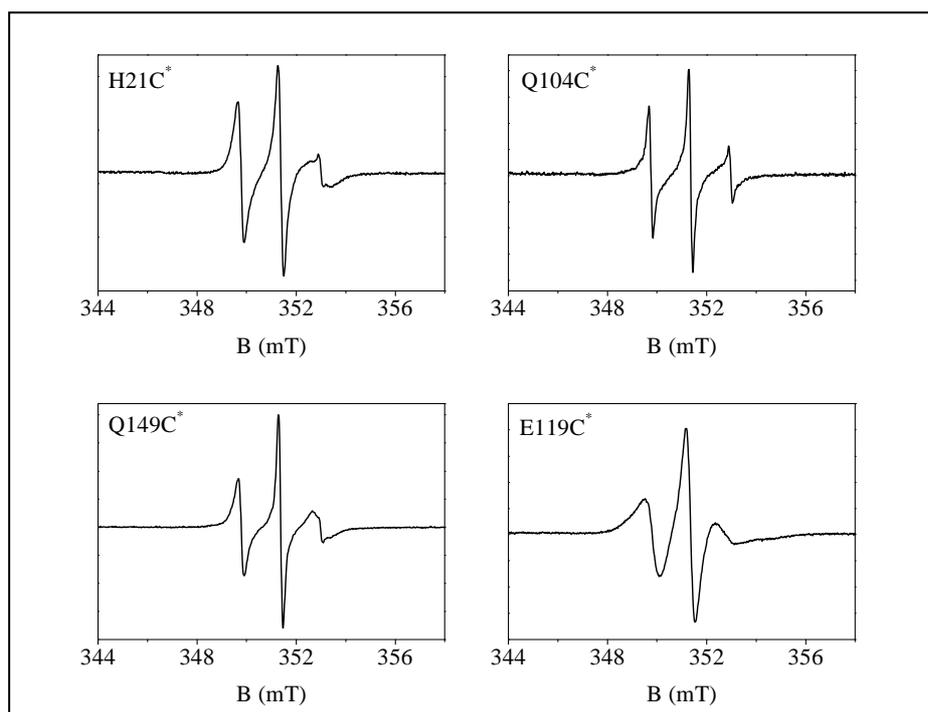


Figure 45 : Spectres RPE des protéines NarJT mutées marquées à température ambiante. Les spectres sont normalisés à l'amplitude de la raie centrale.

B. Effet du partenaire : localisation du site d'interaction

Les quatre mutants ont été étudiés en présence de leur peptide partenaire, toujours mis en excès (1 : 10). Les spectres obtenus nous ont permis d'obtenir différentes informations suivant la position du marqueur (figure 46).

Pour la position 119 située dans la cavité hydrophobe de NarJ, un changement drastique a été observé lors de l'addition du peptide NarG(1-15). Cette importante modification de la forme spectrale RPE est typique d'un marqueur se trouvant en contact tertiaire [149]. Elle révèle que cette région se trouve dans le site d'interaction.

Sur la face opposée à la crevasse, position 149, la superposition des spectres n'a révélé aucune variation significative, indiquant que les caractéristiques structurales autour de la sonde paramagnétique restent inchangées après liaison avec le peptide.

Pour les positions 21 et 104, localisées de part et d'autre de la crevasse, un faible mais significatif changement spectral a été observé, avec une diminution du rapport $h(+1)/h(0)$ de 0,68 à 0,53 pour la position 21, et une augmentation du rapport $h(-1)/h(0)$ de 0,28 à 0,32 pour la position 104. Ces résultats suggèrent que ces deux zones subissent de petits changements structuraux lors de l'interaction avec le peptide.

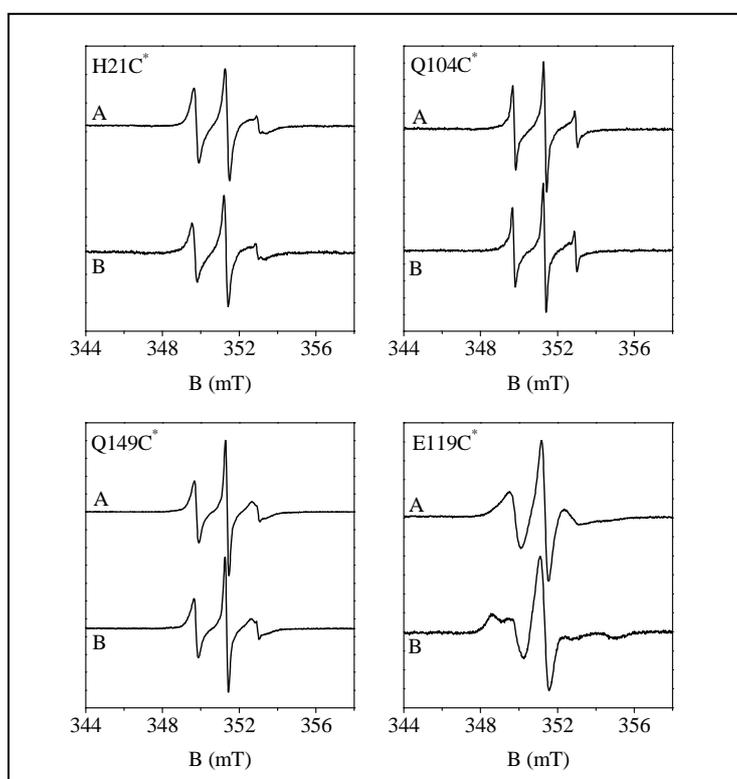


Figure 46 : Spectres expérimentaux des mutants H21C*, Q104C*, Q149C*, et E119C* seuls en solution (A) ou en présence du peptide partenaire (B). (*) = marqué au MTSL.

C. Simulation des spectres RPE

Les spectres RPE ont été simulés avec le programme EPRSIM-C. Pour tous les spectres des mutants, deux composantes ont été nécessaires pour obtenir des spectres simulés satisfaisants (figure 47). Le fait que les spectres RPE soient composites indique la présence soit de deux conformations différentes de la protéine tronquée, soit la présence de deux sous-ensembles de conformations des marqueurs [141].

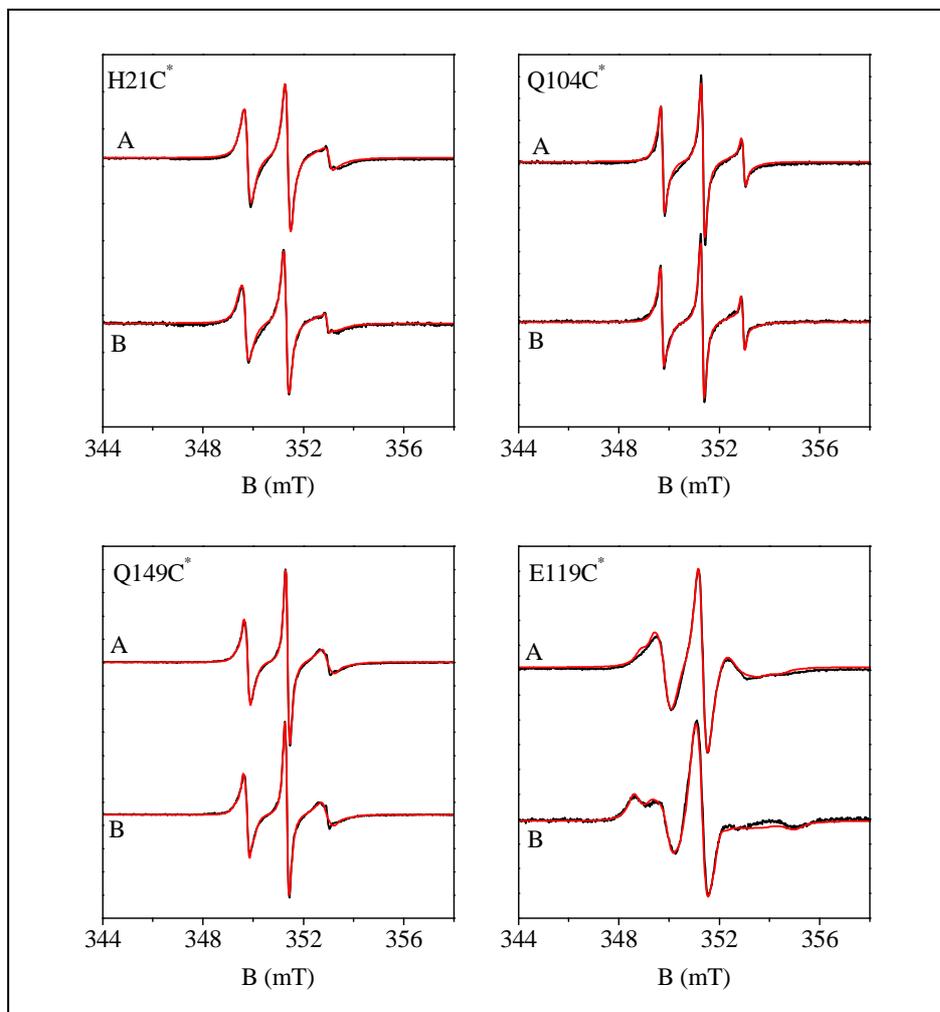


Figure 47 : Spectres RPE expérimentaux (noirs) et simulés (rouge) en absence (A) et en présence (B) du peptide partenaire.

Les paramètres τ (temps de corrélation de rotation effectif) et Ω (restriction de mobilité) obtenus après simulation ont été représentés sur des graphes $[\tau-\Omega]$ avec des sphères de taille illustrant les proportions respectives des deux composantes spectrales (figure 48).

Pour les deux composantes de la position 149 leur proportion et leur τ (≈ 1 ns) ne varient pas lors de la présence du peptide NarG(1-15). La simulation nous montre également

que les deux composantes n'ont pas le même espace conformationnel avec des Ω différents (0,65 et 0,85).

Les spectres RPE obtenus pour les positions 21 et 104 ont été simulés avec également deux composantes de poids non équivalent, qui restent inchangés après liaison avec le peptide partenaire. Pour la population majoritaire, un faible mais significatif changement des valeurs τ et Ω a été observé pour la position 21, indiquant un faible changement de l'environnement de la sonde après la fixation du peptide. Pour la position 104, l'interaction de la protéine avec le peptide induit une diminution plus prononcée de la mobilité et de l'espace conformationnel de la sonde, suggérant comme pour la position 21, une légère réorganisation structurale de cette région.

On a vu que le spectre du mutant E119C subissait une forte déformation spectrale lors de l'ajout du partenaire. Ces changements sont bien illustrés par le graphique représentant les paramètres τ et Ω . Les deux composantes de la forme spectrale RPE sont de poids équivalent en absence de partenaire. Mais elles évoluent en différentes proportions (80%-20%) avec des changements dans les paramètres dynamiques et géométriques (τ et Ω) lors de l'addition du peptide principalement, dû à une restriction de l'espace conformationnel (figure 48).

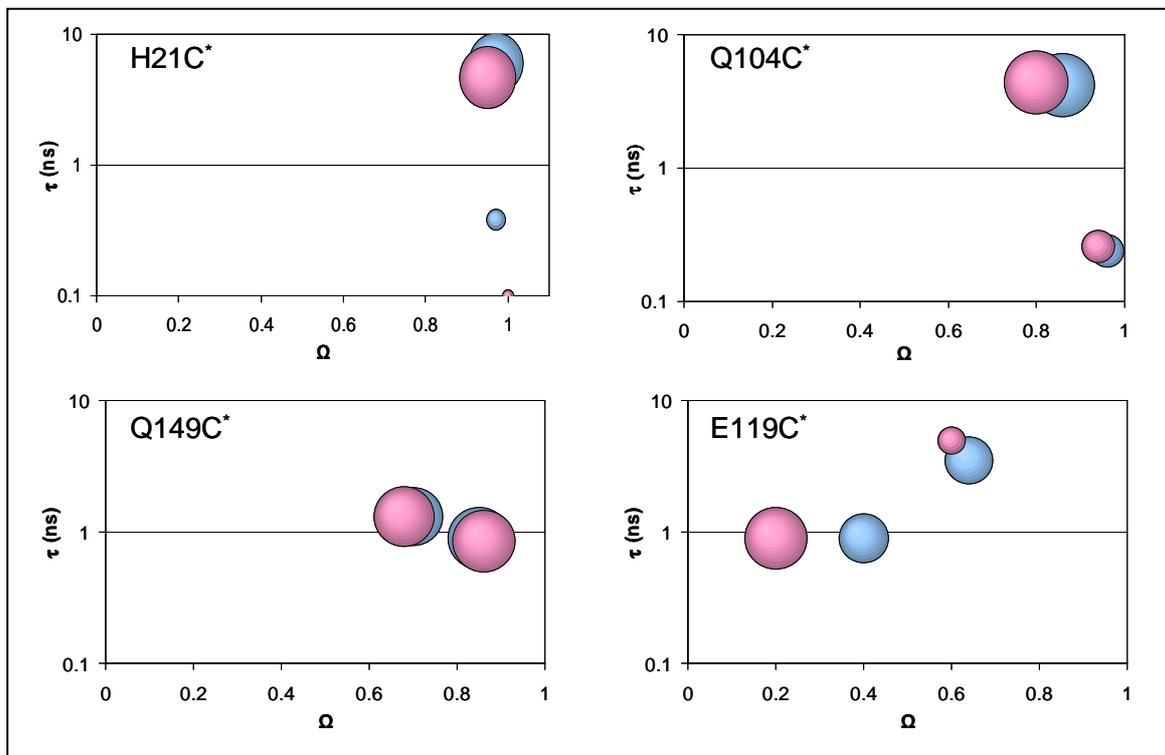


Figure 48 : Graphiques $[\tau-\Omega]$ des mutants marqués H21C*, Q104C*, Q149C* et E119C*. Les sphères bleues correspondent aux mutants seuls en solution et les sphères roses, aux mutants en présence de peptide. La taille des sphères indique la proportion de chaque composante.

4.3 Double mutant NarJ-H21C/Q104C : Influence du partenaire sur l'organisation structurale de la protéine à proximité de la cavité

Un double mutant cystéine (H21C/Q104C) a été construit et purifié afin de pouvoir incorporer deux sondes paramagnétiques (figure 49) dans le but de mesurer des distances inter-spin et les changements induits par la présence du peptide NarG(1-15).

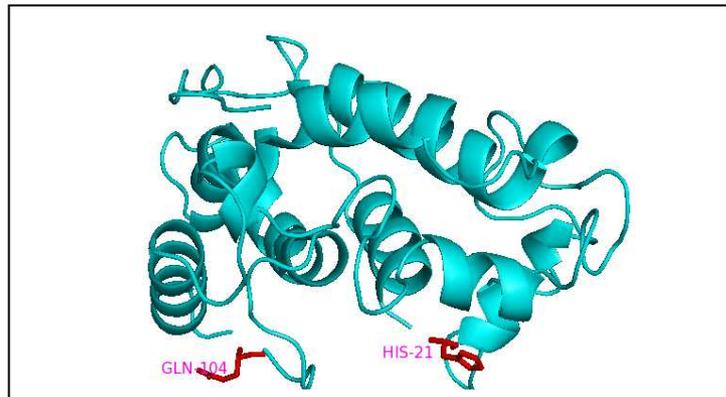


Figure 49 : Position des acides aminés ciblés pour le double mutant NarJ tronqué.

4.3.1 Contrôle par spectroscopie CD et fluorescence

Comme pour les simples mutants, la protéine NarJT doublement mutée et marquée a été analysée par dichroïsme circulaire et fluorescence (figure 50), afin de vérifier sa capacité à fixer le peptide ainsi que sa structure secondaire globale.

Les expériences de fluorescence montrent que l'on a une extinction du signal de fluorescence pour le mutant et le mutant marqué, provoqué par la présence du peptide qui masque le tryptophane responsable de cette émission de fluorescence et qui se trouve dans la crevasse. Cette extinction indique que le peptide est fixé à la protéine. De plus, les K_d obtenus pour la protéine H21C/Q104C et la protéine H21C*/Q104C* sont de 0,16 μ M pour les deux, valeur du même ordre de grandeur que celle obtenue pour NarJ sauvage ou NarJT.

Les spectres de CD obtenus sont similaires à ceux de la protéine NarJ tronquée. On conserve le profil typique d'une structure majoritaire en hélices α , que ce soit pour la protéine mutée ou celle mutée et marquée.

Ces deux contrôles nous ont permis de vérifier que la protéine avait conservé sa structure secondaire globale et son aptitude à interagir avec son partenaire malgré la mutation de deux résidus en cystéines et la présence d'une sonde paramagnétique sur chacune d'elles.

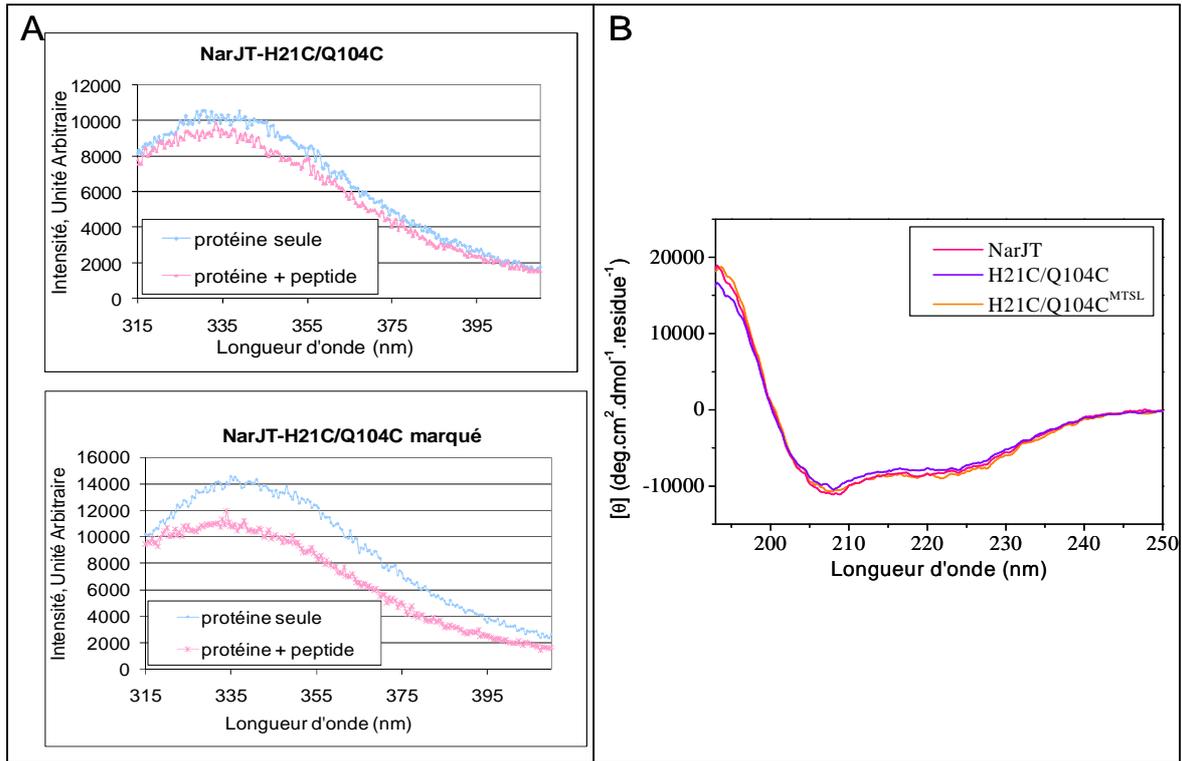


Figure 50 : Contrôle du double mutant H21C/Q104C marqué ou non par spectroscopie de fluorescence (A) ou dichroïsme circulaire (B).

4.3.2 Détermination de la proportion relative de marquage sur chaque site

Pour effectuer des mesures de distances inter-sondes, il est important d'avoir un taux de marquage important pour maximiser la proportion de protéines bi-marquées qui participent au signal DEER. Ainsi le protocole décrit en partie 3.5 a légèrement été modifié. Le changement se fait au niveau du rapport molaire protéine : MTSL. Celui-ci est augmenté, passant de 1 : 10 à 1 : 20 (protéine : MTSL) afin de favoriser le marquage des deux sites. Enfin, l'injection du MTSL n'est pas réalisée en une fois mais répartie sur quatre heures avec une injection toutes les heures pour apporter du MTSL « frais » à chaque injection. On a pu ainsi obtenir un taux de marquage de 150 % ± 20 % indiquant qu'une partie des protéines sont bi-marquées mais pas toutes.

Afin d'estimer la proportion marquée de chacun des deux sites, le spectre obtenu pour le mutant H21C*/Q104C* a été comparé à la somme des spectres des deux simples mutants H21C* et Q104C*, avec une normalisation des spectres basée sur l'intensité intégrée (figure 51-A). A partir d'une proportion de 50 % de H21C* + 50 % de Q104C* et jusqu'à une proportion de 100 % de H21C*, on obtient un spectre proche de celui obtenu

expérimentalement pour le double mutant marqué, alors que ce n'est pas le cas pour 100 % de Q104C* où l'on observe une nette différence spectrale avec le spectre de l'échantillon bi-marqué. Cette observation suggère que le site H21C a une plus grande facilité à être marqué par rapport au site Q104C. En faisant une analyse des deux cas extrêmes (répartition homogène 50 %-50 % et répartition hétérogène en faveur du site 21), on montre que la proportion d'espèces bimarquées se situent entre 50 % et 56,3 % (figure 51-B).

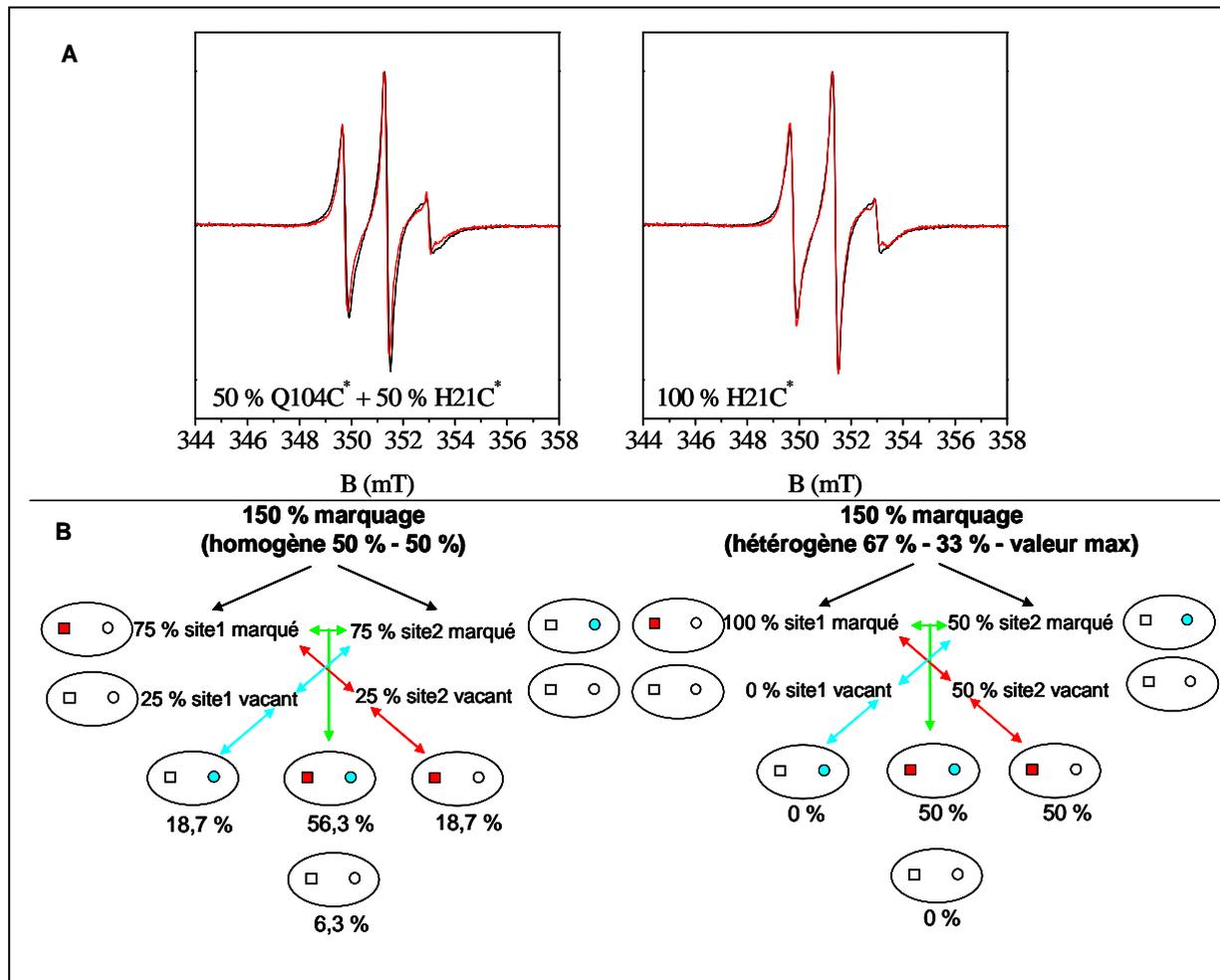


Figure 51 : (A) Comparaison de la somme des spectres des mutants monomarqués H21C* et Q104C* (rouge) par rapport au spectre du mutant bimarqué H21C*/Q104C* (noir). Les spectres ont été normalisés à l'intensité intégrée. (B) Analyse combinatoire correspondant à une répartition homogène entre le site 1 et le site 2 (gauche) et à une répartition hétérogène en faveur du site 1 (droite).

4.3.3 Analyse du mutant H21C^{*}/Q104C^{*} en présence du peptide partenaire en RPE à onde continue

La protéine doublement marquée est étudiée en présence de son partenaire, d'une part à température ambiante, d'autre part à basse température. Cette étude nous permet de détecter des interactions spin-spin à courtes distances (distance inférieure à 2 nm) et d'analyser l'influence du partenaire NarG(1-15) sur les spectres RPE.

A. Etude à température ambiante

Le mutant H21C/Q104C marqué a été mis en présence de son partenaire physiologique, le peptide NarG(1-15), avec un rapport molaire de 1 : 10 (protéine marquée : peptide). Le spectre du mélange a été enregistré et comparé au spectre de la protéine seule en solution (figure 52-A).

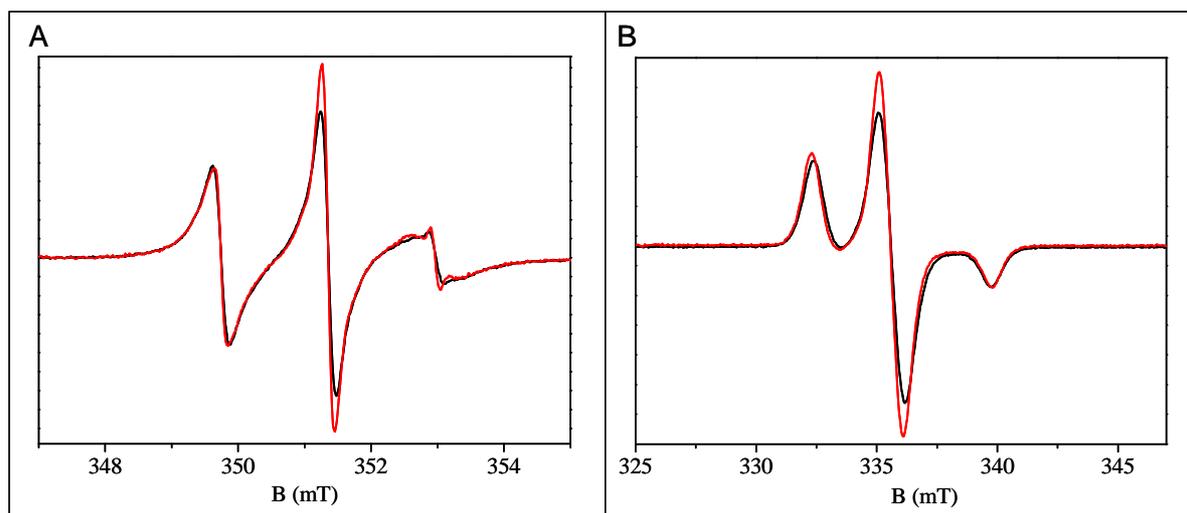


Figure 52 : Spectres RPE de la protéine H21C^{*}/Q104C^{*} sans peptide (noir) et en présence de partenaire (rouge) (1 : 10). (A) Enregistrement à température ambiante et (B) en conditions cryogéniques (100 K). Tous les spectres sont normalisés à l'intensité intégrée.

A température ambiante, on remarque que le spectre correspondant à la protéine seule est plus large que celui avec peptide ce qui est un signe de la présence d'interactions spin-spin dans le cas de la protéine seule. Pour confirmer cette hypothèse, ces mêmes échantillons ont été enregistrés à basse température (100 K) pour éliminer la mobilité du marqueur et faciliter l'observation d'interactions spin-spin.

B. Eloignement des marqueurs en présence de peptide vu par RPE à basse température

En onde continue, l'interaction dipolaire entre deux marqueurs se traduit par un élargissement des raies. Cet élargissement est détectable pour des distances inférieures à 2 nm. Les spectres RPE de la protéine NarJT bimarquée (21/104) ont donc été enregistrés en conditions cryogéniques (100 K) en absence et en présence du peptide NarG(1-15). Les spectres normalisés au même nombre de spins montrent clairement un rétrécissement du signal en présence du peptide (figure 52-B). Par ailleurs, on obtient une forme spectrale identique à celle d'une protéine monomarkuée. Cette observation mène à la conclusion que la formation du complexe induit une augmentation de la distance interspins atteignant une valeur supérieure à 2 nm car l'élargissement spectral dû aux interactions spin-spin disparaît.

Les processus de relaxation ont également été étudiés par saturation continue du signal RPE à 100 K pour les mutants monomarkués de NarJT (H21C* et Q104C*) et pour le mutant bimarqué de NarJ tronqué (H21C*/Q104C*) (voir le paragraphe 2.1.5). En absence de peptide, une puissance à mi-saturation $P_{1/2}$ de 2,4 et 2,6 mW a été trouvée pour les protéines monomarkuées H21C* et Q104C* respectivement, et de 5,4 mW pour NarJT bimarqué (figure 53-A). Cette valeur plus élevée de $P_{1/2}$ pour l'espèce bi-marquée indique une augmentation de vitesse des processus de relaxation, en accord avec des radicaux proches l'un de l'autre ayant un effet relaxant l'un sur l'autre. En présence du peptide NarG(1-15), les $P_{1/2}$ des deux protéines monomarkués restent inchangés tandis que pour NarJT bimarqué, le $P_{1/2}$ diminue à 2,9 mW (figure 53-B), une valeur proche des valeurs mesurées pour les espèces monomarkués. Les analyses du comportement en saturation des protéines montrent une diminution de l'effet relaxant entre radicaux en présence du peptide, confirmant une augmentation de la distance inter-spins. Une analyse plus détaillée n'est pas possible car on ne connaît pas la contribution à la relaxation de chaque forme monomarkuée ou bimarquée (proportion inconnue).

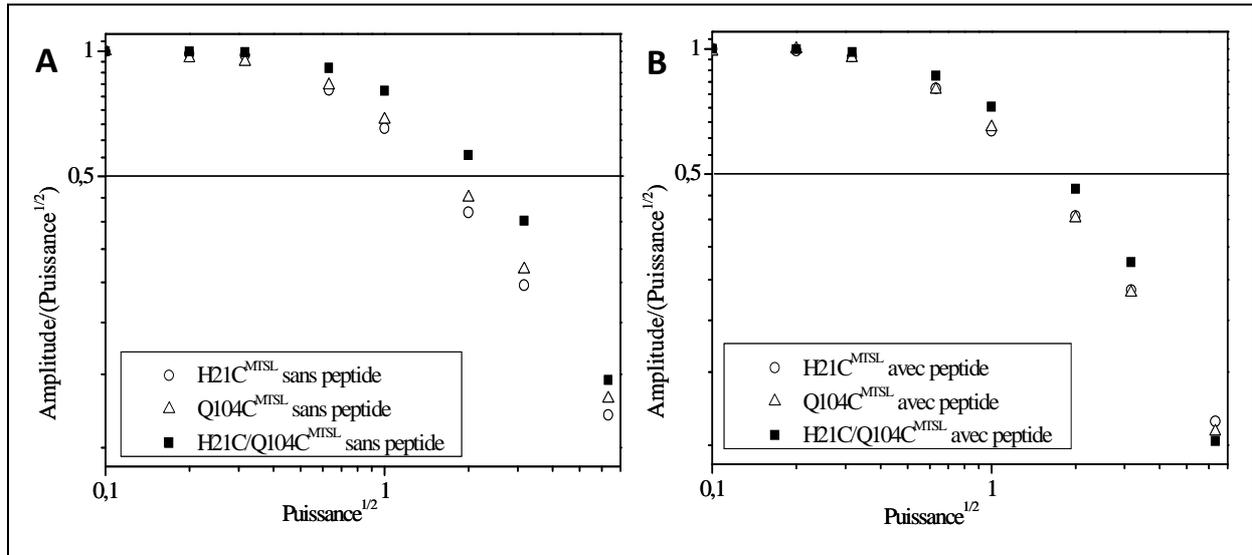


Figure 53 : Courbes de saturation obtenues pour les mutants simplement marqués H21C* et Q104C* ainsi que pour le mutant doublement marqué H21C*/Q104C* en absence (A) et en présence de peptide (B). Les expériences ont été faites à 100K sur des protéines de concentration égale à 95 μ M. L'abscisse des graphiques correspond à la racine carrée de la puissance d'enregistrement des spectres, et l'ordonnée, au rapport de l'amplitude pic à pic de la raie centrale sur la racine de la puissance normalisé à 1.

4.3.4 Mesure de distance : ouverture au niveau de la crevasse de NarJT lors de l'interaction

La RPE pulsée combinée à la technique DEER (Double Electron Electron Resonance) a été utilisée pour mesurer des distances inter-spins (cf partie 3.8.3). Ces mesures ont d'abord été initiées à Lille en collaboration avec Hervé Vezin (laboratoire LASIR, Lille) puis répétées à Marseille grâce à l'implantation d'un spectromètre pulsé et avec l'assistance technique de Guillaume Gerbaud. Ces mesures ont pour but de quantifier le changement conformationnel de NarJT lors de son interaction avec le peptide.

La figure 54 montre les résultats obtenus pour le mutant H21C/Q104C marqué sans et avec peptide. Après les différents traitements mathématiques décrits dans la partie 3.8.3, les profils de distances sont extraits des traces expérimentales et montrés par les figures 54-C1 et 54-C2 qui correspondent à la protéine sans partenaire et à la protéine avec son partenaire respectivement. On remarque une distribution large de distances avec trois maxima (1,9 – 2,6 – 3,1 nm) lorsque la protéine est seule en solution, tandis que lorsque le peptide est rajouté, cette distribution de distances converge vers une distance unique (2,6 nm) déjà présente dans la situation sans peptide. On a donc une distribution de distances

quand la protéine est sans son partenaire ce qui traduit probablement la présence de plusieurs conformations révélant la flexibilité de la protéine seule en solution. L'ajout du partenaire induit un « verrouillage » de NarJ en une seule conformation avec une distribution de distance centrée à 2,6 nm.

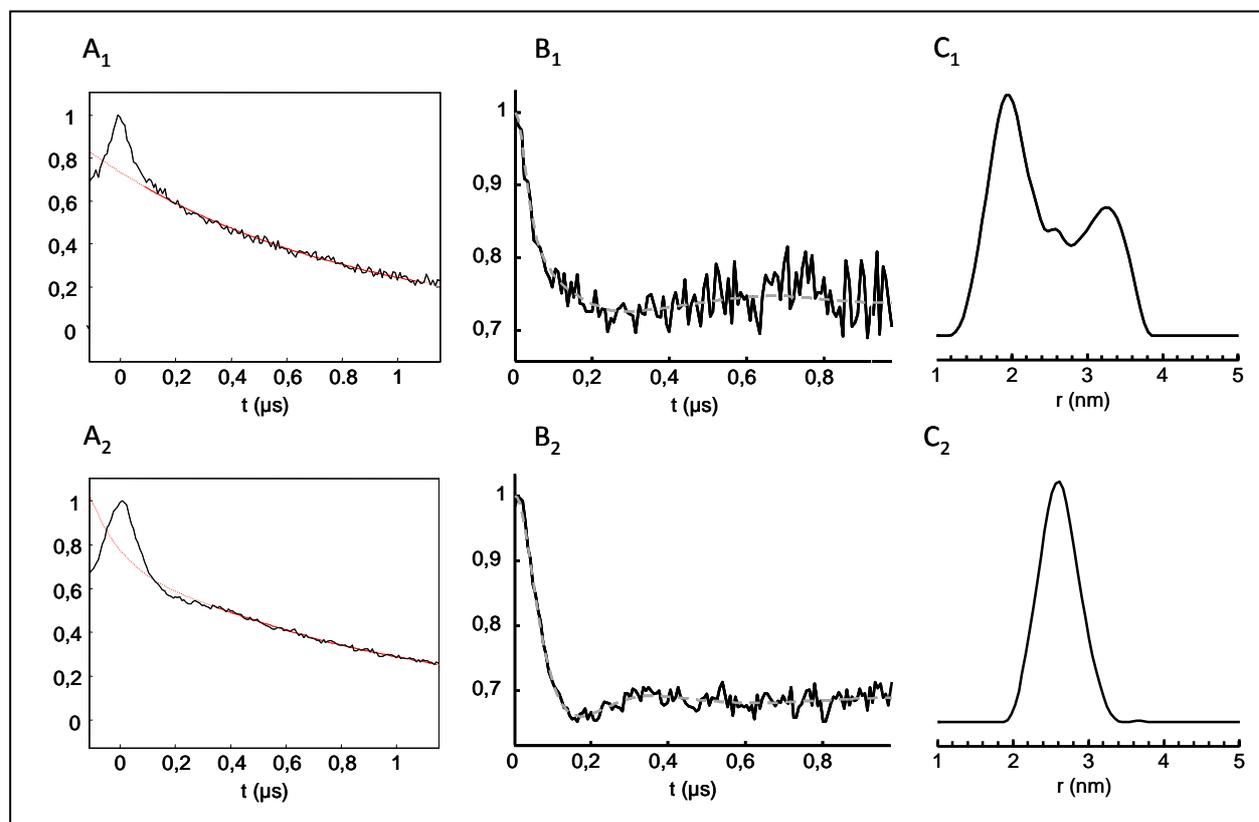


Figure 54 : Expériences de DEER. (A) Trace expérimentale dans le domaine temporel de l'expérience DEER (noire) et fonction utilisée pour la correction de la ligne de base (rouge). (B) Trace expérimentale après correction. (C) Profil de distances obtenu après une régularisation de Tikhonov (logiciel DEER Analysis [131]). Les indices 1 et 2 correspondent au mutant H21C^{*}/Q104C^{*} seul et avec peptide respectivement.

4.4 Marquage de différents peptides mutés

4.4.1 Pas d'effet de la mutation sur les peptides

Après avoir étudié l'interaction de la protéine NarJ avec le domaine N-terminal de NarG en marquant NarJ, nous nous sommes intéressés ensuite au partenaire. Des études de bioinformatique ont mis en évidence le caractère amphiphile du peptide et il a été proposé à partir des données structurales de la nitrate réductase A ancrée à la membrane que le peptide de NarG interagissait avec la bicouche lipidique par sa face apolaire [168]. Sachant

que la crevasse de NarJ, site d'interaction avec le peptide NarG(1-15) est hydrophobe, on peut supposer que la face de l'hélice au contact de NarJ soit la face apolaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, quatre peptides de 15 acides aminés ont été synthétisés (société Symprosis) avec l'introduction d'une cystéine en différents sites, deux résidus sur la face polaire (R7 et F8) et deux résidus sur la face apolaire (L5 et Y10), dans le but d'être marqué avec le MTSL (figure 55).



Figure 55 : Séquence du peptide de NarG et position des résidus mutés en cystéine.

Avant de réaliser la réaction de marquage, les quatre peptides ont été contrôlés par spectroscopie de fluorescence afin de vérifier s'ils interagissaient toujours avec NarJ. Les valeurs de K_d obtenues pour chaque peptide sont présentées dans le tableau 4 suivant.

Tableau 4 : Constantes de dissociation du complexe NarJT avec les différents peptides mutés déterminées par fluorescence. Utilisation de 2 μ M de protéine.

	Peptide	L5C	R7C	F8C	Y10C
K _d (μ M)	0,49	0,29	0,36	0,19	0,86

Les K_d trouvés pour chacun des peptides étant du même ordre de grandeur que pour le peptide sauvage, on peut en conclure que ces mutations n'ont pas affecté la capacité du peptide à se lier à la protéine NarJT.

4.4.2 Un protocole de marquage à améliorer

Les peptides étant aptes à interagir avec la protéine NarJT, nous avons procédé à leur marquage. Le protocole de marquage est identique à celui décrit dans la partie 3.5 en ce qui concerne les différentes étapes ainsi que les quantités de réactifs utilisés. Le seul

changement vient de la colonne de chromatographie d'exclusion stérique utilisée. En effet, du fait de la petite taille du peptide (1950 Da), la colonne PD10 ne pouvait pas convenir (taille limite d'exclusion à 5000 Da). Une nouvelle colonne a donc été choisie, une colonne PD MidiTrap G-10 qui fonctionne sur le même principe que la PD10 avec une taille d'exclusion limite plus petite (700 Da). Ce type de colonne a servi pour l'élimination du DTT en excès ainsi que pour le MTSL. Cependant, on a pu observer en RPE une contamination par du biradical des fractions d'élutions à partir de la fraction 4 (figure 56-A). La formation de biradical est due à la réaction de deux molécules de MTSL formant un biradical donnant un spectre caractéristique à 5 raies (figure 56). Une expérience contrôle a été réalisée avec du MTSL seul en solution incubé pendant la même durée que le protocole utilisé avec le peptide puis filtré sur la colonne (figure 56-B). Ce contrôle a montré la présence de biradicaux dès la 2^e fraction d'élution. La colonne PD MidiTrap G10 n'a pas la qualité requise pour séparer le radical libre du peptide marqué.

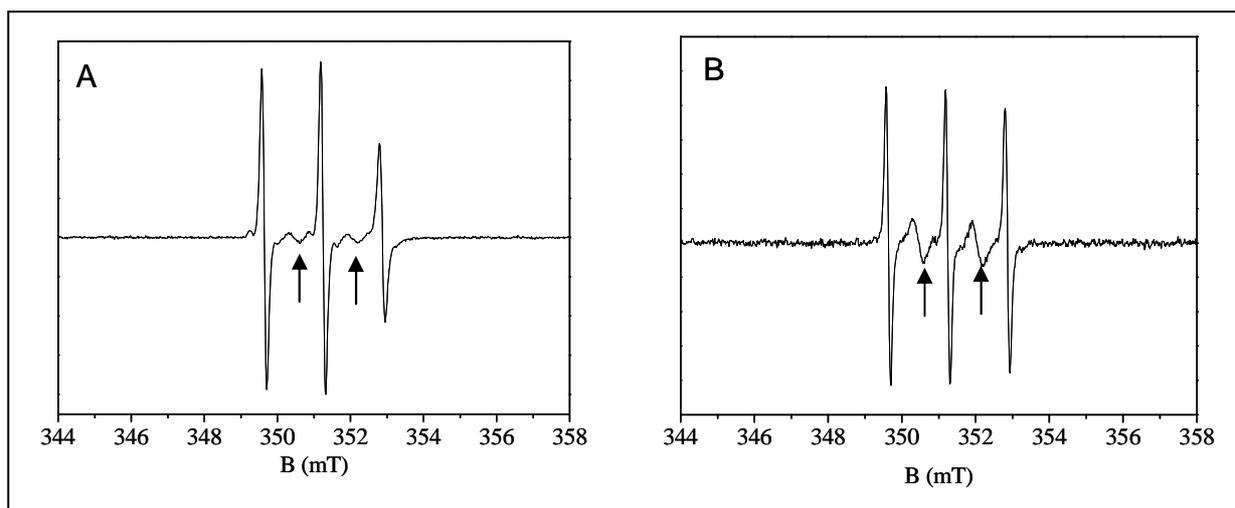


Figure 56 : Fraction 4 après élution sur colonne PD MidiTrap G-10. (A) Peptide L5C après marquage. (B) Contrôle avec du radical seul passé sur la colonne dans les mêmes conditions que pour les peptides. Les flèches indiquent la présence du biradical.

Nous avons néanmoins utilisé les trois premières fractions de 100 μ L dans lesquelles la contamination était négligeable. Comme ces fractions correspondent au début de la sortie de colonne, la concentration en peptide est peu élevée, et du fait de sa petite taille, aucun concentrateur n'est adapté. Les concentrations ont été évaluées par mesure de l'absorbance à 280 nm sauf pour le mutant Y10C qui ne possède plus la tyrosine. L'absorbance du MTSL seul a également été mesurée et donne une valeur de 0,04 qui a été systématiquement retranchée aux valeurs obtenus pour les peptides.

Chaque échantillon a ensuite été analysé par spectroscopie RPE (figure 57) et la concentration en spin a pu être estimée comme décrit dans le paragraphe 3.7. On a pu ensuite en déduire les pourcentages de marquage pour chaque peptide (tableau 5) avec d'importantes incertitudes de mesures estimées à 40 % liées à l'incertitude sur la mesure de la concentration en peptide.

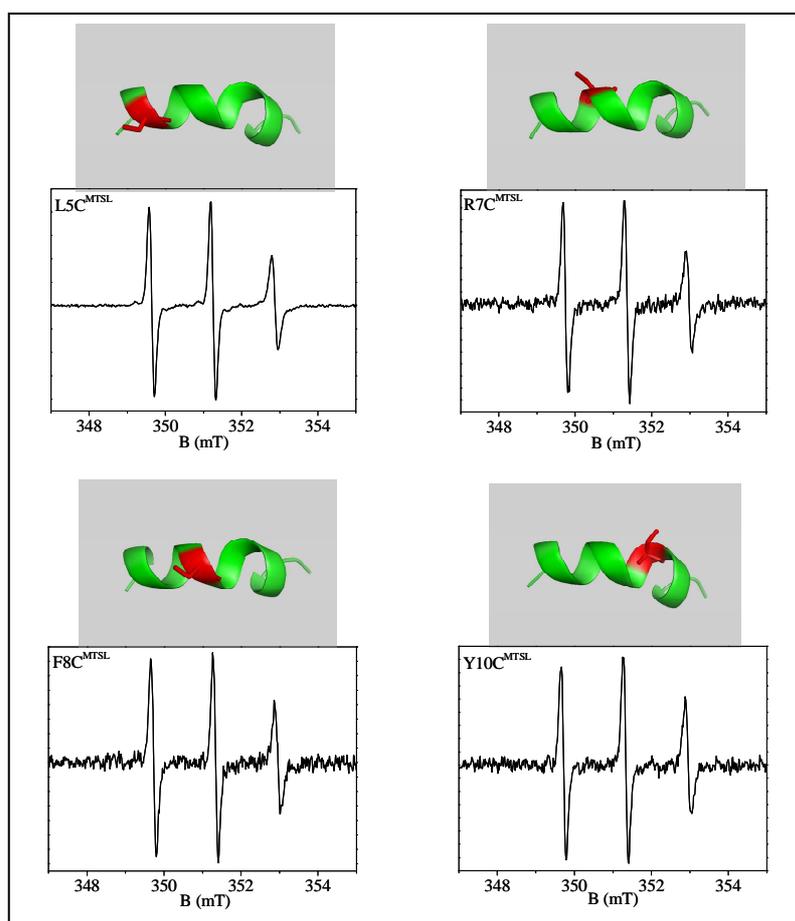


Figure 57 : Spectres RPE à température ambiante des peptides L5C, R7C, F8C et Y10C marqués au MTSL. Au dessus de chaque spectre se trouve la représentation de la structure du peptide, avec en rouge la mutation en cystéine.

Tableau 5 : Evaluation des pourcentages de marquage des différents peptides à l'aide de la concentration en peptide et de la concentration en spin. * : valeurs estimées par rapport aux valeurs des trois autres peptides.

Peptides marqués	L5C	R7C	F8C	Y10C
C _{peptide} (μM)	14	45	8	(22)*
C _{spin} (μM)	18	2,2	4,5	2
% de marquage	125	5	56	(8)*

Du fait des difficultés rencontrées lors de l'étape de séparation entre le MTSL libre et le peptide marqué, on a obtenu des taux de marquage très différents dû à l'incertitude de la détermination de la concentration en peptide, ainsi que l'éventuelle présence de biradical ou de radical libre. Malgré cela, les quatre peptides ont été étudiés en présence de la protéine NarJ entière mais avec le résidu 194 muté (pour pouvoir faire une étude en fluorescence) ainsi qu'avec NarJ tronqué.

4.4.3 Modifications spectrales pour un peptide

Chaque peptide marqué a été mis en solution avec soit NarJ-W194F (protéine entière avec une mutation en 194) soit NarJT dans un rapport molaire 1 : 1 dans un premier temps. Ce rapport molaire a ensuite été augmenté pour vérifier que l'on avait le maximum de forme complexée. Ici, c'est la protéine qui est mise en excès pour ne pas avoir de peptide marqué non complexé et éviter d'avoir le spectre du peptide seul. Les mélanges ont ensuite été analysés par spectroscopie RPE à température ambiante. On a pu observer que les spectres obtenus pour un rapport molaire 1 : 1 et 1 : 2 étaient parfaitement identiques indiquant que l'on avait le maximum de complexe pour un mélange équimolaire. La figure 58 montre les spectres RPE des différents peptides avec les deux protéines dans un rapport 1 : 1.

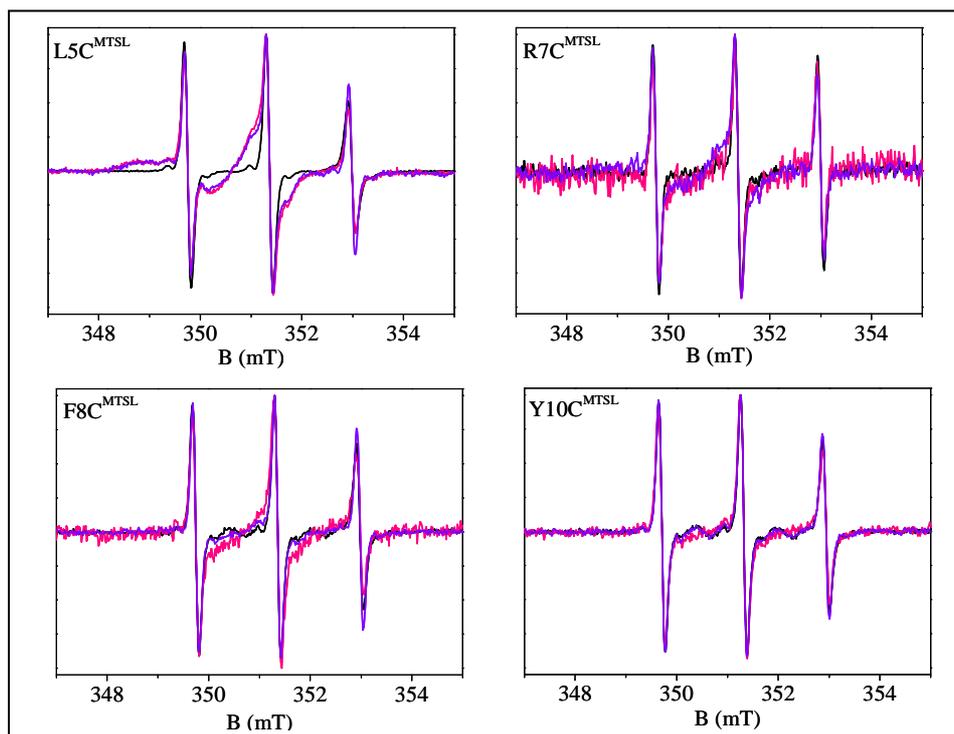


Figure 58 : Spectres RPE des peptides $L5C^{MTSL}$, $R7C^{MTSL}$, $F8C^{MTSL}$ et $Y10C^{MTSL}$ à température ambiante seuls (noir) ou soit en présence de NarJ-W194F (rose) soit de NarJT (violet). Les spectres ont été normalisés à l'amplitude de la raie centrale.

On remarque que seul le peptide L5C montre un fort changement spectral correspondant à l'apparition d'une forme large qui traduit un changement d'environnement du radical. Cette forme large correspond à la forme du peptide liée à NarJ. On est dans un régime de mobilité intermédiaire avec une forme typique d'un radical se trouvant en interaction tertiaire [149]. Cela suggère que cette position soit dirigée du côté de la crevasse de NarJ, zone de l'interaction. En ce qui concerne les trois autres peptides, la forme liée est difficilement détectable, plus visible avec NarJ-W194F que NarJT, mais en proportion faible. Actuellement, il est difficile d'aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats du fait du faible rapport signal sur bruit des spectres.

Ces expériences préliminaires laissent envisager que cela serait bien la face apolaire du peptide NarG(1-15) qui serait un interaction avec la crevasse hydrophobe de NarJ car le résidu L5 est situé sur cette face.

4.5 Discussion

La nitrate réductase A est une molybdoenzyme respiratoire de la bactérie *Escherichia coli*. C'est un édifice membranaire complexe composé de trois sous unités (NarGHI) contenant huit centres métalliques de natures diverses [168, 179-180]. En 1992, plusieurs études de génétique et de biochimie montrent que la présence de la protéine NarJ est indispensable à l'activité de ce complexe enzymatique [170, 181]. En effet, la protéine NarJ joue un rôle essentiel dans l'activité nitrate réductase en permettant un assemblage correct du complexe, sans pour autant faire partie de la structure définitive de ce dernier. A partir de ces propriétés, il a été proposé pour la première fois que NarJ joue un rôle de protéine chaperon spécifique [167]. En 2006, de nouvelles approches génétiques et biochimiques indiquent que la protéine NarJ est plurifonctionnelle car elle assure deux fonctions distinctes en interagissant en deux sites distincts de la sous unité NarG, lors de la mise en place du complexe nitrate réductase [173]. Les deux fonctions de NarJ se font dans l'ordre suivant :

- NarJ permet le maintien de l'enzyme dans un état soluble jusqu'à complète maturation de celle-ci. Pour cela, la protéine interagit avec un peptide N-terminal de NarG. Sans cette interaction, le complexe peut s'ancrer à la membrane alors qu'il n'est pas mature et ne peut plus incorporer de centres métalliques.
- D'un autre côté, NarJ interagit avec la partie globulaire de NarG et permet l'insertion du centre [Fe-S] et du Moco [1].

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au premier site d'interaction entre la protéine NarJ et un peptide N-terminal de NarG, et plus particulièrement à la flexibilité de NarJ lors de cette interaction. Deux domaines sont distingués, un domaine globulaire composé d'hélices α et une ou plusieurs zones mobiles [178]. La capacité de la protéine NarJ à interagir sur deux sites distincts de l'apoenzyme pour y exercer deux fonctions différentes laisse supposer que cette flexibilité participe à ce caractère multifonctionnel. Par opposition, dans le cas de la nitrate réductase périplasmique (Nap), ces deux fonctions sont assurées par deux protéines distinctes, le chaperon NapD qui interagit avec la sous unité NapA et assure la coordination entre la maturation et l'adressage [182] et la protéine NapF qui permet l'insertion du centre [Fe-S] dans NapA [183].

Lors d'études antérieures réalisées au sein de l'équipe d'Axel Magalon, la cristallisation de la protéine NarJ de *E. coli* a été tentée à de maintes reprises en modifiant

les conditions expérimentales mais sans succès. Un modèle structural a été construit pour la protéine NarJ à partir d'homologies de séquences avec des protéines appartenant à la même famille et dont la structure était connue [178]. Le modèle obtenu est dépourvu du domaine C-terminal (résidus 186-236) car il est absent des autres protéines. Ce modèle correspond donc à la région 1-186 de la protéine NarJ et il est composé principalement d'hélices α . Des expériences de RMN ont confirmé ce point et ont aussi mis en évidence la présence d'une ou plusieurs zones flexibles. Ces expériences ont aussi montré une modification globale du spectre de NarJ lorsque le peptide est présent traduisant un changement structural subit par NarJ. Afin de progresser dans la compréhension de ce changement structural survenant lors de l'association entre NarJ et son peptide partenaire, j'ai utilisé la RPE couplée à la technique de marquage de spin.

Dans un premier temps, j'ai étudié la protéine entière car elle possède une cystéine dans son domaine C-terminal. Ensuite, quatre résidus ont été choisis sur la protéine tronquée comme sites de marquage, permettant ainsi de sonder des sites différents de la protéine.

Tout d'abord, la protéine NarJ a été marquée puis étudiée en RPE. Le signal du marqueur greffé sur le résidu 207 a pu être attribué à un régime de grande mobilité qui est typique d'un marqueur greffé sur une région non structurée [75]. Cette observation implique que le résidu C207 se trouve sur une zone désordonnée et mobile de la protéine. Lors de l'ajout du peptide, aucun changement spectral notable ne s'est produit indiquant que le domaine C-terminal n'intervient pas dans l'interaction avec le peptide. Ainsi, ce domaine C-terminal représente un élément dynamique de la protéine NarJ. Malgré ce désordre structural, ce domaine est essentiel à la fonction de la protéine NarJ au cours du processus de biogenèse du complexe nitrate réductase (thèse Vergnes A. 2006). On peut supposer que le domaine C-terminal participe à l'interaction avec l'autre site ou à l'interaction avec les systèmes d'insertion du FSO ou du Moco.

Après contrôle des protéines suite à leur mutation et vérification de leurs caractéristiques biochimiques, le MTSL a été greffé sur les quatre mutants NarJT. L'étude des protéines marquées seules en solution a montré que l'on avait un spectre typique d'une sonde avec une mobilité intermédiaire (mutants Q149C*, Q104C* et, H21C*) tandis que pour le mutant E119C*, le spectre observé est de mobilité plus restreinte que les précédents, ce résidu se situant à l'intérieur de la crevasse de NarJ, le marqueur est contraint et donc peu mobile. Lors de l'ajout du partenaire, le spectre RPE de NarJ-E119C* subit une forte déformation spectrale. Les simulations ont permis de mettre en évidence un spectre composite et de montrer l'augmentation d'une des deux composantes du spectre en présence du peptide, qui correspond à une mobilité lente et un espace conformationnel très

restreint. Les trois autres mutants subissent peu ou pas de changements lors de l'interaction de la protéine NarJ avec le peptide. Les expériences d'arrimage moléculaire et d'ITC avaient suggéré la crevasse hydrophobe de NarJ comme site d'interaction. Nos résultats montrent pour la première fois de façon expérimentale, que le site d'interaction se situe au niveau de la crevasse de NarJ.

De faibles modifications spectrales ayant été observées pour les mutants H21C* et Q104C*, ces deux positions subissent une faible réorganisation structurale après fixation du peptide. Du fait de leur localisation de part et d'autre de la crevasse, l'hypothèse d'un mouvement de fermeture ou d'ouverture a été suggéré. Pour le vérifier, un double mutant H21C/Q104C a été construit, purifié et marqué après avoir fait différents contrôles au préalable, comme pour les simples mutants. Puis, j'ai réalisé une analyse RPE à basse température en onde continue. Le spectre obtenu pour NarJ-H21C*/Q104C* avec peptide montre un rétrécissement spectral par rapport à la protéine marquée seule en solution. Ceci montre un éloignement des marqueurs lors de l'interaction de la protéine avec son partenaire. Ce résultat a été renforcé par l'étude en saturation continue réalisée sur les deux échantillons qui a montré par la diminution de la puissance à mi-saturation lors de l'ajout du peptide. Pour quantifier ce phénomène d'éloignement des marqueurs, la spectroscopie RPE impulsionnelle a été utilisée. Une expérience de DEER, permettant de faire des mesures de distances inter-sondes, a été réalisée sur le double mutant marqué H21C/Q104C seul et sur celui en interaction avec le peptide. Une large distribution de distance comportant plusieurs maxima a été trouvée pour la protéine seule en solution, indiquant une flexibilité structurale et une distribution de conformations de NarJ en absence de peptide. Un pic majoritaire à 1,9 nm dont la largeur s'étend vers des plus courtes distances a été identifié. Ceci est en accord avec l'observation d'un élargissement par interaction dipolaire observé en onde continue dans cette même situation. On a donc la présence d'une certaine distribution avec des marqueurs à courte distance. Lors de la présence du partenaire, cette distribution de distances converge vers une distance unique centrée à 2,6 nm qui préexistait dans le cas de NarJ seule, montrant un verrouillage de la protéine sur une conformation. Ce résultat est en accord avec le spectre enregistré en onde continue, spectre non élargi par une interaction dipolaire (car la distance est supérieure à 2 nm).

Deux schémas peuvent être envisagés pour rendre compte du mode de reconnaissance du peptide NarG par NarJ. D'une part, un mode repose sur le changement conformationnel de NarJ par la fixation du peptide : ajustement induit (ou induced fit). Pour cette hypothèse, un complexe initial de faible affinité se forme. Un changement conformationnel s'opère ensuite conduisant à renforcer l'interaction. D'autre part, un second schéma repose sur l'idée que plusieurs états conformationnels de NarJ préexistent.

Le peptide NarG se lie à la conformation la plus favorable à l'interaction : sélection conformationnelle (ou conformational selection) (figure 50) [184].

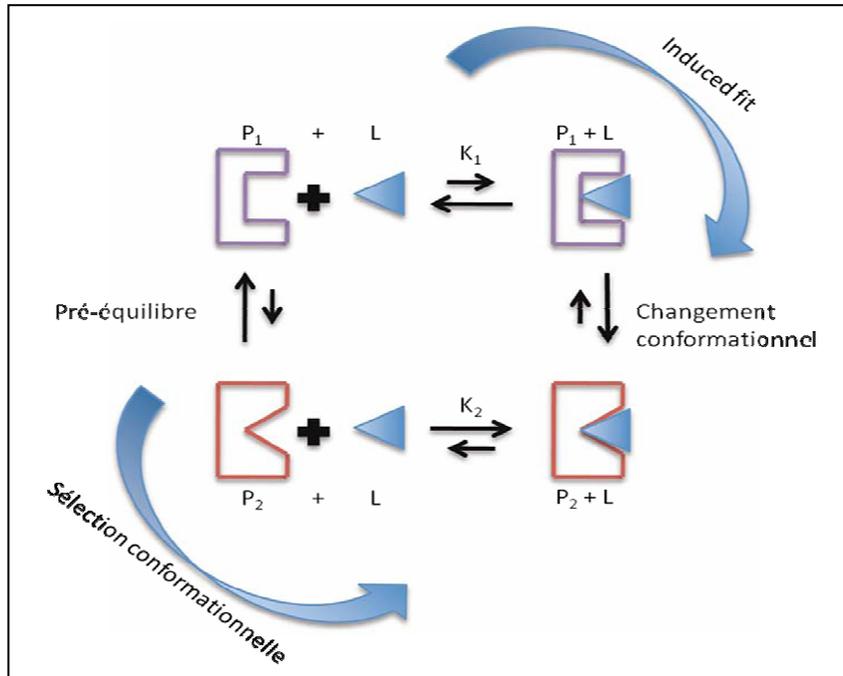


Figure 59 : Cycle thermodynamique pour les processus de reconnaissance moléculaire impliquant l'« induced fit » et la sélection conformationnelle. Pour la sélection conformationnelle, la conformation requise pour l'interaction (P_2) est pré-existante en solution avant l'addition du ligand (L). Pour l'« induced fit », l'interaction se fait avant le changement conformationnel de la protéine (P_1 en P_2). K_1 et K_2 représentent les constantes cinétiques d'après [184].

A partir des résultats obtenus, on peut proposer qu'un des modes de reconnaissance du peptide NarG par NarJ s'effectue par sélection conformationnelle. En effet, on observe la préexistence de la distance intersondes 2,6 nm dans le cas de NarJ sans peptide, distance que l'on retrouve lors de l'interaction entre NarJ et NarG(1-15). Cependant, une situation plus complexe peut exister. Suite à la formation du complexe obtenu après une première étape de sélection conformationnelle, l'optimisation de l'interaction pourrait s'effectuer par un mécanisme d'« induced fit ». De récents résultats obtenus par des analyses de mobilité ionique par spectrométrie de masse semblent être en faveur d'un tel scénario.

Au cours de notre étude, nous avons montré que le site de fixation du peptide était localisé au niveau d'une crevasse hydrophobe de NarJ. Il a été montré que le peptide est

structuré en solution, replié en hélices α et possède un caractère amphiphile. Du fait du caractère hydrophobe de l'interaction, la face apolaire du peptide serait donc en contact direct avec NarJ. J'ai donc utilisé la technique de marquage de spin pour déterminer l'orientation du peptide dans la crevasse. Une expérience préliminaire de marquage sur des peptides synthétiques a été réalisée. Un changement spectral a été observé uniquement pour la mutant L5C*. On observe un spectre typique d'une sonde en interaction tertiaire avec un régime de mobilité intermédiaire [149] indiquant que le marqueur pointe vers le partenaire. Ces premiers résultats semblent en accord avec une interaction de la face apolaire sur NarJ mais doivent encore être améliorés. En effet, des problèmes lors de la préparation des échantillons marqués doivent être résolus comme par exemple l'élimination de l'excès de MTSL après la réaction de marquage.

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse ont permis de mieux comprendre les changements structuraux qui ont lieu au sein de la protéine NarJ lors de son interaction avec le peptide de NarG(1-15). Le site de fixation du peptide a pu être clairement identifié au niveau de la crevasse hydrophobe de la protéine et les mesures de distances ont pu mettre en évidence la flexibilité de NarJ en absence de peptide qui adopte une conformation plus rigide lors de l'ajout du partenaire (distance inter-sondes unique). Le nombre croissant d'études biochimiques et structurales sur des métalloenzymes possédant plusieurs centres métalliques va certainement mener à la découverte de nouveaux chaperons multifonctionnels qui pourront enrichir les données structurales déjà existantes sur ces protéines.

Chapitre 5 : Le complexe CP12/GAPDH chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

5.1 Le complexe CP12/GAPDH/PRK dans le cycle de Calvin

Les microalgues et les cyanobactéries sont des organismes qui utilisent la lumière comme source d'énergie pour fixer le dioxyde de carbone (CO₂). Ces microorganismes (rassemblés par la suite sous l'appellation abusive « microalgues ») dont la taille varie du micron à la centaine de microns se trouvent en abondance dans les milieux aquatiques (océans, rivières, lacs, etc.). On estime entre 200 000 et plusieurs millions le nombre d'espèces d'algues existantes. Une telle diversité non exploitée constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. Actuellement, les microalgues suscitent un vif engouement et sont au cœur de plusieurs problématiques.

Dans un contexte énergétique marqué par la nécessité de développer des énergies renouvelables, l'utilisation des microalgues pour la production de biocarburants apparaît comme un secteur d'avenir. Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques unicellulaires dotées d'une croissance rapide et ont la particularité de produire des métabolites industriellement intéressants (polysaccharides, pigments, lipides). Elles constituent un matériel photosynthétique de choix pour capturer du CO₂ et fabriquer de la biomasse. Leur grande diversité biologique et leur adaptabilité, un rendement supérieur à celui des plantes supérieures pour la production de biocarburants sont autant d'atouts pour la fabrication de biocarburants à partir de leurs constituants polysaccharidiques (bioéthanol, biogaz) ou lipidiques (biofuels). Les applications environnementales (dépollution des effluents liquides chargés en nitrates, phosphates, métaux lourds), la production de protéines pour l'agroalimentaire notamment dans l'aquaculture, la pharmaco-cosmétologie sont d'autres exemples de valorisation de ces organismes.

Afin d'avoir une meilleure compréhension des voies métaboliques présentes, et plus particulièrement celle de l'assimilation du CO₂ chez les organismes photosynthétiques, l'équipe du docteur B. Gontero du laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines recherche et étudie des complexes supra-moléculaires chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Une collaboration est née entre nos deux équipes afin de caractériser l'interaction entre deux protéines, la CP12 et la GAPDH, d'un complexe supra-moléculaire : PRK/GAPDH/CP12.

5.1.1 Le cycle de Calvin-Benson-Bassham

La photosynthèse qui permet la production de dioxygène et de glucose à partir de dioxyde de carbone et d'eau ainsi que l'énergie lumineuse, se déroule en deux phases : la phase photochimique et la phase chimique.

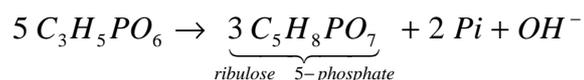
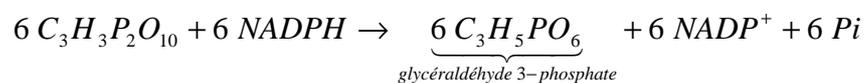
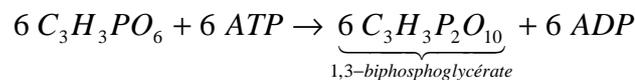
Cette phase chimique a été élucidée par Calvin et ses collaborateurs dans les années 1950 [185]. Elle est constituée d'une série de réactions qui forme le cycle de Calvin-Benson-Bassham, et permet l'assimilation du CO₂. Elle utilise aussi l'ATP et le NADPH produit lors de la phase photochimique afin de produire du glucose (figure 60).

Le cycle de Calvin se déroule en trois étapes [185-186] :

- La phase de carboxylation (fixation du CO₂). Elle est réalisée grâce à la ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCo). Cette enzyme est la plus abondante sur terre et elle est présente chez tous les organismes photosynthétiques.



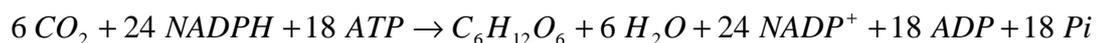
- La phase de réduction. C'est la réduction du 3-phosphoglycérate (PGA) qui permet la formation de six molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) à partir trois molécules de ribulose 1,5-biphosphate (RuBP), de trois molécules de CO₂, de neuf molécules d'ATP et de six molécules de NADPH. Une molécule de GAP peut sortir du cycle afin d'être utilisée pour la synthèse de glucides, d'acides gras ou d'acides aminés. Les réactions chimiques qui ont lieu sont :



- La régénération de l'accepteur de CO₂, le RuBP, à partir de molécules de GAP.



Treize réactions chimiques interviennent dans le cycle de Calvin impliquant l'intervention de onze enzymes et dont la réaction globale est :



Certaines de ces enzymes sont considérées comme des enzymes clefs car elles sont régulées lors des transitions obscurité/lumière et permettent donc l'arrêt ou le fonctionnement du cycle. Deux de ces enzymes sont particulièrement importantes car elles utilisent l'ATP, pour l'une, et le NADPH, pour l'autre, qui sont produits lors de la première phase de la photosynthèse. Il s'agit de la phosphoribulokinase (PRK) et de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), respectivement [186].

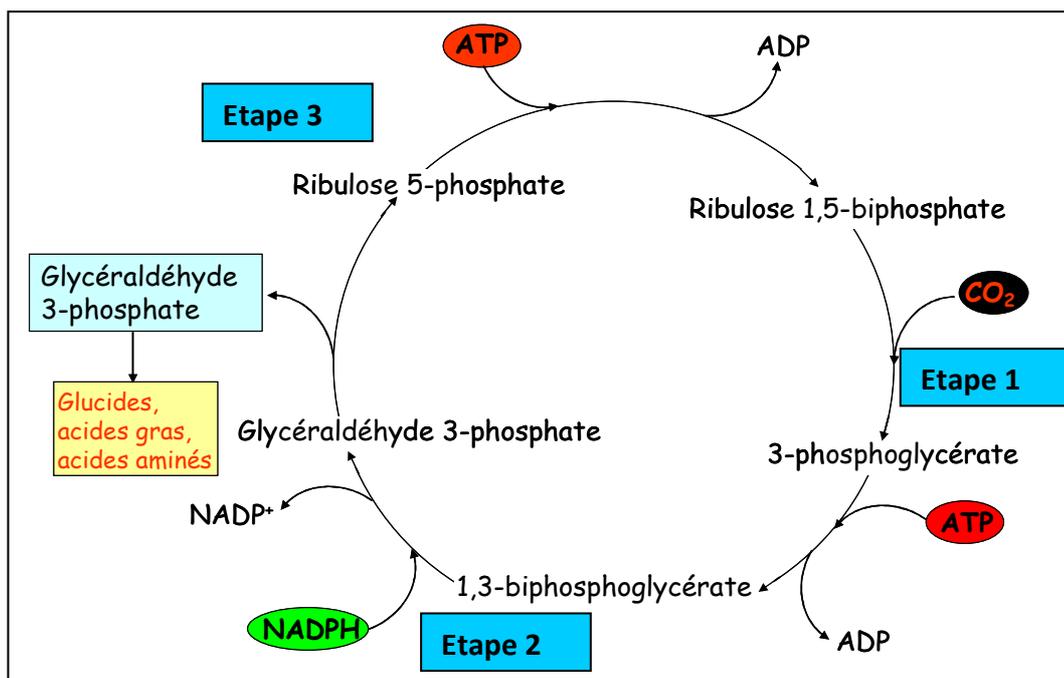


Figure 60 : Cycle de Calvin-Benson-Bassham. Les trois étapes clés sont représentées ; étape 1 : phase de carboxylation, étape 2 : phase de réduction, étape 3 : phase de régénération.

5.1.2 Le complexe PRK/CP12/GAPDH

En 1997, Avilan *et al* [187] ont isolé un nouveau complexe supramoléculaire de 450 kDa chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce complexe intervient dans le cycle de Calvin-Benson pour l'assimilation du CO_2 , et est constitué de deux homodimères de phosphoribulokinase (PRK), de deux homotétramères de glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de deux monomères de CP12, une protéine intrinsèquement désordonnée qui régule la GAPDH et la PRK.

La présence de ce complexe dépend des conditions obscurité/lumière. Chez l'épinard [188], deux complexes ont été mis en évidence à l'obscurité, l'un constitué uniquement de GAPDH, l'autre composé de GAPDH, de CP12 et de PRK. Les enzymes au sein de ces différents complexes sont inactives. A la lumière, le complexe PRK/CP12/GAPDH est dissocié et les enzymes libérées sont actives. Un complexe similaire, présent à l'obscurité, a été étudié chez le pois [189] montrant sa capacité à se dissocier et à s'associer lors des transitions obscurité/lumière, grâce à la thiorédoxine f. La présence de ce complexe ainsi que la régulation des enzymes présentes dans cet édifice ont été montrées chez d'autres espèces photosynthétiques comme *Arabidopsis thaliana* [190], l'algue rouge *Galdieria sulphuraria* [191] ou l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* [187].

5.1.3 La CP12 au sein du complexe PRK/CP12/GAPDH

La présence de la CP12 au sein de ce complexe a soulevé de nombreuses questions quant à son rôle dans l'assemblage du complexe PRK/GAPDH/CP12. A l'aide d'expériences de reconstitution *in vitro* et de mesures de constantes de dissociation par résonance plasmonique de surface (BIAcore), il a été montré chez *C. reinhardtii* que la formation du complexe supramoléculaire passe tout d'abord par la formation du complexe GAPDH/CP12 avec une constante de dissociation de 0,440 nM [192]. Cette association entraîne un changement de conformation de la GAPDH nécessaire à la fixation d'un homodimère de PRK [2, 193]. Cette unité se dimérise pour former le complexe final (figure 61). La CP12 joue donc le rôle de protéine de liaison entre la PRK et la GAPDH [192].

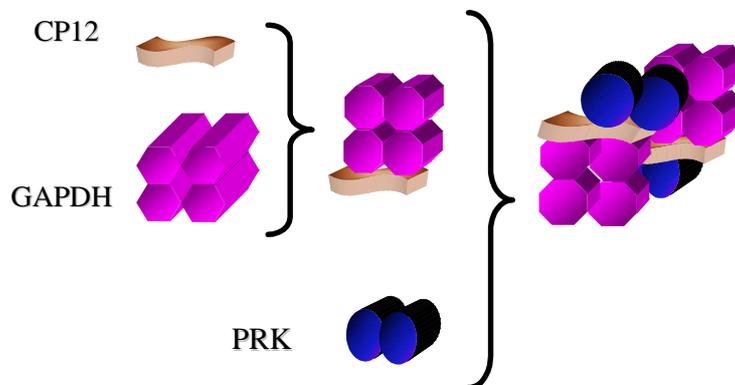


Figure 61 : Modèle décrivant l'association entre la CP12, la GAPDH et la PRK de *C. reinhardtii* d'après [2].

5.1.4 La CP12 : une protéine partiellement désordonnée

La CP12, pour « chloroplast protein », est une protéine de 8,5 kDa [194]. Sa caractérisation structurale par modélisation a montré la présence de domaines désordonnés possédant des caractéristiques typiques des protéines intrinsèquement désordonnées (PID) [195-197] qui sont souvent impliquées dans les interactions protéine-protéine.

La CP12 possède quatre résidus cystéines formant deux ponts disulfure (S-S) dans son état oxydé. Ces ponts sont formés par les cystéines 23 et 31 (C23-C31, pont N-terminal), et par les cystéines 66 et 75 (C66-C75, pont C-terminal) (figure 62).

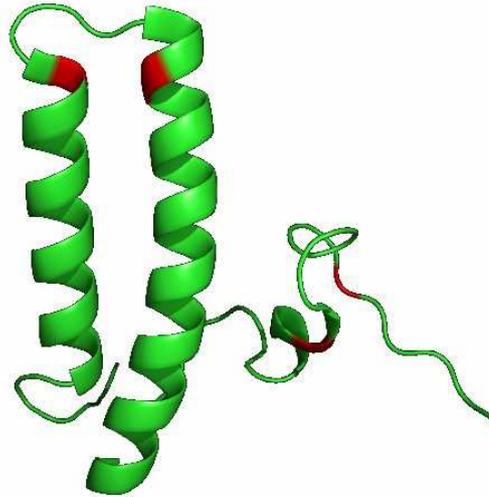


Figure 62 : Modèle structural de la CP12 de *C. reinhardtii* obtenu par modélisation moléculaire [198]. Les quatre cystéines sont représentées en rouge.

Des expériences de dichroïsme circulaire (CD) ont permis de montrer que, sous forme réduite, la CP12 ne possède aucune structure secondaire [2]. Son spectre est caractéristique d'une protéine non structurée. Sous forme oxydée, le spectre présente deux minima à 222 et 208 nm caractéristiques de la présence d'hélices α (figure 68). Il n'a pas été possible de déterminer la structure de la CP12, qu'elle soit sous forme réduite ou oxydée, malgré les tentatives d'expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) réalisées [2]. Ces résultats indiquent que, lorsqu'elle est sous forme oxydée et possède des hélices α , la CP12 reste mobile et flexible. Seule une modélisation moléculaire a permis de prédire une structure de la forme oxydée (figure 62) [198]. Deux hélices seraient présentes : la première, N-terminale, du résidu aspartate en position 7 à l'alanine en position 22, et la deuxième, centrale, de la sérine 28 à l'alanine 54. Ces deux hélices sont maintenues par le premier pont disulfure. Toute l'extrémité C-terminale (Asp55-Asp80), qui suit l'hélice centrale, ne possède pas de structure secondaire et est désordonnée. La seule contrainte présente dans cette région est due au pont disulfure C-terminal qui induit une boucle.

5.1.5 La GAPDH

La GAPDH chloroplastique catalyse la déphosphorylation et la réduction du 1,3-biphosphoglycérate (BPGA) en glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) et phosphate inorganique en utilisant le NADH ou le NADPH comme cofacteur (figure 63) [199].

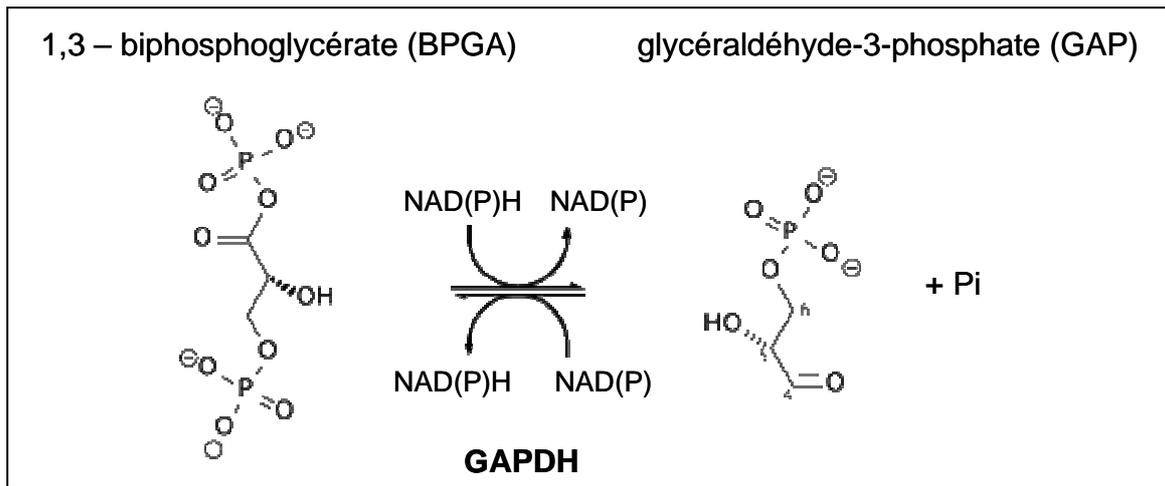


Figure 63 : Déphosphorylation et réduction du 1,3-bisphosphoglycérate en glycéraldéhyde-3-phosphate inorganique par la GAPDH.

La GAPDH chloroplastique existe sous plusieurs formes. Chez les végétaux supérieurs, elle est présente sous forme d'un hétérotétramère (A₂B₂), composé de deux sous-unités GapA et de deux sous-unités GapB, ou sous forme d'homotétramère (A₄), composé de quatre sous-unités GapA, ainsi que sous une forme hexadécamérique A₈B₈.

Chez l'algue verte *C. reinhardtii*, elle se présente sous la forme A₄ de masse moléculaire de 150 kDa. La séquence en acides aminés montre que chaque monomère contient quatre résidus cystéines. Deux de ces quatre résidus sont situés dans le site actif de l'enzyme (en position 156 et 160) tandis que, d'après la modélisation (figure 64), les deux autres sont localisés à la surface (en position 21 et 291). La modélisation a également montrée la présence d'une crevasse chargée positivement et appelée S-loop formée entre deux monomères.

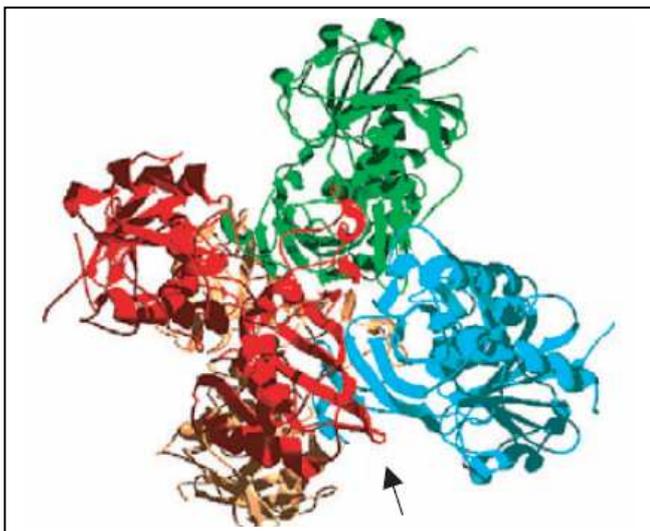


Figure 64 : Modélisation de la GAPDH de *C. reinhardtii* [200]. Les quatre monomères sont représentés en rouge, bleu, vert et orange. La crevasse formée entre deux monomères est située par une flèche.

La GAPDH A_2B_2 peut être régulée de façon rédox lors des transitions obscurité/lumière par l'intermédiaire de deux résidus cystéines en position 349 et 358 situées au niveau de l'extrémité C-terminale des sous-unités de type B [201]. En effet, à l'obscurité, ces résidus cystéines sont sous forme de pont disulfure conduisant le dernier résidu (E362) à interagir au niveau de la crevasse de la GAPDH empêchant l'entrée du NADPH. Lors du passage à la lumière, le pont disulfure est rompu induisant un changement conformationnel de l'extrémité C-terminale de l'enzyme (figure 65-A). Le NADPH peut alors entrer et l'enzyme est à nouveau active.

La GAPDH homotétramérique A_4 ne possède pas l'extrémité C-terminale régulatrice. Néanmoins, cette GAPDH est régulée lors des transitions obscurité/lumière. La régulation est possible grâce à la formation d'un complexe avec la CP12. L'extrémité C-terminale de cette protéine est homologue à l'extrémité régulatrice de la GapB. Ce serait donc la CP12 qui apporterait les résidus cystéines régulateurs à la GAPDH A_4 [194, 202]. De la même manière que le résidu E362 empêche l'accès au site actif pour la GAPDH A_2B_2 , le résidu D80 de la CP12 jouerait le même rôle pour la GAPDH A_4 [203] (figure 65-B).

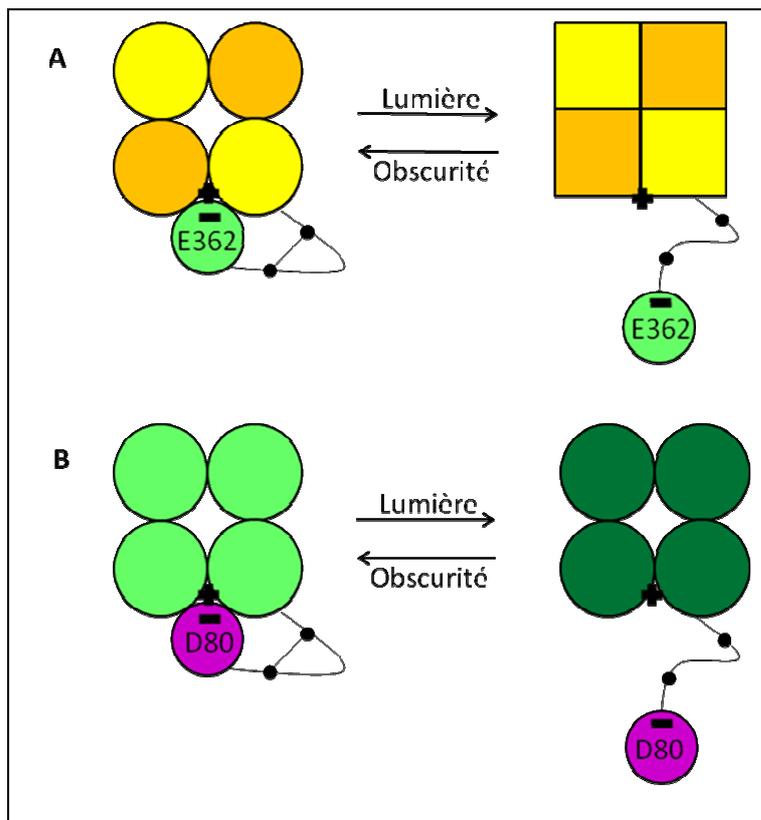


Figure 65 : Régulation de deux GAPDH chloroplastiques. (A) Schéma pour la GAPDH A_2B_2 avec un changement conformationnel lors de la transition obscurité/lumière d'après [204]. Les deux couleurs représentent les deux sous-unités A et B. (B) Schéma pour la GAPDH A_4 qui change également de conformation lors de sa régulation d'après [203].

5.1.6 Site d'interaction entre la CP12 et la GAPDH de *C. reinhardtii*

Comme il a été dit précédemment, la CP12 présente une forte affinité pour la GAPDH avec laquelle elle interagit pour former le complexe CP12/GAPDH. Plusieurs études ont été réalisées pour localiser la région de cette interaction.

Ainsi, il a été montré lors de travaux antérieurs de l'équipe de B. Gontero que la reconstitution du sous-complexe CP12/GAPDH était fortement perturbée lors de la mutation du résidu arginine en position 197 de la GAPDH en résidu glutamate (R197E) [200]. Ce résidu R197 est situé dans une région chargée positivement appelée S-loop. Or, le glutamate porte une charge négative et l'interaction n'a plus lieu. Ce résultat indique que les résidus chargés positivement de la GAPDH situés dans cette zone interagissent vraisemblablement avec des résidus chargés négativement de la CP12. D'après ce résultat, deux acides aminés de la région centrale de la CP12 ont été mutés, le résidu aspartate en position 36 (D36) et le glutamate en position 39 (E39), tous deux de charge négative. Ils ont été mutés en résidu alanine (A) et en lysine (K), de charge positive [205]. Des tests de reconstitution ont été réalisés montrant la formation du complexe avec la GAPDH pour les mutants E39A, E39K et D36A. A l'inverse, aucun complexe n'est formé entre le mutant D36K et la GAPDH [205]. Il a été déduit de l'ensemble de ces résultats que la région centrale de la CP12, chargée négativement, interagit avec les résidus de charge positive de la GAPDH grâce à des interactions de type électrostatique (Figure 66) [200, 206-207].

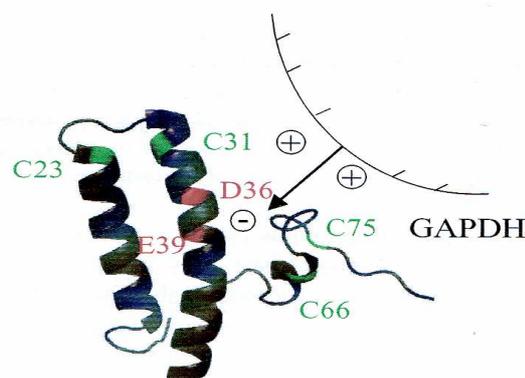


Figure 66 : Modèle structural de la CP12 [198] et site d'interaction avec la GAPDH. Les résidus cystéines et les résidus chargés négativement mutés sont colorés en vert et en rouge, respectivement. Les résidus chargés positivement situés dans la S-loop de la GAPDH [200] et les résidus chargés négativement sur la CP12 sont représentés par des cercles, et interagissent à l'aide d'interactions électrostatiques [205].

De plus, l'étude de mutants de la CP12 dont les résidus cystéines ont été remplacés par des résidus sérine a permis de montrer que les résidus cystéines en positions 66 et 75 (partie C-terminale de la CP12) sont indispensables à la formation du complexe GAPDH/CP12. Par ailleurs, il a récemment été montré que la CP12 est capable d'interagir avec la GAPDH, qu'elle soit sous forme oxydée ou réduite [208].

Les mécanismes impliqués dans cette interaction, ainsi que les changements structuraux s'opérant au sein de ces deux partenaires ne sont actuellement pas compris. J'ai donc utilisé la technique de marquage de spin couplé à la résonance paramagnétique électronique (RPE) dans le but de caractériser le complexe GAPDH/CP12, car c'est une technique particulièrement bien adaptée pour l'analyse d'interactions entre deux partenaires, ainsi que pour le repliement des protéines [45]. J'ai dans un premier temps utilisé le marqueur classique dans ce type d'expériences, le MTSL. Cependant, à cause d'une réaction inattendue entre les deux partenaires, il est apparu que ce choix n'était pas adapté pour ce système. Nous avons donc mis en place deux nouvelles stratégies afin de pouvoir marquer la protéine et l'étudier.

5.2 Etude de la CP12 marquée avec la sonde MTSL - Effet de son partenaire la GAPDH.

5.2.1 Une protéine doublement marquée et déstructurée

Comme on l'a vu précédemment, la CP12 possède 4 cystéines naturelles, qui sont potentiellement marquables, après réduction par le DTT, par la sonde paramagnétique MTSL suivant le protocole décrit en 3.5. Le spectre RPE (figure 67-A) obtenu à température ambiante montre que la sonde a une mobilité réduite par rapport au marqueur libre en solution, qui confirme que le MTSL est bien fixé à la protéine. La mobilité de la sonde appartient au régime rapide indiquant que le marqueur se trouve sur une région de grande flexibilité.

La quantification du nombre de centres paramagnétiques a été effectuée comme décrit dans le paragraphe 3.7, donnant une valeur de 42 μM . La concentration en protéine a été déterminée et a donné une valeur de 24 μM . On a pu déduire de ces deux paramètres, un taux de marquage de 170 % \pm 20 % suggérant la présence de protéines principalement bimarquées. L'enregistrement d'un spectre (figure 67-B) de la CP12 marquée à une température de 100 K montre un fort élargissement indiquant la présence d'interactions spin-spin entre radicaux proches.

Afin de déterminer précisément les sites de fixation des deux sondes paramagnétiques, les échantillons de la CP12 marquée ont été étudiés en spectrométrie de masse par le service de protéomique de l'IMM (Institut de Microbiologie de la Méditerranée). Cette étude, effectuée en MALDI-ToF en mode réflectron ainsi qu'en mode linéaire, est réalisée après digestion trypsique de la protéine. L'incrément de masse du MTSL une fois greffé sur la protéine est de 187 Da ce qui permet d'identifier facilement les peptides portant le marqueur. Ainsi, l'analyse des spectres de masse a permis de localiser majoritairement les deux marqueurs sur les cystéines en position 66 et 75, c'est-à-dire dans le domaine C-terminal.

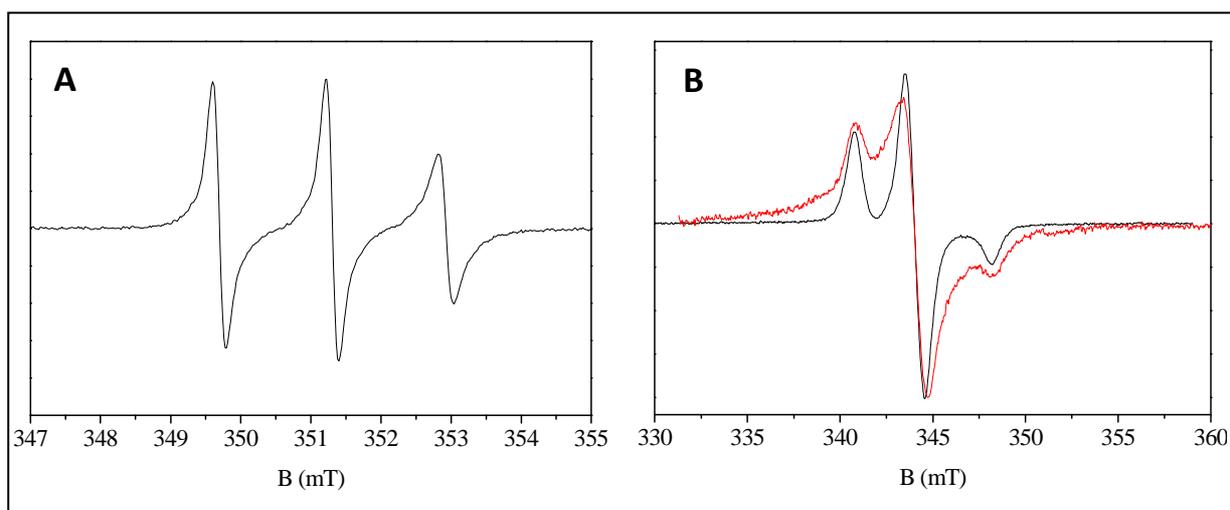


Figure 67 : (A) Spectre RPE à température ambiante de la CP12 marquée avec la sonde MTSL. La concentration en protéine est de 24 μM et la concentration en spins de 42 μM . $P = 10 \text{ mW}$, $MA = 0,1 \text{ mT}$ (B) Spectres RPE enregistrés en conditions cryogéniques (100 K) de la CP12 marquée (rouge) et d'une protéine monomérique de référence (noir). $P = 0,4 \text{ mW}$, $MA = 0,3 \text{ mT}$. Les spectres ont été normalisés par rapport à l'amplitude pic à pic de la raie centrale. L'élargissement du spectre de la CP12^{MTSL} traduit la présence de fortes interactions spin-spin.

5.2.2 Etude de la CP12 marquée

Pour avoir des informations sur la structure de la CP12 marquée, la technique de dichroïsme circulaire (CD) a été utilisée. Le spectre obtenu pour cette protéine est caractéristique d'une protéine totalement désordonnée qui se superpose à celui de la protéine réduite. Le marquage sur le pont C-terminal a donc entraîné la perte de la structure en hélices α qui, d'après le modèle [198], sont localisées dans la région N-terminale (figure 68).

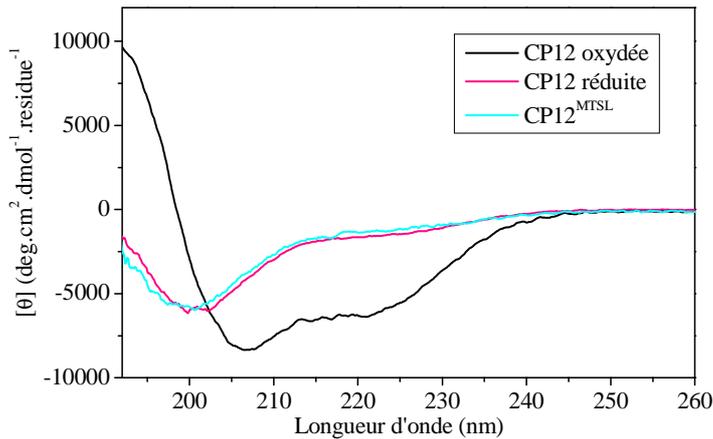


Figure 68 : Spectres CD de la CP12 dans ses 2 états rédox et marquée au MTSL. Tampon phosphate 10 mM, pH 6, filtré. 10 μ M de protéine dans la cuve.

Les propriétés de migration des différentes formes de la CP12 ont été analysées par gel SDS-PAGE (voir partie 3.4.2). La CP12 oxydée migre comme une protéine de 16 kDa, alors qu'elle a une masse moléculaire attendue de 11 kDa, ce qui est typique d'une protéine possédant quelques caractéristiques des PID. Quelques oligomères de 26 et 44 kDa sont également observés. La CP12 réduite migre comme une protéine de 20 kDa, ce qui confirme l'augmentation de la déstructuration, et plus aucun oligomère n'est observé. En absence de DTT, la CP12 marquée se comporte comme la CP12 oxydée et migre à une masse de 16 kDa. Après réduction avec du DTT 20 mM, la CP12 se comporte comme la CP12 réduite, avec une masse moléculaire apparente de 20 kDa (figure 69).

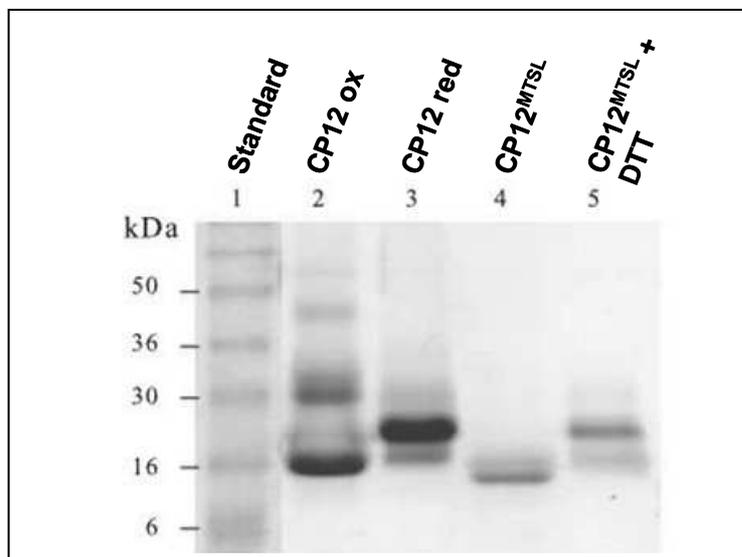


Figure 69 : Gel d'électrophorèse. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE de 12 % et révélées par coloration au Bleu de Coomassie R250. Protéine standard : piste 1. 10 μ g de CP12 non marquée en absence d'agent réducteur, piste 2, ou en présence de 20 mM de DTT, piste 3. 7 μ g de CP12 marquée en absence de DTT, piste 4, ou en présence de 20 mM de DTT, piste 5.

Pour vérifier que la CP12 marquée est toujours capable de former un complexe avec son partenaire la GAPDH, le mélange a été chargé sur un gel natif (voir paragraphe 3.4.3). Le complexe GAPDH-CP12 est ensuite révélé en utilisant un test de reconstitution *in vitro* (paragraphe 3.4.4) (figure 70-A). Pour la CP12 non marquée, la présence du complexe a immédiatement été détectée. En utilisant de la CP12 marquée, aucun complexe n'a été détecté. Ce résultat montre qu'aucune interaction permanente stable ne peut se former entre la CP12 marquée et la GAPDH.

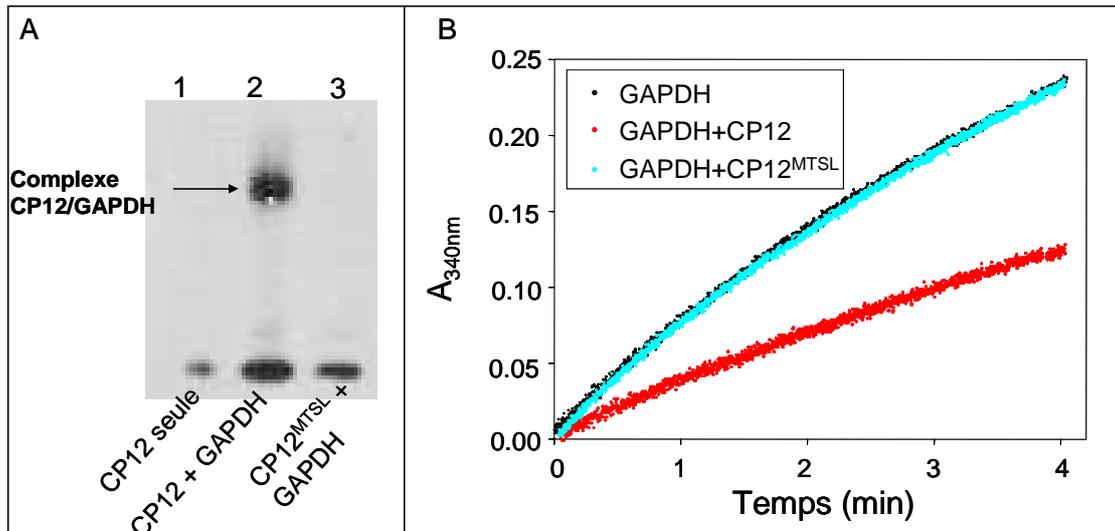


Figure 70 : Analyse de la formation du complexe CP12-GAPDH. (A) Analyse Western Blot de la reconstitution *in vitro* du complexe CP12-GAPDH. La CP12 non marquée (piste 2) et la CP12 marquée (piste 3) ont été mélangées avec la GAPDH tétramérique dans un rapport molaire de 1 : 1 (0.03 nmol). La CP12 seule est déposée comme contrôle (piste 1). Les protéines sont séparées sur un gel natif de gradient d'acrylamide 4-15%, transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées avec des anticorps dirigés contre la CP12. (B) Effet de la CP12 sur l'activité NADPH-GAPDH. Courbes d'activité pour la GAPDH seule, $[GAPDH]_0 = 1 \text{ nM}$ (noire), en présence de CP12 (rouge) ou en présence de CP12 marquée au MTSL (bleue) à 0,5 μM (cf paragraphe 3.4.1).

L'effet de la CP12 sur les propriétés cinétiques de la GAPDH a été étudié chez *Chlamydomonas reinhardtii* [200]. Le complexe GAPDH/CP12 a été purifié à partir de l'algue et ses propriétés comparées à celles de la GAPDH seule. Il a été montré qu'en présence de CP12, l'activité de la GAPDH en présence de NADPH comme cofacteur était diminuée.

Lorsque de la GAPDH recombinante est incubée avec de la CP12 recombinante, les résultats obtenus sont similaires à ceux du complexe GAPDH/CP12 natif.

Ici, l'activité de la GAPDH en présence de NADPH est diminuée d'un facteur 3 lorsque la CP12 non marquée est ajoutée mais l'on n'observe aucune diminution en présence de CP12 marquée au MTSL (figure 70-B). Cette observation renforce les précédents résultats montrant l'absence d'interaction stable entre la CP12 et la GAPDH.

5.2.3 Caractérisation d'une nouvelle fonction de la GAPDH

Connaissant les caractéristiques structurales et la position des marqueurs de la CP12 marquée, celle-ci a été mise en présence de son partenaire physiologique, la GAPDH, en quantité équimolaire c'est-à-dire une CP12^{MTSL} (CP12^{MTSL} = CP12 marquée) pour un tétramère de GAPDH. Ce mélange est ensuite observé en spectroscopie RPE. De façon tout à fait surprenante, l'analyse du mélange au cours du temps a montré que la GAPDH induisait la libération totale des marqueurs après environ 90 minutes (figure 71).

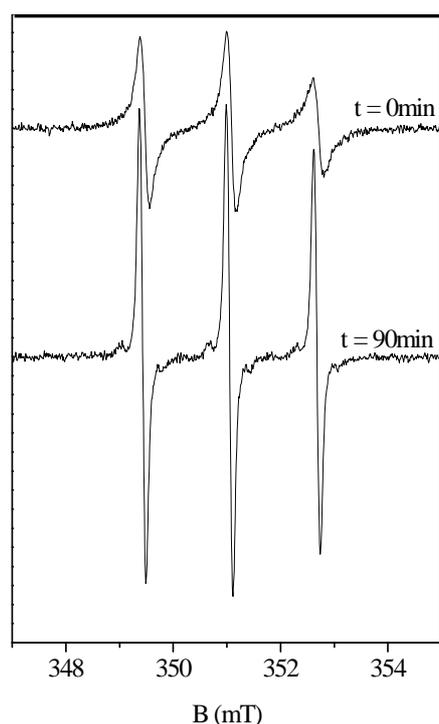


Figure 71 : Effet de la GAPDH sur la CP12 marquée. Spectres RPE à $t = 0\text{min}$ et $t = 90\text{min}$ du mélange CP12^{MTSL}/GAPDH pour un rapport molaire de 1 : 1 (1 monomère de CP12 pour 1 tétramère de GAPDH). La concentration finale en protéine est de $20,7\ \mu\text{M}$.

On observe le passage d'une forme spectrale élargie par une restriction de mobilité de la sonde paramagnétique, celle-ci étant greffée sur la protéine, à une forme étroite typique d'un radical libre en solution.

La cinétique de libération a été mesurée en faisant l'acquisition de plusieurs spectres de l'échantillon en fonction du temps. L'évolution cinétique de la réaction est suivie en mesurant le rapport $h(-1)/h(0)$ des différents spectres obtenus, car c'est le paramètre semi quantitatif qui varie le plus dans cette situation, la raie à bas champ étant très proche de la raie à champ central (voir partie expérimentale 3.9.1). Cette cinétique a été ajustée par une loi monoexponentielle (figure 72) de type :

$$y = y_0 + A_0 \left(1 - \exp \frac{-(t - t_0)}{\tau} \right)$$

où :

y_0 correspond au rapport $h(-1)/h(0)$ à $t = 0$ min

t_0 correspond au début de la cinétique

τ correspond au temps caractéristique de libération du marqueur

$A_0 + y_0$ correspond à la valeur de $h(-1)/h(0)$ finale

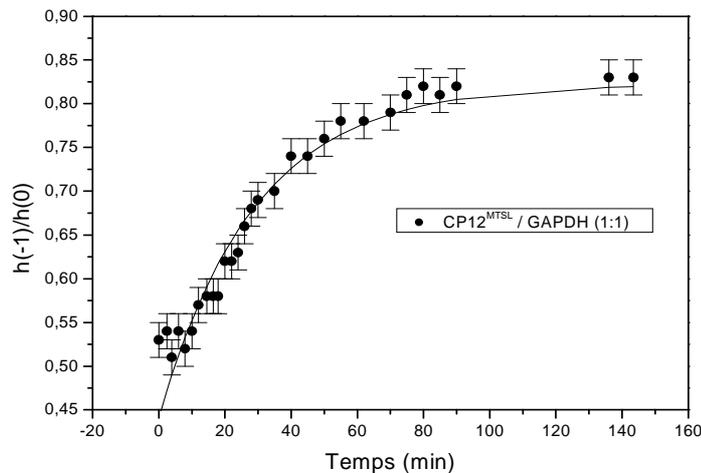


Figure 72 : Evolution du rapport $h(-1)/h(0)$ au cours du temps avec un excès molaire d'une CP12 pour quatre monomères de GAPDH. Le temps caractéristique de la cinétique est de 29 min. Un délai de 10 minutes a été observé dans ce cas mais n'est pas systématique.

Les paramètres cinétiques obtenus lors de la libération du marqueur ont donné une valeur de τ de 29 minutes et une valeur de $A_0 + y_0$ de 0,82 indiquant la libération totale du marqueur. La GAPDH étant constituée de quatre monomères, on peut se demander si les quatre monomères sont impliqués dans la libération du marqueur pour une CP12. Afin de répondre à cette question, la cinétique de libération du MTSL a été étudiée en utilisant

différents rapports molaires en GAPDH. Les courbes représentant le rapport $h(-1)/h(0)$ de ces différentes stoechiométries suivent la loi monoexponentielle d'ordre 1 obtenue précédemment, et les vitesses de libération sont identiques quel que soit le rapport molaire (figure 73). Cependant, les cinétiques obtenues montrent une libération partielle lorsqu'il y a moins de deux monomères pour une CP12 marquée. Comme la CP12 est principalement bimarquée, ces résultats montrent que la libération d'un marqueur correspond à l'action d'un monomère de GAPDH et qu'un monomère ne peut agir qu'une seule fois.

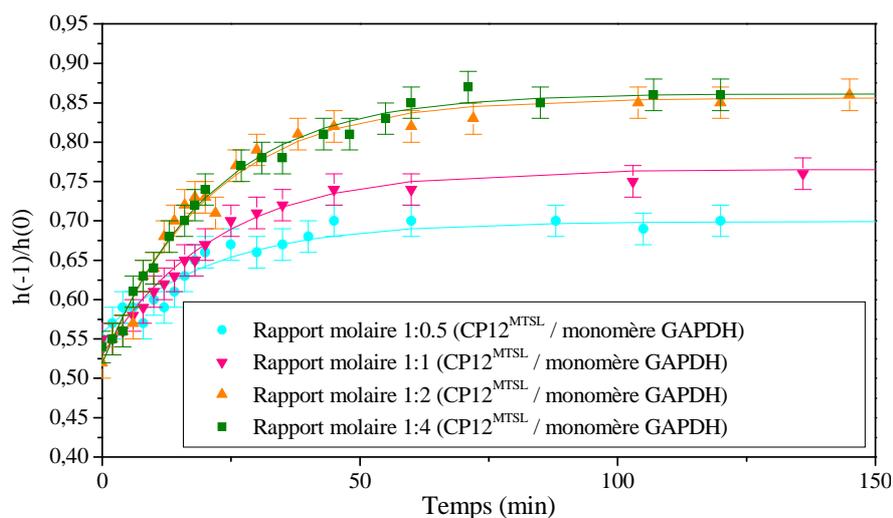


Figure 73 : Cinétique de libération du MTSL de la CP12 pour différents excès molaires CP12/monomère GAPDH. La concentration en CP12 est de 20 μ M.

L'observation de la libération des marqueurs suggère une réaction conduisant à la rupture du pont S-S entre la cystéine et le marqueur. Afin de déterminer la nature de la réaction de libération, un nouveau marqueur a été utilisé : le 3-Maleimido-proxyl en gardant le même protocole de marquage. Cette sonde paramagnétique se lie aux cystéines par une liaison covalente Carbone-Soufre (figure 74). Cette protéine nouvellement marquée à 75 % \pm 20 % est étudiée en RPE en présence de GAPDH au cours du temps. Aucune évolution spectrale n'a été observée indiquant que la GAPDH n'est pas capable de rompre la liaison. Ceci montre que la GAPDH rompt spécifiquement les ponts disulfure des liaisons cystéines-MTSL.

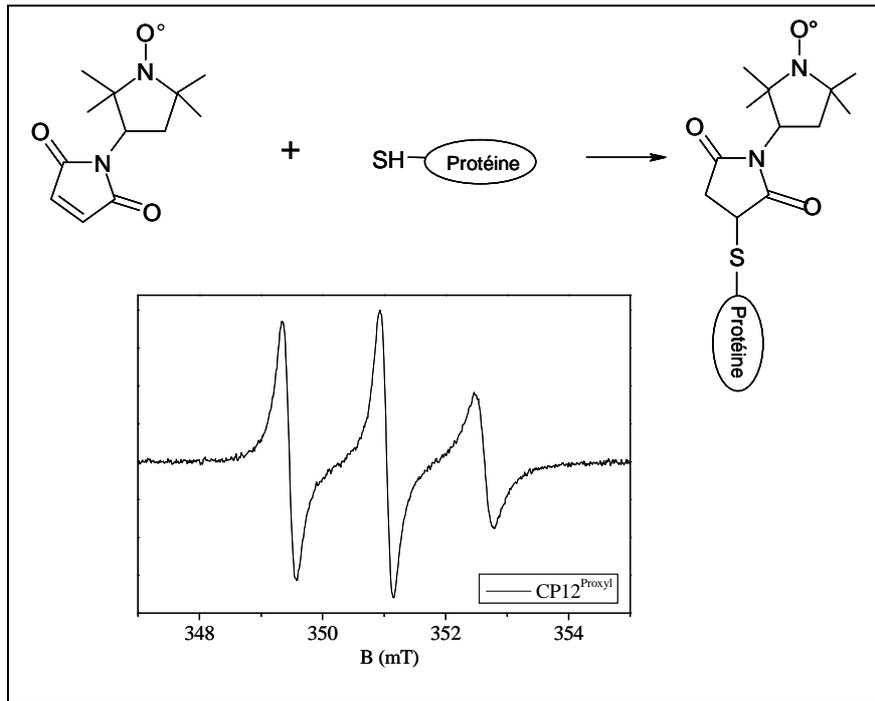


Figure 74 : Réaction du 3-Maleimido-proxyl avec les cystéines et spectre RPE de la CP12 marqué avec la sonde PROXYL. La forme spectrale est similaire à celle observée avec le MTSL.

Les seuls résidus capables de rompre une liaison S-S sont les résidus cystéines portant une fonction thiol. Alors que toutes les GAPDH ont deux résidus cystéines conservés présents dans leur site actif, certaines espèces peuvent posséder d'autres résidus cystéines. C'est le cas de la GAPDH de *Chlamydomonas reinhardtii* qui a deux cystéines supplémentaires par monomère que l'on nommera extra-cystéines. Les positions des cystéines sont les suivantes : C156 et C160 pour les cystéines du site actif, positions C21 et C291 pour les extra-cystéines.

Pour évaluer la spécificité de ces cystéines, deux autres GAPDH ont été testées dans les mêmes conditions opératoires que l'expérience faite avec la GAPDH de *C. reinhardtii* : une GAPDH provenant d'un muscle du lapin qui possède deux extra-cystéines mais à des positions différentes, et une GAPDH de la levure *S. cerevisiae* qui ne possèdent pas ces extra-cystéines (figure 75) [209].

Rabbit muscle	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGK--VDVVAINDPFIDLHYMVYMFQYDSTHGKFGH	56
<i>S. cerevisiae</i>	--MIRIAINGFGRIGRLVLRLLALQRKD--IEVVAVNDPFI SNDYAAVMVKYDSTHGRYKG	56
<i>C. reinhardtii</i>	EKKIRVAINGFGRIGRNFLRCWHGRQNTLLDVVAIND-SGGVKQASHLLKYDSTLGTFAA	59
	↑	
Rabbit muscle	TVK-AENGKLVINGKAITIFQERDPANIKWGDAGA EYVVESTGVFTTMEKAGAHLLKGGAK	115
<i>S. cerevisiae</i>	TVS-HDDKHIIIDGVKIATYQERDPANLPWGS LKIDVAVDSTGVFKELDTAQKHIDAGAK	115
<i>C. reinhardtii</i>	DVKIVDDSHISVDGKQIKIVSSRDPLQLPWKEMNIDLVI EGTGVFIDKVGAGKHIQAGAS	119
Rabbit muscle	RVIISAPSAD--APMFVMGVNHEKYDNSLKI VSNASDTNCLAPLAKVIHDHFGIVEGLM	173
<i>S. cerevisiae</i>	KVVITAPSSS--APMFVVGVNHTKYTPDKKI VSNASDTNCLAPLAKVINDAFGIEEGLM	173
<i>C. reinhardtii</i>	KVLITAPAKDKDIPTFVVG VNEG DYKHEYP IISNASDTNCLAPFVKVLEQKFGIVKGTM	179
Rabbit muscle	TTVHAITATQKTVDGSPGKLRDRGRGAAQNI IPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRV	233
<i>S. cerevisiae</i>	TTVHSMATQKTVDGSPHKDWRGGRTASGNI IPSSTGAAKAVGKVLPELQKLTGMAFRV	233
<i>C. reinhardtii</i>	TTTHSYTGDQRLLD-ASHRDLRRARAAALNI VP TTTGAAKAVSLVLP SLKGLNGIALRV	238
Rabbit muscle	PTPNVSVVDLTCRLEKA AKYDDIKKVVKQASEG PLKGI LGYTEDQVVS CDFNSATHSSTF	293
<i>S. cerevisiae</i>	PTVDVSVVDLTVKLEKEATYDQIKKAVKAAA EGPMKGV LGYTEDAVVSSDFLGDTHASIF	293
<i>C. reinhardtii</i>	PTPTVSVVDLVVQVEKKTFAEEVNAAFREAA NGPMKGV LHVEDAPLVSIDFKCTDQSTSI	298
	↑	
Rabbit muscle	DAGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMVHMASKE--	333
<i>S. cerevisiae</i>	DASAGIQLSPKFVKLISWYDNEYGYSARVVDLIEYVAKA---	332
<i>C. reinhardtii</i>	DASLTMVMGDDMVKVVAWYDNEWGYSQRVVDLAEVTAKKWA	340

Figure 75 : Alignement de séquences de différentes GAPDH : GAPDH de muscle de lapin, GAPDH de levure et GAPDH de *C. reinhardtii*. Les cystéines du site actif des GAPDH sont encadrées en rouge, les extra-cystéines sont montrées par des flèches. D'après [209].

La comparaison de l'évolution du rapport h(-1)/h(0) des différentes GAPDH étudiées indiquent qu'aucune d'elles n'entraîne de libération du MTSL de la CP12 (figure 76). Ces résultats montrent d'une part, qu'il ne peut pas y avoir libération du marqueur si la GAPDH est dépourvue d'extra-cystéines, et d'autre part que cette réaction est spécifique de la GAPDH de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La capacité de la GAPDH de *C. reinhardtii* à libérer des sondes paramagnétiques sur des protéines autres que la CP12 a également été testée en utilisant deux protéines monomarquées. Le Cytochrome c_3 de la bactérie *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (fourni par le docteur Z. Dermoun) est une protéine globulaire de 12 kDa, tandis que Ntail, domaine C-terminal de la nucléoprotéine du virus de la rougeole (fourni par le docteur S. Longhi), est une protéine complètement désordonnée de 14,6 kDa. Ces protéines ont été choisies car elles possèdent une masse moléculaire similaire à la CP12 avec des propriétés structurales différentes. Alors que la GAPDH de *C. reinhardtii* ne peut pas libérer le marqueur sur le cytochrome c_3 , dans le cas de Ntail marqué, la GAPDH est capable d'induire une lente et partielle libération du marqueur (figure 76).

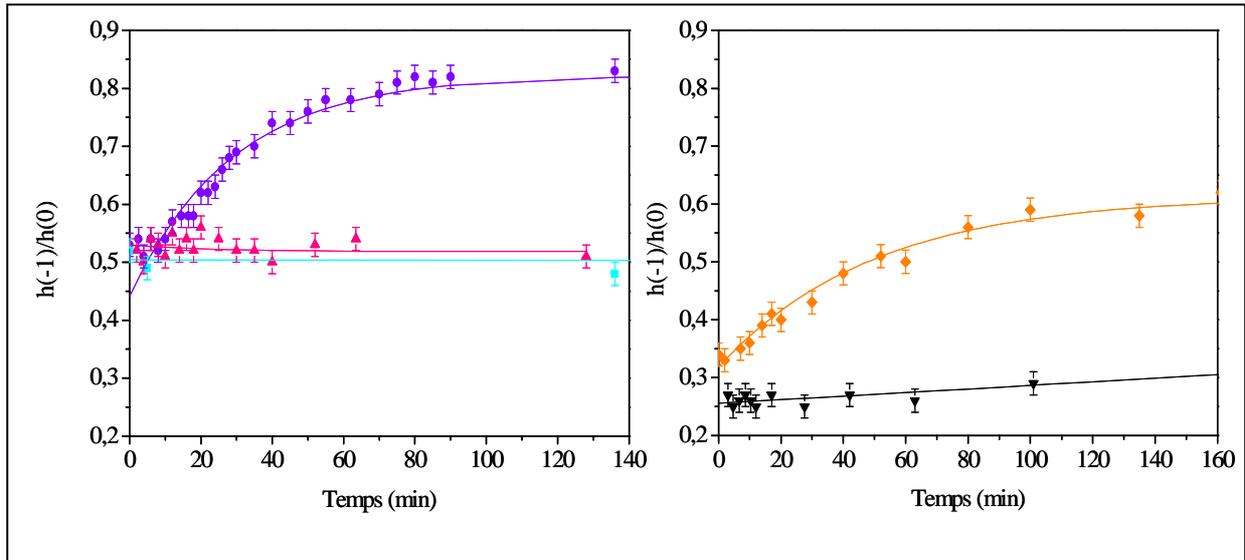


Figure 76 : Cinétique de libération du MTSL en présence de GAPDH de *C. reinhardtii* (rond violet), GAPDH de levure (carré bleu) ou de lapin (triangle rose) en mélange avec de la CP12 dans un rapport molaire de 1 : 1 ; ou en présence de différentes protéines avec la GAPDH de *C. reinhardtii* : GAPDH/Ntail (losange orange) et GAPDH/cytochrome c_3 (triangle noir) (1 : 1).

Au cours de cette étude, la libération du marqueur n'a pas permis l'étude d'une interaction stable entre les deux protéines. Cependant, ce comportement inhabituel entre une protéine marquée et son partenaire a permis de mettre en évidence le rôle particulier des extra-cystéines de la GAPDH de *Chlamydomonas reinhardtii*, et plus particulièrement, le nouveau rôle que peut prendre celle-ci dans les échanges entre les thiols et les ponts disulfure. Grâce aux différentes expériences menées, un mécanisme de libération du marqueur a pu être proposé [209] (figure 77). Dans ce modèle, un complexe transitoire se forme entre la cystéine d'un monomère de GAPDH et la cystéine marquée de la protéine, entraînant la libération du marqueur, confirmant ainsi l'interaction entre les deux partenaires. Comme la libération d'un marqueur correspond à l'action d'un monomère, ce modèle propose la formation d'un pont disulfure intra-monomère. En effet, on ne peut avoir de pont disulfure inter-GAPDH car aucun dimère de GAPDH n'est observé sur gels dénaturants.

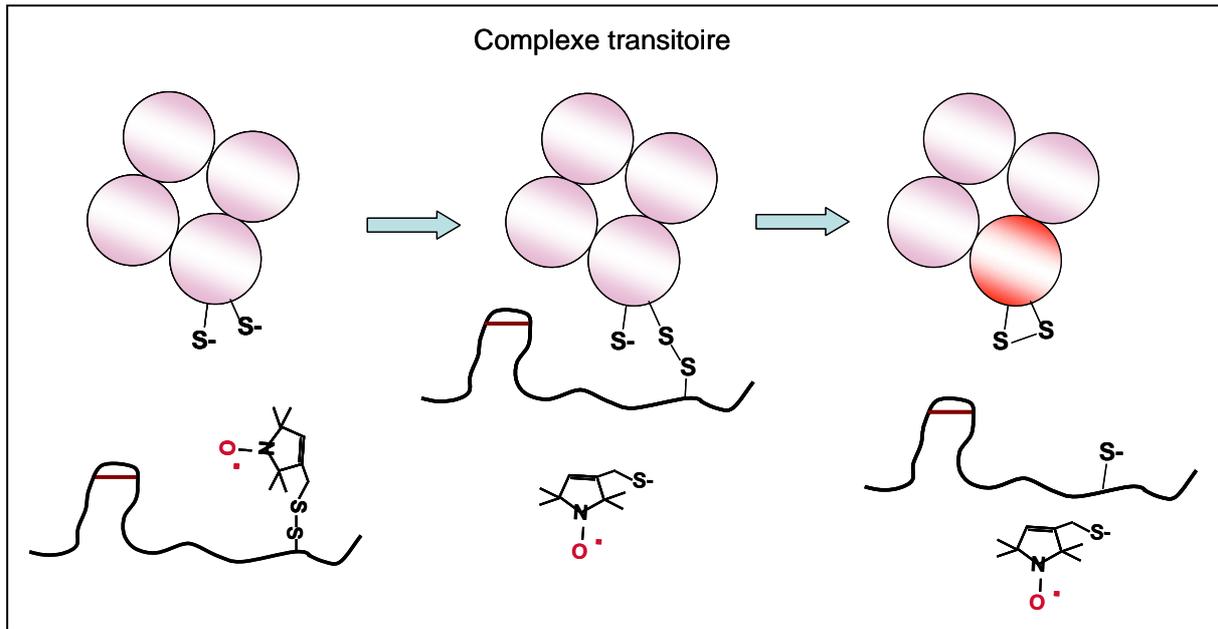


Figure 77 : Schéma du mécanisme de libération d'un marqueur de la CP12^{MTSL} par la GAPDH.

Afin de valider le rôle des extra-cystéines de la GAPDH sur la libération des marqueurs, un mutant GAPDH a été construit et purifié en remplaçant une des deux extra-cystéines, la cystéine 21, par une sérine. Ce mutant GAPDH-C21S a ensuite été étudié en présence de la CP12 marquée dans un mélange équimolaire (une CP12^{MTSL} pour un tétramère de GAPDH). Aucune libération de marqueurs n'a été observée comme le montre la figure 78, ce qui confirme les résultats précédents. Les extra-cystéines de la GAPDH de *Chlamydomonas reinhardtii* sont responsables de la libération du MTSL.

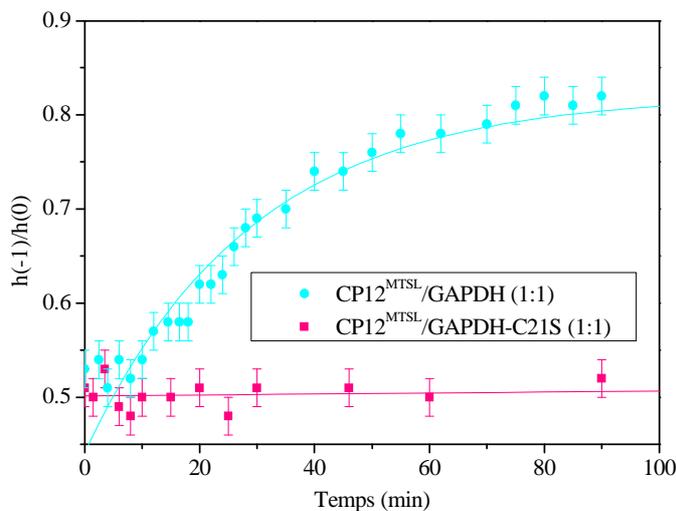


Figure 78 : Etude de la cinétique de libération du marqueur du mélange CP12^{MTSL}/GAPDH et du mélange CP12^{MTSL}/GAPDH-C21S par RPE au cours du temps.

5.2.4 Discussion

La CP12 est une protéine flexible bien connue pour interagir avec la GAPDH et la réguler. Cette régulation est probablement liée à des transitions structurales des deux protéines, mais les bases moléculaires de ces changements ne sont pas encore comprises. Le marquage de spin combiné à la spectroscopie RPE est une approche bien adaptée pour répondre à cette question. C'est pourquoi elle a été utilisée dans cette étude.

La réaction de marquage du MTSL sur la CP12 sauvage a conduit à un marquage assez spécifique de certaines cystéines. Le greffage de deux marqueurs sur les positions 66 et 75 a été révélé par spectrométrie de masse suggérant que le pont disulfure C23-C31 était maintenu. Ceci est en accord avec de précédents résultats qui montraient qu'un des deux ponts S-S était plus susceptible d'être oxydé que l'autre [210].

La spectroscopie CD a été utilisée pour caractériser la structure globale de la CP12. Comme décrit précédemment [2], le spectre CD de la CP12 oxydée contient une certaine proportion en hélices α . Au contraire le spectre CD de la protéine réduite ou marquée est celui d'une protéine désordonnée indiquant que la CP12 subit un fort changement conformationnel après réduction ou marquage, menant à une transition ordre-désordre. Cependant, la CP12 marquée ne se comporte pas comme la forme réduite sur gel SDS-PAGE et migre à la même position que la protéine oxydée. Le comportement de la CP12 réduite sur SDS-PAGE n'est donc pas lié à l'absence d'éléments structuraux mais plutôt à la perte du pont disulfure N-terminal. Ainsi, la CP12 marquée, qui est déstructurée mais possède ce pont N-terminal, migre comme la CP12 oxydée. Cette étude nous permet donc de conclure que la réduction de ce pont est principalement responsable de la différence de migration sur gel entre la CP12 réduite et oxydée.

L'effet de la GAPDH sur la CP12^{MTSL} a été étudié en suivant l'évolution du signal RPE en fonction du temps. De façon surprenante, la présence de la GAPDH tétramérique, dans un rapport molaire de 1 : 1, induit la libération totale du MTSL en solution après 90 minutes. Ceci était tout à fait inattendu car habituellement, l'étude des interactions protéine-protéine montre une modification du spectre qui se traduit par une diminution de la mobilité du radical ou alors aucune modification n'est observée si le radical est hors région d'interaction, comme nous l'avons vu dans le chapitre 4. L'effet observé ici n'avait jamais été décrit dans la littérature pour des interactions protéines-protéines. Une fois le MTSL libéré, la GAPDH aurait pu interagir avec la CP12 mais des tests de reconstitution ont montré la non-formation du complexe CP12^{MTSL}/GAPDH ce qui indique que la GAPDH n'est plus apte à former le complexe une fois son action faite sur les sondes paramagnétiques. Quand le 3-maleimido-proxyl est utilisé pour marquer la CP12, la GAPDH ne peut le libérer. Cependant,

le signal RPE ne change pas en présence de GAPDH, confirmant qu'il n'y a aucune interaction stable entre les deux partenaires quand la CP12 est marquée dans sa région C-terminale. Ce résultat indique que, dans le cas du marquage au MTSL, la libération de celui-ci implique la rupture d'un pont disulfure entre le marqueur et la protéine. Ainsi, la GAPDH peut catalyser des réactions d'échange thiols-ponts disulfure avec la CP12 marquée *via* des groupements thiols. La GAPDH possède quatre résidus cystéines par monomère, et le titrage de ces cystéines a montré que tous les groupements –SH étaient exposés au solvant. La GAPDH restant active après avoir agi sur la CP12^{MTSL}, les résidus cystéines du site actif ne sont donc pas responsables de la libération du MTSL. L'effet de la GAPDH de levure, qui ne contient que des cystéines dans son site actif, et l'effet de la GAPDH de lapin qui possède deux cystéines en plus de celle de son site actif comme la GAPDH de *C. reinhardtii* mais à des positions différentes, ont été suivies par RPE. Ces GAPDHs ne peuvent libérer le marqueur de la CP12 suggérant que les cystéines C21 et C291 de la GAPDH de l'algue sont impliquées dans la réaction d'échange thiol-pont disulfure. De plus, l'observation d'un modèle de structure montre que les cystéines 21 et 291 sont proches (figure 79). Cette hypothèse a été confirmée par la mutation de la cystéine 21 en sérine qui empêche la libération du MTSL greffé sur la CP12.

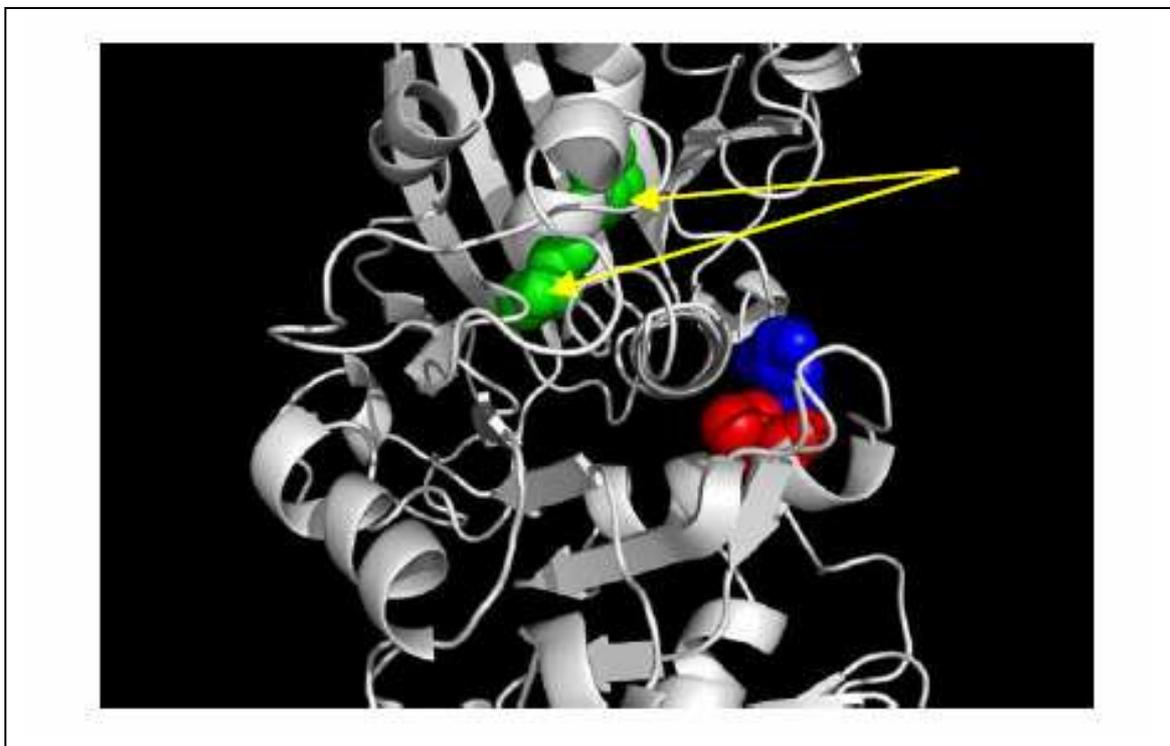


Figure 79 : Modèle de la structure d'une partie d'un monomère de GAPDH de *C. reinhardtii* montrant les quatre cystéines. Les extra-cystéines sont colorées en rouge (C21) et bleu (C291) et sont proches l'une de l'autre. Les cystéines du site actif, C156 et C160 sont en vert.

Finalement, comme la libération d'un marqueur correspond à l'action d'un monomère de GAPDH, un modèle basé sur la formation d'un pont disulfure intramonomère sur la GAPDH a été proposé [209] (figure 77). Ce modèle implique la formation d'un complexe transitoire CP12-GAPDH dans le mécanisme de reconnaissance.

Il est bien connu que la GAPDH est une protéine « moonlighting » qui possède au moins 10 fonctions distinctes, des activités enzymatiques ou non-enzymatiques en plus de sa fonction de conversion du 1,3-biphosphoglycérate en glycéraldéhyde 3-phosphate et phosphates inorganiques [211]. Ici, pour la première fois, nous montrons que la GAPDH de l'algue *C. reinhardtii* peut être un membre de la famille des catalyseurs thiol-disulfure. Ce mécanisme est plutôt spécifique car il ne peut pas libérer le marqueur du cytochrome c_3 , qui est globulaire, mais peut induire une lente et partielle libération du marqueur sur Ntail, une autre PID. Cette nouvelle fonction semble donc être liée à la flexibilité de la protéine marquée. Le système rédox le plus étudié dans les organismes photosynthétiques est le système thiorédoxine impliquant la régulation d'un nombre croissant de protéines cibles *via* des échanges thiol-disulfure [212]. De plus, de récentes études suggèrent que les glutarédoxines pourraient aussi jouer un rôle important dans la signalisation rédox, une modification post-traductionnelle dont l'importance commence à émerger dans les cellules de mammifères et, seulement très récemment, dans les organismes photosynthétiques [213-214]. *In vivo*, par exemple, les groupements thiols des cystéines peuvent être modifiés réversiblement par des composés de faible poids moléculaire tel que la cystéine, la cystéamine, et le glutathion [213]. Par ces modifications, les oxydants peuvent moduler l'activité de protéines dans les cellules. Comme la régulation rédox prend une place importante dans les organismes photosynthétiques, l'échange thiol-ponts disulfure catalysé par la GAPDH de *C. reinhardtii* peut être pertinent physiologiquement.

5.3 Une stratégie alternative pour le marquage de la CP12 : la Tyrosine comme site de greffage

La technique SDSL était jusqu'à présent limitée à des marqueurs classiques ayant pour cible les cystéines. Cependant, il existe de nombreux systèmes possédant des cystéines jouant des rôles fonctionnels ou structuraux, ce qui empêche des études de marquage de spin. Pour élargir les potentialités de cette technique, il est nécessaire de développer un nouveau type de greffage afin de rendre possible l'étude de ces protéines. Par exemple, la protéine CP12, du fait de l'action de la GAPDH sur les ponts disulfure, est impossible à étudier en effectuant un marquage basé sur une liaison S-S sur les cystéines de la protéine.

Pour surmonter cette difficulté, une nouvelle stratégie a donc été mise en place au laboratoire en collaboration avec le Pr S. Marque et le Pr P. Tordo de l'équipe SREP du laboratoire de Chimie de Provence, dans le but de synthétiser de nouvelles sondes paramagnétiques capables de se greffer sur des résidus autres que des cystéines. Une stratégie, utilisant un acide aminé non naturel incorporé génétiquement, a récemment été proposée par d'autres auteurs [154]. Cela permet l'introduction d'un acide aminé ayant une fonctionnalité chimique unique dans la protéine native et permet donc l'introduction d'une sonde spectroscopique *via* une réaction avec un réactif spécifique au nouveau groupement fonctionnel [215]. Cependant, il s'agit d'une stratégie plutôt complexe, impliquant une paire ARNt suppresseur non natif et aminoacyl-ARNt synthétase, pour incorporer un acide aminé non naturel dans la protéine recombinante. Une telle stratégie est difficile à mettre en place, nous proposons donc une voie alternative consistant à cibler des résidus autres que les cystéines, avec des sondes nitroxydes. La bioconjugaison de petites molécules sur des résidus de protéines est un domaine de recherche très actuel et très concurrentiel, et plusieurs réactions ont récemment été proposées pour cibler spécifiquement des résidus [216]. En particulier, des efforts ont été menés pour modifier les chaînes latérales des acides aminés aromatiques, tryptophane [217] et tyrosine [218-219]. Parmi ces travaux, une réaction à trois composés de type Mannich a été développée, permettant la modification de tyrosine sous des conditions douces et biocompatibles [219]. En nous inspirant de ces travaux, le marquage spécifique d'un résidu tyrosine de la CP12 a été réalisé en utilisant une réaction de type Mannich (figure 80) [220]. En effet, la CP12 contenant une unique tyrosine en position 78, elle était le candidat idéal pour démontrer la faisabilité de ce marquage.

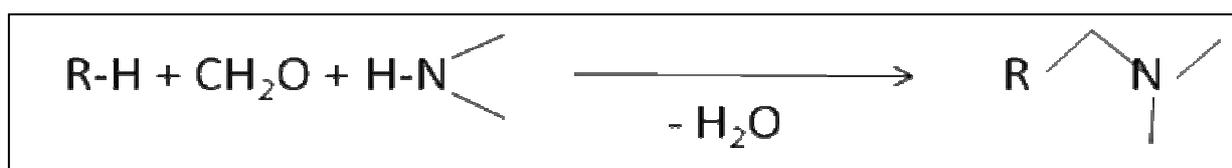


Figure 80 : Réaction générale de Mannich d'après [221].

5.3.1 Réaction de type Mannich

Une réaction de type Mannich est une réaction de condensation entre un aldéhyde non-énolisable, une amine primaire ou secondaire et un composé carbonyle énolisable. Dans un premier temps, un ion imminium est formé par action de l'amine sur l'aldéhyde non énolisable. Puis, cet ion subit l'addition de l'énol pour donner le produit appelé « base de Mannich » (figure 81).

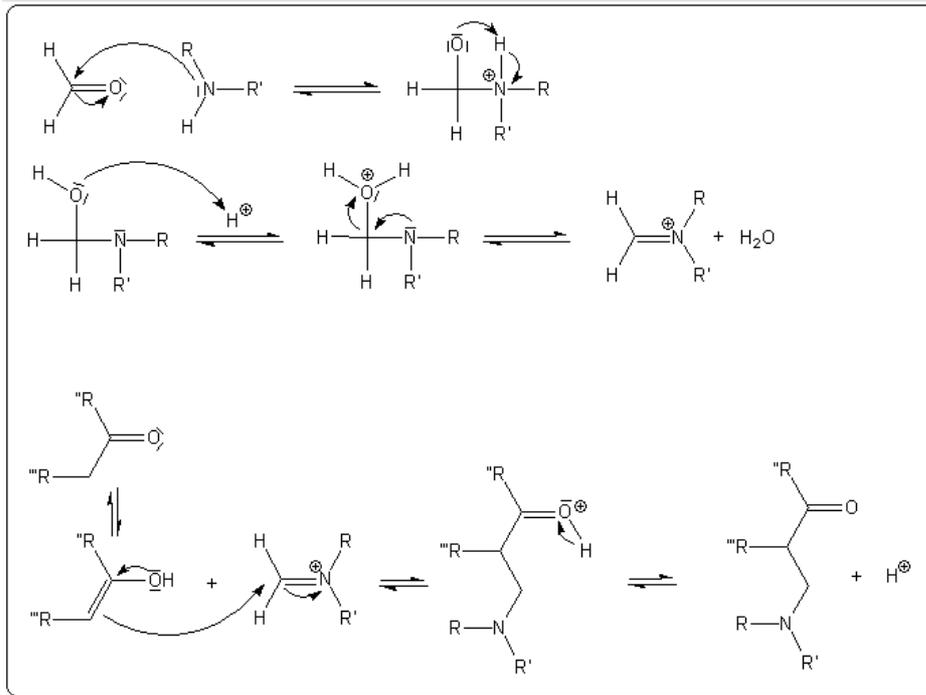


Figure 81 :
*Mécanisme
 développé d'une
 réaction de type
 Mannich d'après
 [221].*

Cette réaction générale de Mannich a ensuite été appliquée à un cas particulier : le marquage d'un résidu tyrosine avec le 4-amino-2,2,5,5-tétraméthyl-3-imidazoline-1-yloxy (ANINO). On obtient un produit A par cette réaction qui peut se cycliser s'il reste du formaldéhyde en solution pour donner un produit B (figure 82).

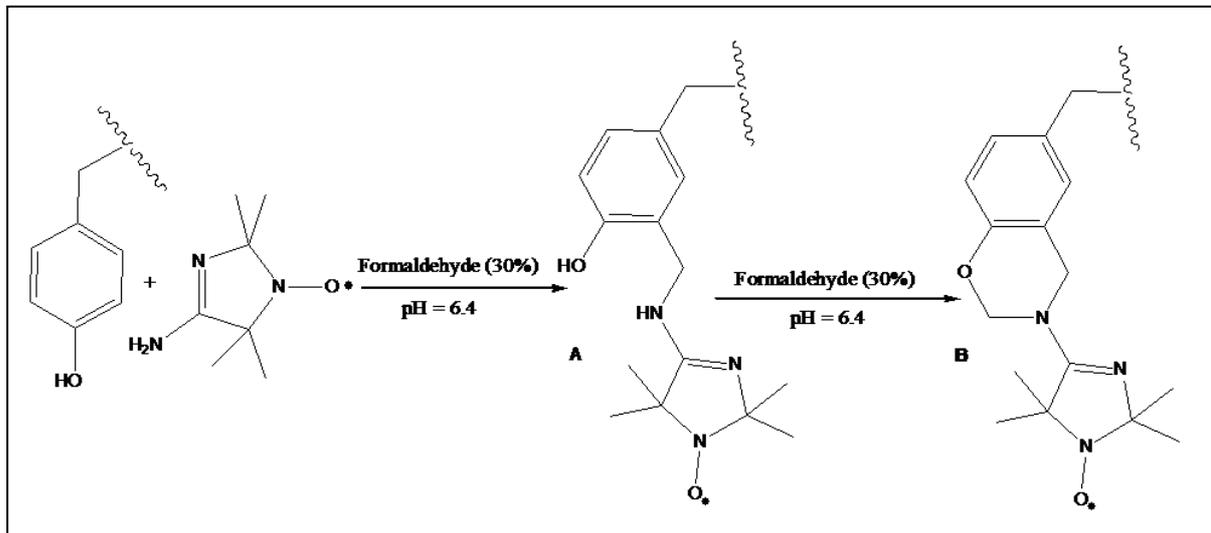


Figure 82 : Réaction de Mannich à 3 composés sur la tyrosine donnant deux produits réactionnels A et B possibles.

5.3.2 Essai concluant sur la tyrosine estérifiée.

Un essai de ce protocole a d'abord été testé sur une tyrosine estérifiée afin de montrer la faisabilité de cette réaction. La tyrosine estérifiée a été ajoutée à un mélange contenant du formaldéhyde et le radical nitroxyde dans un rapport molaire de 1/100/10 (tyrosine / formaldéhyde / nitroxyde). Ce mélange, ajusté à pH 6,5, a été incubé pendant 16 heures à l'air et à température ambiante. Des analyses en spectrométrie de masse ont ensuite été réalisées en utilisant une ionisation par électrospray (service spectropole de St-Jérôme, Marseille). Le spectre de masse obtenu montre un pic à 390,3 Da qui correspond à la masse de la tyrosine estérifiée marquée plus un proton (figure 83 et tableau 6). Cette masse est celle attendue lorsqu'on obtient le produit B de la figure 82, la masse du produit A n'est pas observée indiquant que le composé B est le seul produit de la réaction. Cette expérience démontre l'utilisation possible de cette réaction de Mannich pour le marquage de résidus tyrosine de protéine.

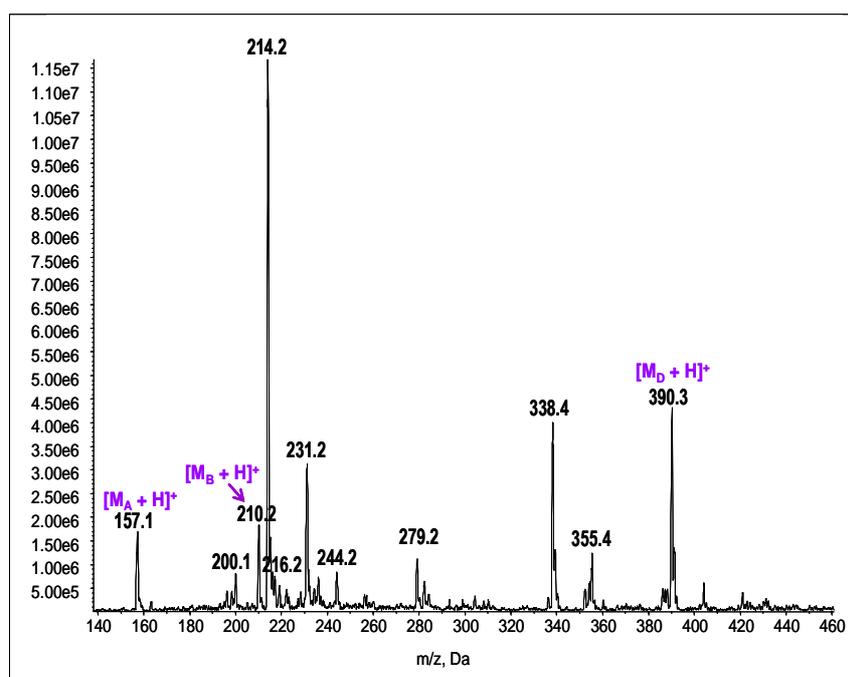
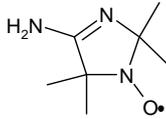
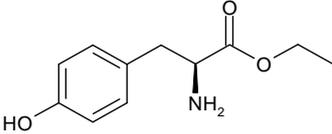
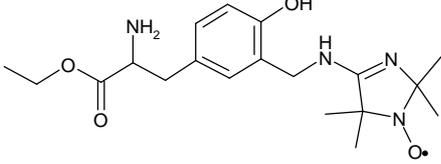
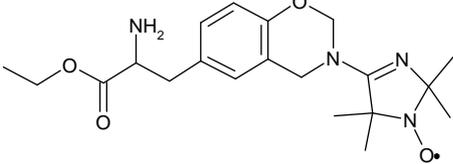


Figure 83 : Spectrométrie de masse en ionisation électrospray (ESI-MS) du mélange contenant la tyrosine estérifiée, le formaldéhyde et le marqueur après incubation de 16h à pH 6,5. M_A : nitroxyde, M_B : tyrosine estérifiée, M_D : tyrosine estérifiée marquée. Les signaux à 214, 231, 279 et 338 viennent d'impuretés dans la source d'ionisation [222].

Tableau 6 : Formule chimique des différents composés susceptibles d'être observés en spectrométrie de masse [222].

	<p>Composé A (sonde nitroxyde)</p> <p>Formule : C₇H₁₄N₃O[•]</p> <p>M = 156 Da</p>
	<p>Composé B (tyrosine estérifiée)</p> <p>Formule : C₁₁H₁₅NO₃</p> <p>M = 209 Da</p>
	<p>Composé C</p> <p>Formule : C₁₉H₂₉N₄O₄[•]</p> <p>M = 377 Da</p>
	<p>Composé D (tyrosine estérifiée marquée)</p> <p>Formule : C₂₀H₂₉N₄O₄[•]</p> <p>M = 389 Da</p>

5.3.3 Marquage de la CP12

La réaction de type Mannich a été réalisée en adaptant le protocole utilisé par McFarland *et al* [219] en faisant réagir 130 μ M de CP12 dans un tampon Phosphate 10 mM pH 6,4 avec du formaldéhyde et le nitroxyde ANINO dans un excès molaire de 1 : 1250 : 10 (figure 82). Le mélange est agité pendant 16 heures à température ambiante afin d'éviter la formylation indésirée de la protéine.

L'excès de marqueur non lié à la protéine et de formaldéhyde est éliminé par gel filtration suivant le même protocole décrit pour le MTSL dans le paragraphe 3.5.2. L'élution des fractions est analysée à la fois en suivant la concentration en protéines par test de Bradford (paragraphe 3.3.1) et en mesurant la concentration en spin par double intégration du signal RPE (paragraphe 3.7) (figure 84-A). Les fractions les plus concentrées (fractions 2 à 5) sont ensuite réunies pour faire un échantillon unique. Il s'agit de prendre les fractions qui sont les plus concentrées en protéine tout en évitant de récupérer des fractions qui pourraient être contaminées par du radical libre, c'est pourquoi les fractions de fin d'élution ne sont jamais prises. La concentration en protéine de cet échantillon est de 44 μ M avec un taux de marquage de 70 % (\pm 20 %) dont le spectre RPE est présenté en figure 84-B. La forme spectrale obtenue est typique d'une sonde nitroxyde possédant une grande mobilité.

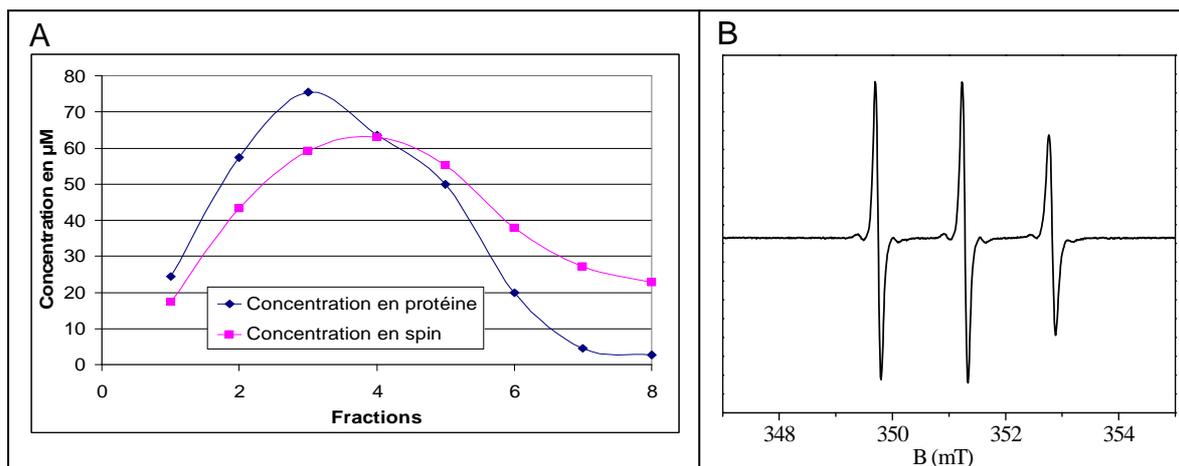


Figure 84 : (A) Concentration en protéine (losange bleu) et concentration en spin (carré rose) des fractions après sortie de colonne. A partir de la fraction 5, la concentration en spin devient supérieure à celle en protéine. Cela indique une contamination par du radical libre. Seules les fractions 2 à 5 ont été rassemblées. (B) Spectre de la CP12 marquée après les 16 heures de réaction de marquage.

5.3.4 Détermination du site de greffage par Spectrométrie de Masse

Pour vérifier la présence du marqueur sur la protéine, celle-ci a été étudiée en spectrométrie de masse, avec la CP12 non marquée comme référence après réduction et alkylation des cystéines par l'iodoacétamide (incrément de masse de 57 Da pour un résidu cystéine). Les deux échantillons ont d'abord été analysés en masse globale afin de mettre en évidence la présence d'un incrément de masse sur la CP12 marquée. Le composé A de la figure 82 donne un incrément de masse de 168 Da tandis que le composé cyclique B augmenterait la masse de la CP12 de 180 Da. Contrairement à la CP12 sauvage, qui donne un spectre de masse bien résolu, le spectre de la CP12 modifiée par la présence du marqueur montre un massif large dans lequel pourrait se trouver les incréments de masse attendus.

Afin de localiser précisément le site de marquage et donc confirmer la sélectivité de la réaction sur la tyrosine de la CP12, les deux échantillons précédents ont été analysés par MALDI-ToF après digestion tryptique (voir paragraphe 3.10.2). Le traitement des données pour les différents peptides obtenus a montré que l'un d'eux porte l'incrément de masse attendu pour le marqueur greffé, à savoir 180 Da, ce qui correspond au produit B, en accord avec les résultats obtenus sur la tyrosine estérifiée. Ce peptide correspond aux 27 acides aminés de la région C-terminale contenant le résidu tyrosine, séquence confirmée par des

données MS/MS obtenues après fragmentation de l'ion de masse 2999,4 Da. Les réactions de réduction et d'alkylation n'étant pas complètes, ce fragment portant la sonde paramagnétique a été observé avec des formes contenant les cystéines 66 et 75 mono ou bi carbamidométhylées, ainsi que sous forme non réduite non alkylée (figure 85).

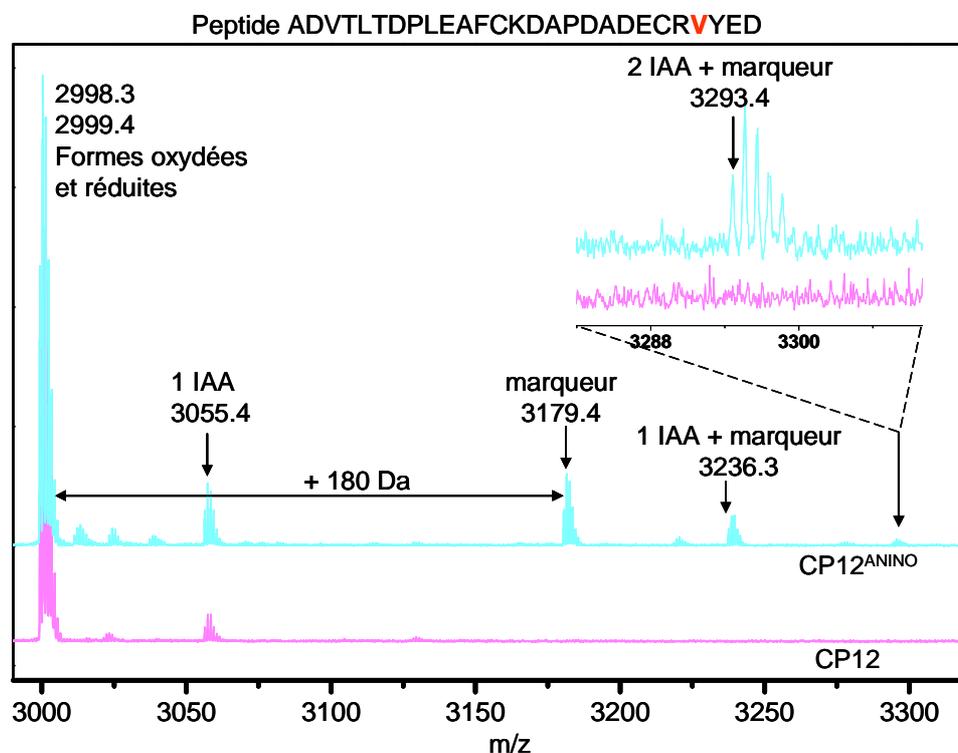


Figure 85 : Spectres MALDI-ToF obtenus après digestion trypsique des échantillons réduits et alkylés de la CP12 non marquée (rose) et de la CP12 marquée (bleu) pour le peptide de 27 acides aminés du domaine C-terminal.

La possibilité que le marqueur puisse être greffé sur les résidus cystéines a été rejetée, car il a été montré qu'elles pouvaient participer à la réaction uniquement dans le cas de pont disulfure réduit [219], une situation qui ne correspond pas à nos conditions expérimentales durant la réaction. De plus, la détection d'une forme marquée doublement carbamidométhylée de la CP12 renforce cette conclusion.

Par ailleurs, il est connu qu'après un long temps de réaction, la réaction de type Mannich peut mener à la modification des résidus tryptophanes [219]. La modification de l'unique tryptophane en position 35 de la CP12 n'a cependant pas été détectée dans nos conditions de réaction.

A partir de ces résultats, on peut donc conclure que la sonde paramagnétique a été greffée sur l'unique tyrosine de la CP12 en position 78. L'incrément de masse de 168 Da

correspondant au produit A (figure 82) n'a été trouvé sur aucun des différents peptides de la CP12 marquée, comme on l'a vu pour la tyrosine estérifiée.

5.3.5 Etude structurale globale de la CP12 marquée

Dans le but de contrôler que les conditions expérimentales de la réaction de type Mannich, et que la présence du marqueur greffé n'ont pas altéré la structure et les propriétés biochimiques de la CP12, des expériences de contrôle ont été réalisées.

A. Gel en condition dénaturante

Pour avoir une meilleure connaissance de la structure globale de la CP12 marquée, un gel dénaturant a été réalisé comme expliqué dans la partie 3.4.2. Cette technique permet d'observer la migration des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. Dans le cas de la CP12, la masse moléculaire apparente est toujours plus grande que la masse réelle à cause du caractère désordonnée de cette protéine.

En ce qui concerne la CP12, on note que suivant son état rédox, elle migre à des positions différentes. En effet, la CP12 réduite (piste 2), avec ses ponts disulfure rompus, migre à une masse apparente plus élevée que la CP12 oxydée (piste 1), avec ses ponts disulfure intacts. La CP12 marquée sur la tyrosine a également été déposée sur ce même gel (piste 3) et les résultats montrent la même migration que la CP12 dans son état oxydé. Lorsqu'elle est incubée avec du DTT qui va réduire les liaisons soufre-soufre (piste 4), la CP12^{ANINO} migre à la même hauteur que la CP12 réduite (figure 86). Ceci est en accord avec les données de masse indiquant l'intégrité des deux ponts disulfure dans la protéine marquée.

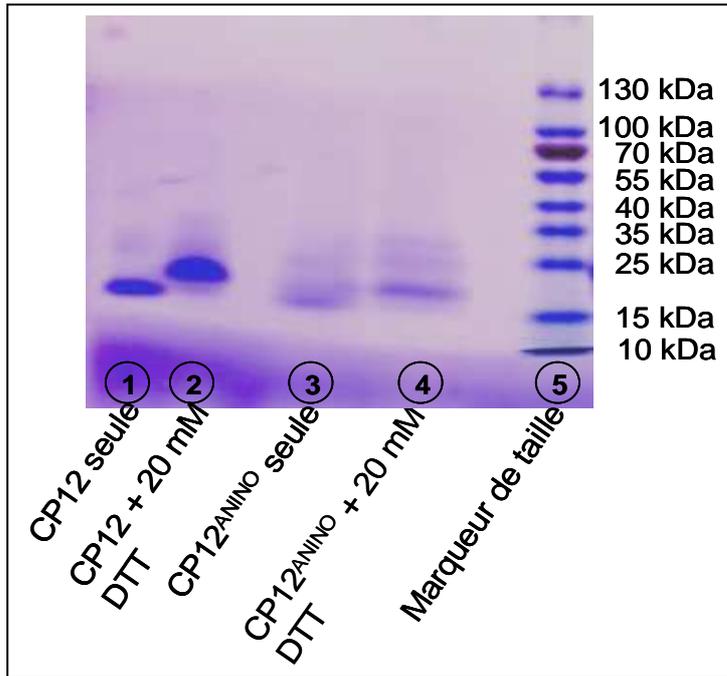


Figure 86 : Gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. 7 μ g de protéines ont été déposés. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 + 20 mM DTT ; 3 : CP12^{ANINO} seule ; 4 : CP12^{ANINO} + 20 mM DTT ; 5 : Marqueur de taille Euromedex (5 μ L).

B. Dichroïsme circulaire (CD)

La technique de dichroïsme circulaire permet de rendre compte de la structure globale d'une protéine. Le CD a donc été utilisé pour analyser la structure globale de la CP12 et de la CP12^{ANINO}.

Les mesures ont été effectuées sur la CP12 sauvage, oxydée ou réduite, et sur la CP12 marquée. On remarque que lorsque la protéine est oxydée, celle-ci est partiellement structurée et comporte une certaine proportion d'hélices α . En revanche, lorsque la protéine est réduite, il n'existe plus aucune structure secondaire, le spectre est caractéristique d'une forme désordonnée. La forme spectrale obtenue pour la CP12 marquée avec ANINO est quant à elle identique à celle de la CP12 oxydée (figure 87). Enfin, l'utilisation d'un solvant organique, le TFE (2,2,2-Trifluoroéthanol), comme stabilisateur de structure d'éléments secondaires sur la CP12 marquée, induit la même augmentation du contenu en hélices α que pour la CP12 non marquée.

En conséquence, le marquage de la CP12 en position 78 n'a eu aucun effet sur sa structure secondaire globale.

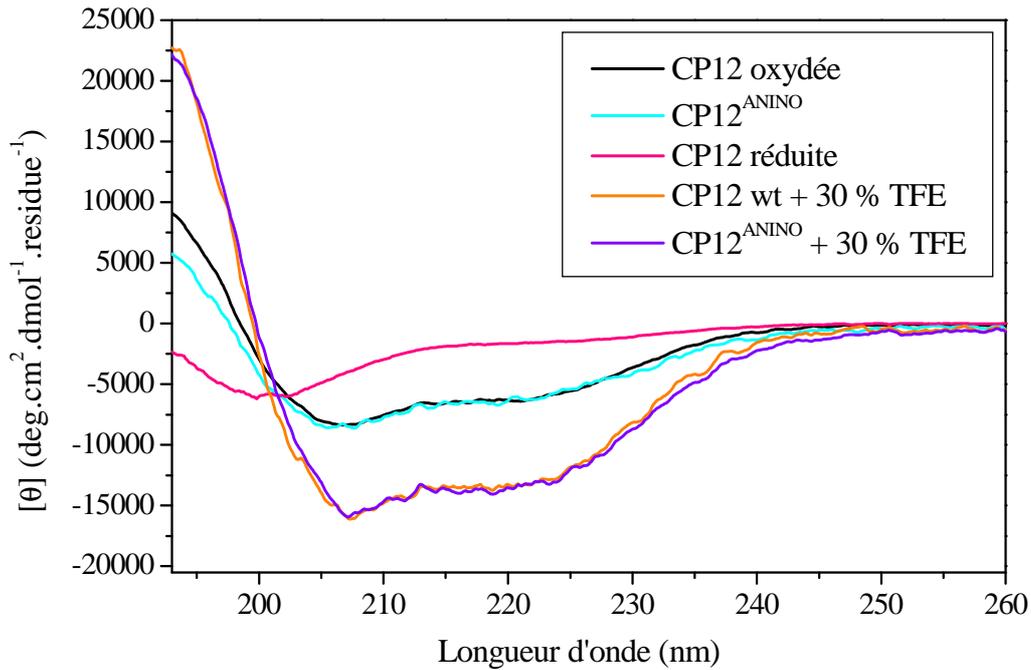


Figure 87 : Spectres CD de la CP12 dans ses deux états rédox, marquée avec ANINO et en présence de 30 % de TFE. Tampon phosphate 10 mM, pH 6, filtré. 10 μ M de protéine dans une cuve de 1 mm de trajet optique.

5.3.6 Activité de la GAPDH en présence de la CP12 marquée avec ANINO

Comme il a été vu précédemment l'activité de la GAPDH en présence de NADPH est inhibée en présence de CP12. Elle a donc été mesurée en présence de CP12 sauvage et de la CP12 marquée ainsi que sans CP12 (figure 88). L'effet inhibiteur de la CP12 non marquée a fait diminuer l'activité NADPH-GAPDH d'un facteur 3 environ tandis que de façon étonnante, cette inhibition est beaucoup plus importante et quasi totale en présence de CP12^{ANINO}, puisqu'il n'y a pratiquement plus d'activité enzymatique.

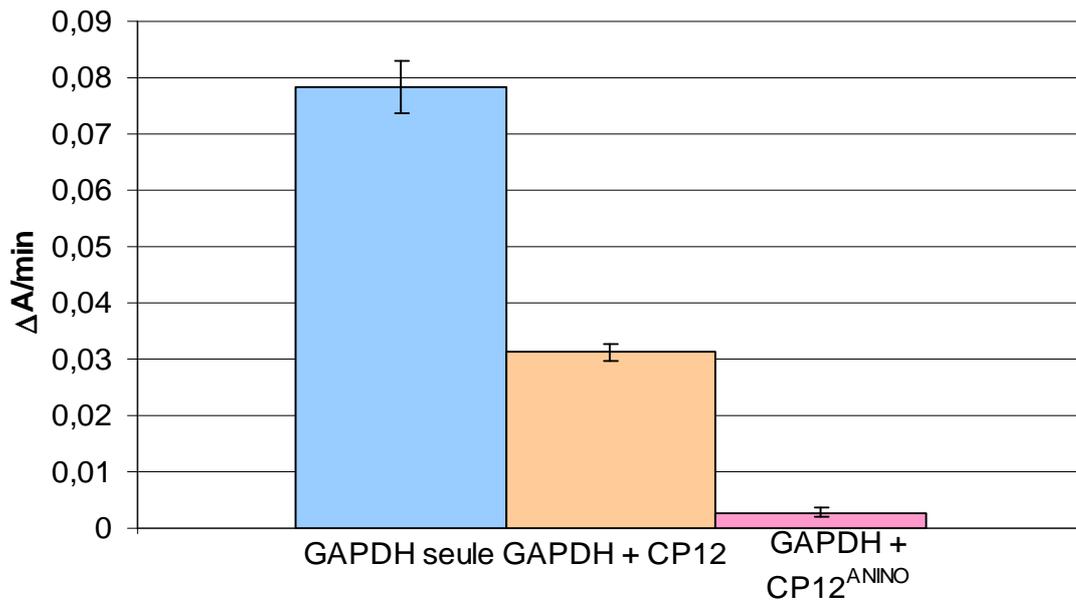


Figure 88 : Effet de la CP12 sur l'activité NADPH-GAPDH. Représentation de la disparition du NADPH au cours du temps ($\Delta A/\text{min}$) pour la GAPDH seule ou en présence de CP12 marquée ou non. Les barres d'erreurs représentent les écarts type obtenus à partir de trois expériences identiques.

5.3.7 Etude de l'interaction CP12^{ANINO}/GAPDH

A. Test de reconstitution

Pour savoir si le complexe est formé, un test de reconstitution a été effectué comme décrit dans le chapitre 3 (paragraphe 3.4.3).

L'expérience contrôle est fait avec de la CP12 sauvage, qui forme le complexe avec la GAPDH [193]. La piste 1 correspond à la CP12 seule qui est reconnue par les anticorps dirigés contre la CP12. La piste 2 correspond à la CP12 et la GAPDH, et dont les anticorps reconnaissent la CP12 au sein du complexe CP12/GAPDH formé. Lorsque la GAPDH est mise en présence de CP12 marquée, le complexe se forme comme le montre la piste 3 (figure 89).

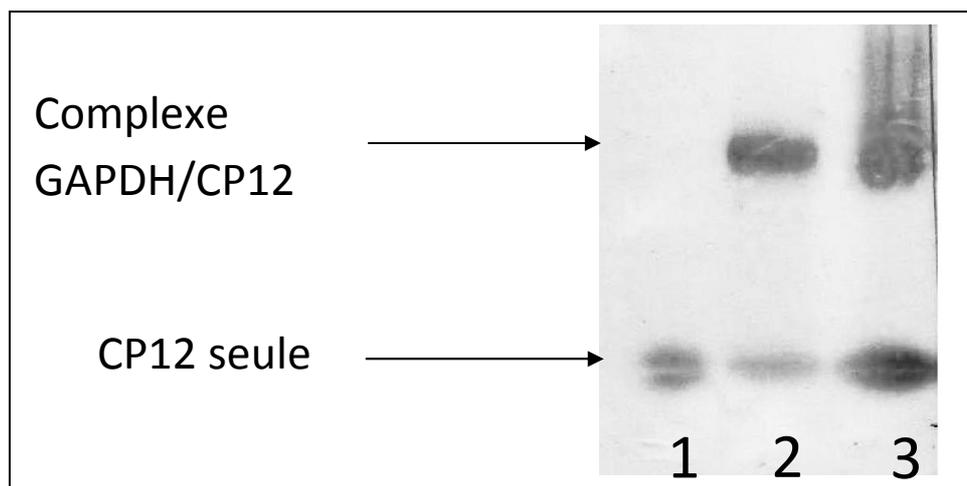


Figure 89 : Immunoempreinte de la reconstitution du complexe GAPDH/CP12. 1 : CP12 sauvage ; 2 : CP12 sauvage avec GAPDH ; 3 : CP12^{ANINO} avec GAPDH.

Ceci nous indique que le marquage sur la tyrosine 78 n'a pas altéré la capacité de la CP12 à former un complexe stable avec la GAPDH.

B. Etude du complexe CP12^{ANINO}/GAPDH par spectroscopie RPE

Quand ils sont greffés sur une protéine, les radicaux nitroxydes donnent un spectre RPE dont la forme dépend de la mobilité de ce radical. Le signal RPE de la CP12 marquée sur la tyrosine est typique d'une sonde paramagnétique ayant une très grande mobilité (figure 90-A). Dans un tel régime de mobilité, le paramètre semi quantitatif le plus sensible pour décrire une variation de mobilité est la mesure du rapport $h(-1)/h(0)$ (voir partie 3.9.1). Une diminution significative de ce paramètre a été observée, passant de 0,83 pour le marqueur libre en solution à 0,67 pour le marqueur greffé (figure 90-A). La simulation des spectres RPE (figure 90-B) a montré une augmentation du temps de corrélation de rotation τ_c de 0,060 à 0,125 ns. Pour de si petites protéines (8,5 kDa), la contribution de la rotation de la protéine sur la forme spectrale en RPE n'est pas négligeable. Pour éliminer cette contribution, 30 % de saccharose a été utilisé comme agent de viscosité pour augmenter le temps de corrélation de rotation de la protéine. Cet ajout n'a aucune influence sur la mobilité du radical classique MTSL en solution [118, 149]. Il a été vérifié qu'il en était de même sur le marqueur ANINO. Comme attendu, une diminution significative du rapport $h(-1)/h(0)$ a été observée suite à l'ajout du sucrose sur la CP12^{ANINO} : de 0,67 à 0,54 (figure 90-A), correspondant à une augmentation du τ_c de 0,125 à 0,225 ns, ce qui montre que le radical observé est bien greffé sur la CP12. La mobilité relativement élevée de la sonde greffée

localisée à la fin du domaine C-terminal confirme la non-structuration, et ainsi la très haute flexibilité de ce segment en accord avec le modèle structural proposé par Gardebien *et al* (figure 62).

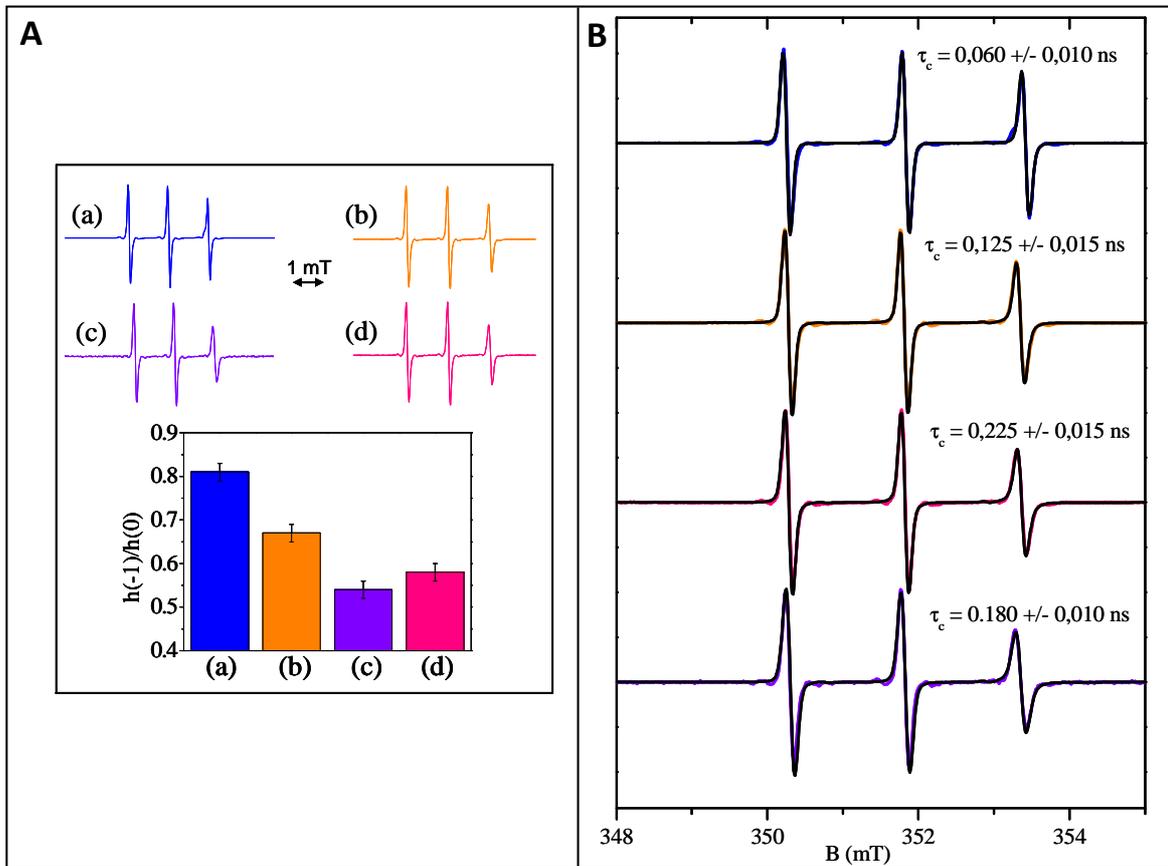


Figure 90 : (A) Spectres RPE normalisés à l'amplitude de la raie centrale enregistrés à 296 (1) K du radical libre (a), greffé sur la protéine (b), en présence de 30 % de saccharose (c), et complexé au partenaire, la GAPDH (d). Les rapports $h(-1)/h(0)$ de chacun des spectres sont représentés sur le graphique. (B) Spectres RPE simulés (en couleur) avec le logiciel EasySpin [109] superposés aux spectres expérimentaux (noir). Les temps de corrélation résultant des simulations sont donnés.

L'introduction de la protéine partenaire GAPDH, dans un rapport équimolaire avec la CP12^{ANINO}, induit une faible mais significative modification de la forme du spectre RPE avec une diminution du rapport $h(-1)/h(0)$ de 0,67 sans partenaire, à 0,58 en présence de la protéine partenaire (figure 90-A) et un τ_c passant de 0,125 à 0,180 ns. Du fait du haut poids moléculaire du complexe CP12/GAPDH (supérieur à 150 kDa), la mobilité de l'ensemble ne contribue pas à la forme du spectre RPE. La diminution du rapport observé peut aussi être attribuée à l'annulation de la contribution de la rotation de la protéine plutôt qu'à un

changement local dans l'environnement de la sonde, puisqu'une diminution similaire de mobilité est observée avec le saccharose (figure 90-A). Ce résultat indique que la région C-terminale où le marqueur est greffé reste très flexible dans le complexe, et que le résidu 78 n'est pas directement impliqué dans le site d'interaction entre les deux partenaires.

5.3.8 Discussion

Une nouvelle stratégie a été mise en place pour pouvoir marquer des résidus autres que les cystéines. Le choix s'est porté sur les tyrosines, la CP12 n'en possédant qu'une seule naturelle, la construction d'un mutant n'était donc pas nécessaire. La réaction mise en jeu pour ce nouveau marquage a été inspirée par les travaux de McFarland [219], et est basée sur une réaction de Mannich à trois composants : le marqueur, le formaldéhyde et la protéine. Le taux de marquage obtenu a été très satisfaisant, 70 %, et laissait supposer qu'un seul résidu était marqué.

Pour vérifier qu'un seul résidu était marqué, des études en spectrométrie de masse ont été réalisées. La masse globale a permis de montrer la présence d'un seul incrément de masse attendu, et l'analyse des peptides après digestion trypsique a confirmé la présence du marqueur sur la tyrosine naturelle sous une forme cyclisée.

Des analyses par spectrométrie CD et biochimiques ont été réalisées afin de caractériser la CP12 marquée notée CP12^{ANINO}.

La CP12 et la CP12^{ANINO} ont été déposées sur gel avec ou sans réducteur, le DTT. En présence de DTT, la protéine est sous forme réduite, sans aucun pont disulfure, et migre à une masse moléculaire apparente de 20 kDa. Sans réducteur, la protéine est oxydée et possède donc des ponts disulfure. Dans cet état, elle migre à une masse de 15 kDa et on observe une migration identique de la CP12^{ANINO} ce qui est en accord avec les données de masse indiquant la présence des deux ponts disulfure.

Pour la CP12, les analyses CD montrent que lorsque ses ponts intramoléculaires sont formés (C23-C31 et C66-C75), la protéine possède une certaine proportion en hélices α , tandis que lorsque ses ponts sont rompus, la protéine est complètement désordonnée. Lors de l'analyse CD, il a été montré que la CP12^{ANINO} contenait des hélices α en proportion équivalente à la CP12. On a donc une structure globale identique entre la CP12 et la CP12 marquée (figure 91).

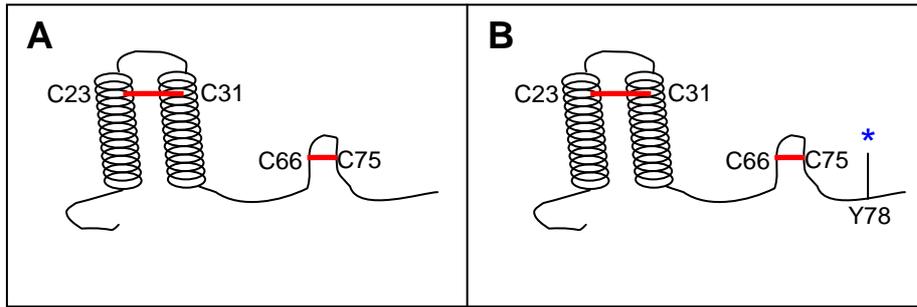


Figure 91 : Schéma de la structure secondaire de la CP12 (A) et de la CP12 marquée avec ANINO (B). Les deux CP12 possèdent une paire d'hélices α et un pont disulfure dans le domaine N-terminal ainsi qu'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal.

L'activité de la GAPDH vis-à-vis de son cofacteur, le NADPH, a été contrôlée. La CP12 a la propriété d'inhiber cette activité en la faisant diminuer du tiers. Il a été montré que la CP12^{ANINO} induisait également une inhibition quasi-totale de l'activité GAPDH. On peut attribuer cette forte diminution d'activité à la position du marqueur, celui-ci se trouvant à la fin de la séquence de la CP12, qui pourrait bloquer l'accès au site actif par une gêne stérique, et empêcher le fonctionnement de la GAPDH. En effet, il a été montré que le résidu D80, dernier résidu de la séquence de la CP12, empêcherait l'entrée du cofacteur dans le site actif en bloquant son accès en présence du pont disulfure C-terminal, et le laisserait accéder au site actif lorsque la CP12 est dans son état réduit [203].

Ces vérifications effectuées, la formation du complexe entre la CP12^{ANINO} et la GAPDH a été testée. Un test de reconstitution a donc été réalisé et a montré que la CP12 marquée était toujours capable de former un complexe stable avec la GAPDH.

Hormis cette modification de l'activité GAPDH, l'ensemble de ces contrôles montre que la CP12 garde son intégrité structurale et sa capacité à former un complexe avec la GAPDH, malgré des conditions de marquage utilisant une incubation dans le formaldéhyde pendant 16 heures.

Enfin, l'interaction de la CP12^{ANINO} avec son partenaire a été étudiée en RPE. Une faible mais significative diminution du rapport $h(-1)/h(0)$, témoin de la mobilité du radical, a été notée. Cette diminution étant similaire à celle observée pour la protéine en présence de saccharose, ceci indique que la diminution du rapport n'est pas due à un changement local dans l'environnement de la sonde, mais plutôt à un alourdissement de la protéine indiquant que la région C-terminale où se trouve le marqueur reste très flexible, et n'est pas directement impliquée dans le site d'interaction des deux partenaires.

Ce travail montre pour la première fois qu'une sonde paramagnétique peut être greffée sur un résidu tyrosine d'une protéine. En plus de démontrer la faisabilité d'un tel type de greffage, cette approche étend les capacités de cette technique et ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de protéines portant des cystéines fonctionnelles [222].

5.4 Etude des mutants de la CP12

5.4.1 Marquage des mutants C31S, C23S et C66S avec la sonde MTSL

On a vu précédemment que le marquage de la CP12 avec la sonde MTSL se faisait sur les cystéines du domaine C-terminal, c'est-à-dire sur les positions 66 et 75. Les différentes expériences ont montré que la protéine marquée avec le MTSL était déstructurée mais que son pont N-terminal était maintenu, qu'elle n'avait aucun effet sur l'activité de la GAPDH, que le complexe CP12/GAPDH n'était pas formé et que la GAPDH venait rompre les liaisons cystéine-MTSL libérant les marqueurs.

Pour améliorer nos connaissances sur l'interaction de la CP12 avec la GAPDH, une étude a été menée sur deux mutants sérine de la CP12 (C23S et C66S) qui étaient disponibles, afin de voir l'impact qu'ils pourraient avoir sur la formation de ce complexe [205]. L'ensemble des expériences a été réalisé sur le C23S et le C66S pour caractériser deux positions différentes sur les deux différents ponts. L'effet de la GAPDH a également été étudié sur les mutants marqués. En plus de ces deux mutants, un troisième mutant sérine était disponible, le C31S. Cette position a uniquement été étudiée en RPE pour vérifier l'effet de la GAPDH sur la libération des marqueurs.

Le mutant C23S diffère de la CP12 sauvage par la présence d'un résidu sérine à la place d'un résidu cystéine en position 23, le mutant C31S qui résulte de la mutation de la cystéine en position 31 située dans la deuxième hélice, tandis que pour le mutant C66S, c'est la cystéine en position 66 qui a été mutée. Le marquage de ces trois protéines a été réalisé avec le MTSL sans étape de réduction au DTT et avec un rapport molaire de 1 : 5 (protéine : MTSL), pour garder le pont C-terminal, pour le C23S et le C31S, et le pont N-terminal, pour le C66S, intact. Le spectre RPE de chacun des trois mutants (figure 92) a été enregistré et le taux de marquage a été déterminé, donnant dans les trois cas 85 % de marquage \pm 20 %. Ces résultats suggèrent que les protéines sont monomarquées, ce qui est confirmé par la spectrométrie de masse qui montre un marquage majoritaire sur la cystéine 31 pour le mutant C23S et sur la cystéine 75 pour le C66S.

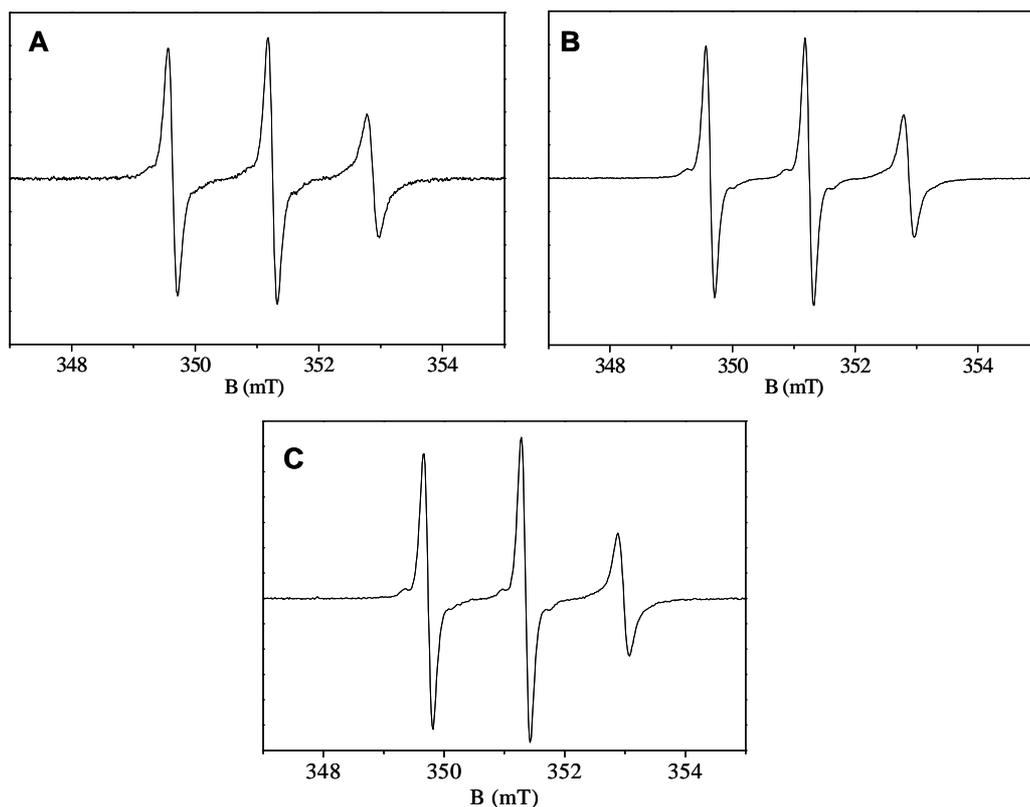


Figure 92 : Spectres RPE des deux mutants CP12 marqués avec la sonde MTSL à température ambiante. A : Mutant C23S^{MTSL} à 47,5 μM, B : Mutant C66S^{MTSL} à 161 μM, C : Mutant C31S^{MTSL} à 150 μM.

Ces deux mutants ont ensuite été étudiés par dichroïsme circulaire pour obtenir des informations sur leur structure globale. Les mesures ont été réalisées sur les mutants marqués et non marqués. Pour le mutant C23S, avec ou sans MTSL, le profil spectral enregistré est le même que celui de la CP12 réduite c'est-à-dire dépourvu de structure secondaire (figure 93-A). En ce qui concerne le mutant C66S, les résultats sont différents. Le C66S non marqué et le C66S^{MTSL} sont structurés et possèdent des hélices α comme la CP12 oxydée (figure 93-B). Comme vu précédemment, le TFE a un effet stabilisateur sur les hélices α . Une expérience a donc été réalisée pour essayer de reformer les hélices du C23S^{MTSL}. Une restructuration du mutant marqué est observée à partir de 10 % de TFE (figure 93-C) tandis qu'on observe un gain de structure α -hélicale pour le mutant C66S^{MTSL} dès 10 % de TFE (figure 93-D).

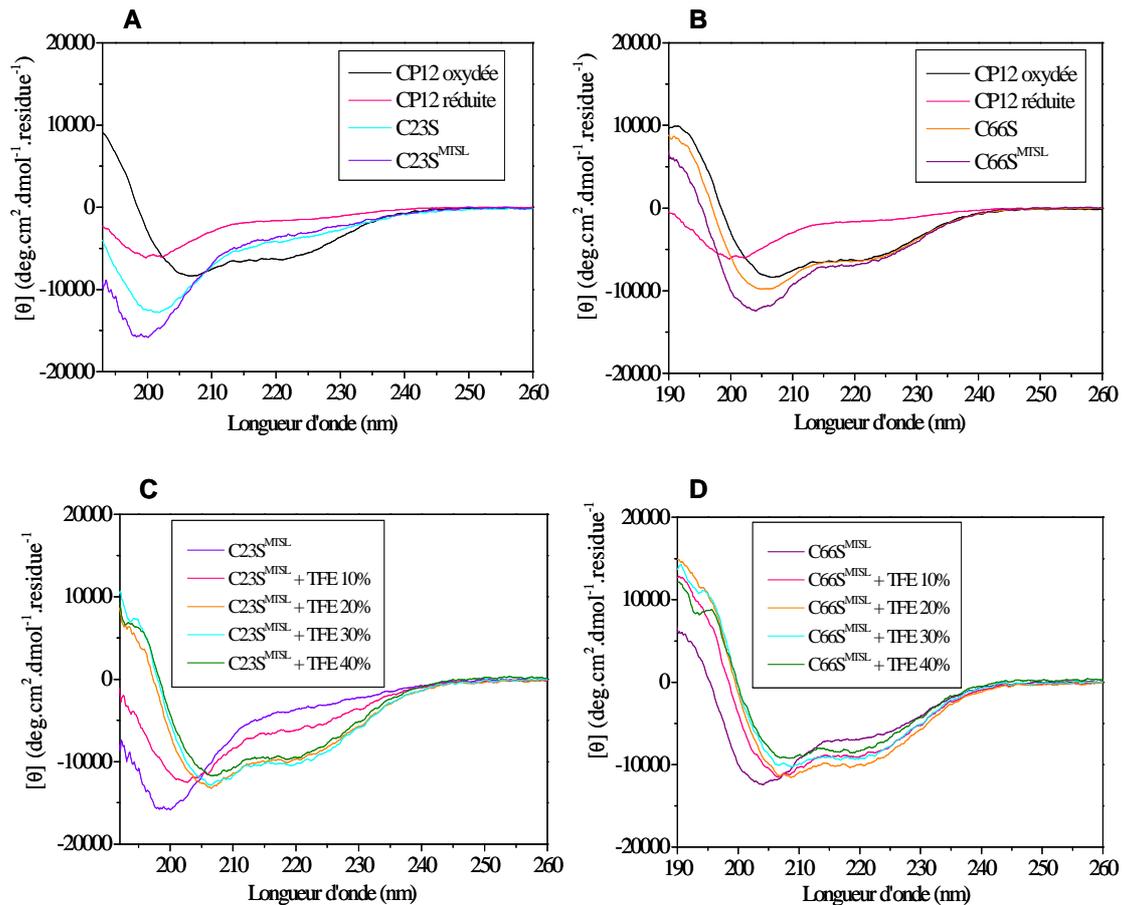


Figure 93 : Spectres CD de la CP12 dans ses deux états rédox, du mutant C23S marqué avec la sonde MTSL ou non (A) et du mutant C66S marqué avec la sonde MTSL ou non (B). Spectres CD du C23S^{MTSL} en absence ou en présence de TFE (C) et du C66S^{MTSL} en absence ou en présence de TFE (D). Tampon phosphate 10 mM, pH 8, filtré. 10 μ M de protéine dans une cuve de 1 mm de trajet optique.

Les résultats obtenus en RPE et en CD peuvent être illustrés par la figure 94.

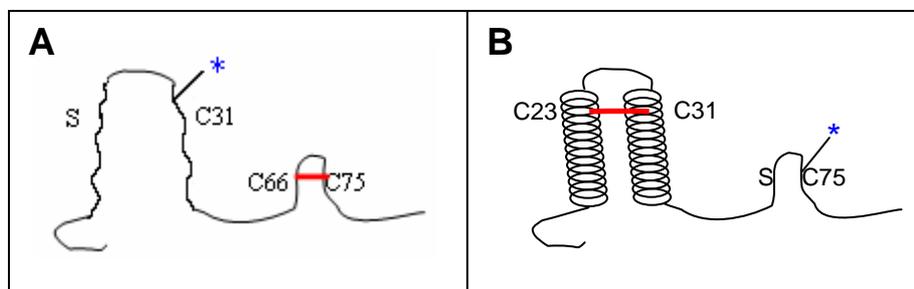


Figure 94 : Illustration de la position du marqueur et des structures globales des mutants marqués. A : Mutant CP12-C23S^{MTSL} dépourvu d'hélices α , B : Mutant CP12-C66S^{MTSL} avec présence des 2 hélices.

Après avoir analysé la structure secondaire des deux mutants, chacun d'eux, ainsi que le mutant C31S^{MTSL}, a été mélangé avec la GAPDH en quantité stoechiométrique 1 : 1 (1 monomère de CP12 : 1 tétramère de GAPDH). L'évolution de l'interaction de chacun des trois complexes potentiels, C23S/GAPDH, C31S/GAPDH et C66S/GAPDH, a été suivie par RPE. Comme décrit dans la partie 5.2.3, le même phénomène de libération du marqueur est observé pour les trois mutants étudiés (figure 95). Le comportement cinétique du C23S^{MTSL} et du C66S^{MTSL} est le même que celui de la CP12^{MTSL}, avec un temps caractéristique de libération τ similaire pour les trois protéines. Preuve que la GAPDH a la même action sur les mutants que sur la CP12 sauvage. Le temps caractéristique plus long obtenu pour le mutant C31S^{MTSL} est dû à l'utilisation d'une GAPDH dialysée qui a perdu de son efficacité.

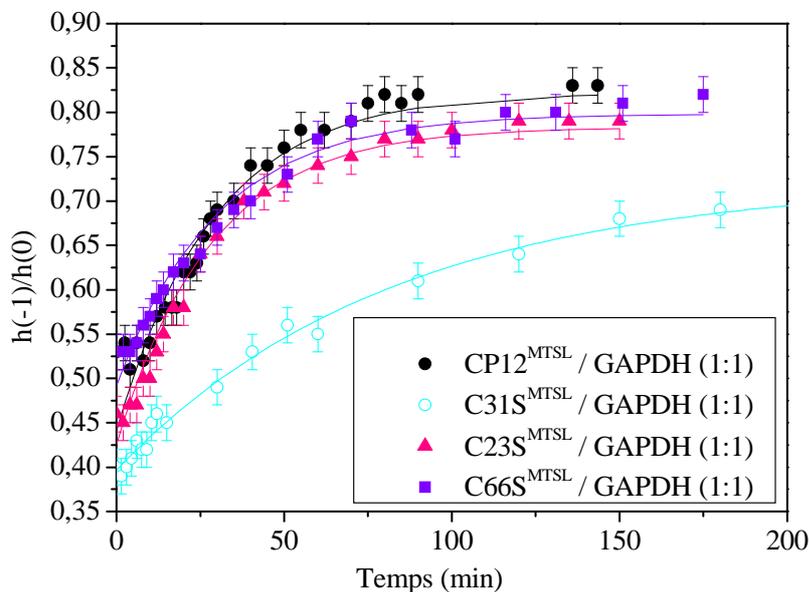


Figure 95 : Cinétique de libération du MTSL de la CP12^{MTSL}, du C23S^{MTSL}, du C31S^{MTSL} et du C66S^{MTSL} par la GAPDH avec un temps caractéristique de libération τ similaire pour les protéines CP12^{MTSL}, C23S^{MTSL} et C66S^{MTSL} de l'ordre de 30 minutes. Le τ du mutant C31S^{MTSL} est de l'ordre de 80 minutes. Ce temps plus long est dû à l'utilisation d'une GAPDH dialysée qui a pu perdre de son efficacité.

Afin de savoir si chacun des deux mutants étaient encore capables de former un complexe avec la GAPDH, un test de reconstitution a été réalisé pour identifier les interactions éventuelles du C23S et du C66S avec l'enzyme (cf paragraphe 3.4.4). Les résultats ont montré que le mutant C66S de même que le mutant C66S^{MTSL} ne formaient pas le complexe. En revanche, la révélation de la membrane a permis de voir que la GAPDH et le mutant C23S s'associe, ainsi que pour la GAPDH et le C23S^{MTSL} (figure 96).

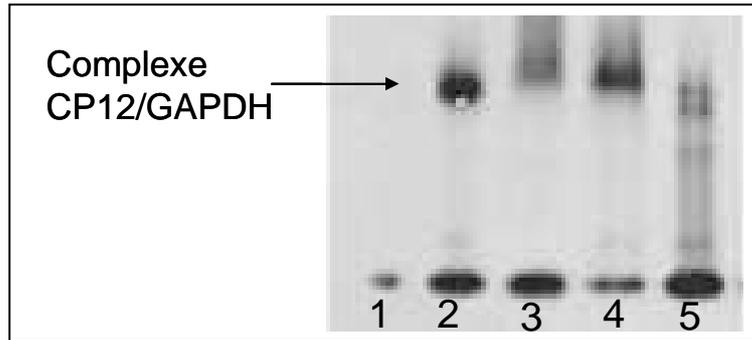


Figure 96 : Immunoempreinte de la reconstitution du complexe GAPDH/CP12. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 avec GAPDH ; 3 : C23S avec GAPDH ; 4 : C23S^{MTSL} avec GAPDH ; 5 : C66S avec GAPDH.

5.4.2 Marquage des mutants C23S et C31S avec la sonde Proxyl

On vient de voir que la sonde MTSL ne permettait pas d'observer l'interaction CP12/GAPDH à cause de la libération du marqueur par la GAPDH. A partir de ces résultats, une nouvelle direction a pu être explorée : l'utilisation d'un marqueur ne formant pas de liaison S-S. Il s'agit du 3-maleimido-proxyl qui forme une liaison carbone-soufre avec les cystéines. Cette liaison bloque donc la libération du marqueur par la GAPDH, comme vu dans la partie 5.2.3 avec la CP12, et permet d'étudier l'interaction entre les deux protéines. Les positions choisies pour ce marquage sont les cystéines 23 et 31 du pont N-terminal. Ces positions n'ont pas été étudiées dans le cas de la CP12 car seules les positions 66 et 75 sont marquées. De plus, ces positions sont à proximité de la région suggérée comme région d'interaction [205, 208]. Ces deux mutants ont été marqués avec le 3-maleimido-proxyl selon le même protocole que pour le marquage au MTSL du C23S et du C66S. Les différentes fractions récoltées sont analysées en RPE. On obtient alors un profil spectral caractéristique d'une sonde paramagnétique se trouvant dans un régime de mobilité rapide (figure 97) (cf paragraphe 2.1.3). Après avoir déterminé la concentration des échantillons par le test de Bradford, on trouve un taux de marquage de 75 % ± 20 % pour le C23S, et de 40 % ± 20 % pour le C31S.

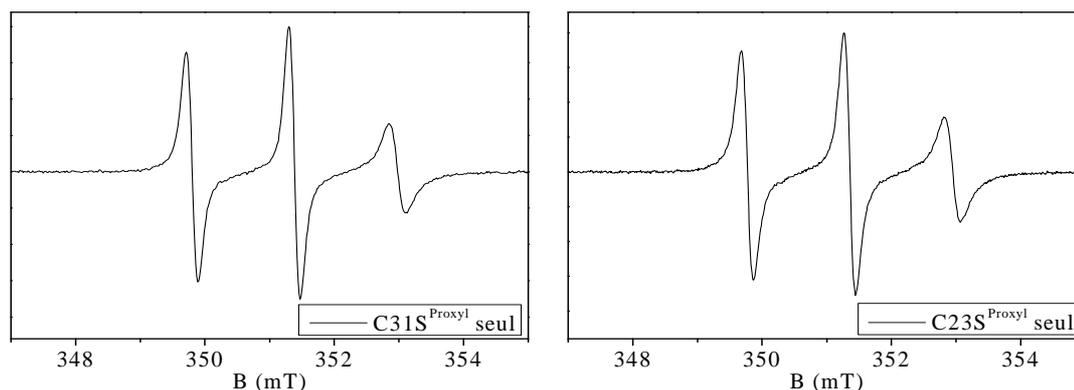


Figure 97 : Spectres RPE des mutants C23S et C31S marqués avec la sonde 3-maleimido-proxyl.

5.4.3 Analyses des espèces marquées par spectrométrie de masse

Pour déterminer si les sites de fixation des sondes paramagnétiques sont bien aux positions attendues, les deux mutants marqués ont été étudiés en spectrométrie de masse.

En ce qui concerne le mutant C23S, lors de l'analyse en masse globale, le spectre obtenu montre un signal intense et large de plusieurs pics de $[M+H]^+$. L'incrément de masse attendu peut donc être contenu dans ce massif. Ainsi, après digestion trypsique, il a pu être montré que les peptides contenant la cystéine 31 portaient bien le marqueur, puisqu'une augmentation de masse de 237 Da de ces fragments a été détectée.

Le mutant C31S a été analysé de la même manière que le C23S. Mais au contraire de ce dernier, le spectre de masse globale de la protéine mutée en C31 est très bien résolu et on observe parfaitement un pic à 11205 Da ce qui correspond à la masse expérimentale de la CP12 sauvage (10967,7 Da) incrémentée de la masse de la sonde greffée (237 Da). En revanche, l'analyse des peptides après digestion trypsique n'a pas révélé la présence du marqueur. Mais comme la présence du marqueur a été détectée en masse globale, et seulement la masse d'un marqueur, on peut supposer que celui-ci soit bien greffé sur la cystéine en position 23.

5.4.4 Caractéristiques structurales et fonctionnelles des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl}

A. Electrophorèse en conditions dénaturantes

Un gel dénaturant est réalisé pour déterminer l'effet du marquage sur les propriétés de migration des deux mutants (figure 98).

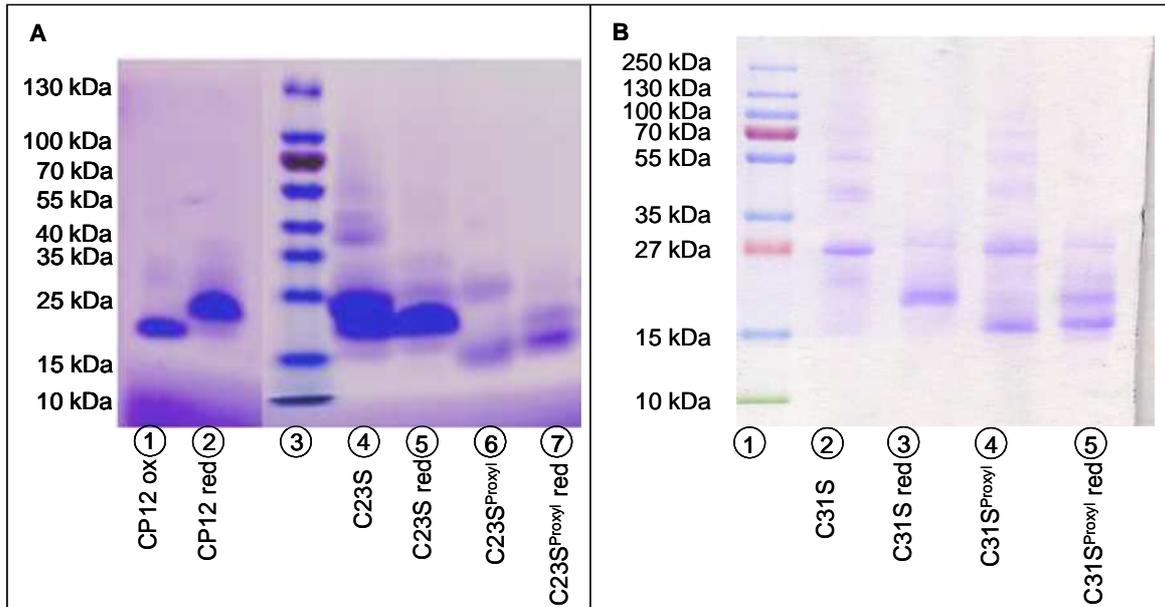


Figure 98 : Gel SDS-PAGE 12 % des mutants C23S et C31S. (A) Mutant C23S. 1 : CP12 rec wt ; 2 : CP12 rec wt + 20 mM DTT final ; 3 : Marqueur de taille ; 4 : C23S non marqué ; 5 : C23S non marqué + 20 mM DTT final ; 6 : C23S^{Proxyl} ; 7 : C23S^{Proxyl} + 20 mM DTT final. 7 μ g de protéines sont déposés. (B) Mutant C31S. 1 : Marqueur de taille ; 2 : C31S non marqué ; 3 : C31S non marqué + 20 mM DTT final ; 4 : C31S^{Proxyl} ; 5 : C31S^{Proxyl} + 20 mM DTT final. 5 μ g de protéines déposées sur le gel.

On a vu précédemment que la CP12 sauvage migrait à deux positions différentes selon son état rédox. En effet, elle possède une migration plus haute sur gel lorsqu'elle est réduite (masse apparente = 20 kDa), alors qu'elle migre à une taille apparente plus petite (16 kDa) quand elle possède ses ponts disulfure. Il a été montré que cette différence de migration était due à la présence ou non du pont N-terminal [209]. En effet, lorsque la CP12 est marquée au MTSL, seul le pont N-terminal est formé. Or, celle-ci a un comportement sur gel identique à la CP12 oxydée. Lorsqu'on ajoutait du DTT, elle migrait à une taille apparente de 20 kDa car le pont N-terminal était alors rompu [209].

On comprend donc pourquoi le mutant C23S a une migration identique à la CP12 réduite, puisque celui-ci ne possède plus le pont disulfure N-terminal du fait de la mutation de la cystéine 23 en sérine. Quelques oligomères sont également présents et peuvent être dus au temps écoulé depuis la purification de la protéine. En revanche, on remarque que le mutant C23S marqué semble avoir une migration identique à celle de la CP12 oxydée (piste 6). Ce comportement peut être attribué au proxyl, car la seule différence entre le mutant C23S et le C23S* est la présence du marqueur.

Le mutant C31S a lui aussi un comportement atypique. En effet, la cystéine 23 dimérise aussi facilement que la 31, ce qui explique la bande à 27 kDa pour la piste 2, que l'on retrouve sur la piste 4. On trouve également une bande à 20 kDa sur les pistes 3 et 5 qui correspond à la taille de la CP12 réduite. La protéine marquée, comme pour le C23S^{Proxyl}, migre à une taille inférieure (environ 15 kDa) que celle de la CP12 sauvage réduite. Ce qui renforce l'hypothèse que cette migration est due à la présence du 3-maleimido-proxyl.

En conclusion, la CP12 a des propriétés de migration sur gel très différentes suivant son état rédox et sa mutation. Les mutants C23S et C31S ont tendance à s'oligomériser avec le temps. Enfin, la présence du proxyl implique vraisemblablement des modifications de migration.

B. Etude par Dichroïsme Circulaire

Les deux mutants ont été étudiés par spectrométrie CD afin de voir si le C31S avait le même caractère désordonné que le C23S. Les protéines marquées ont également été analysées pour confirmer que le marquage n'a eu aucune influence sur la structure globale.

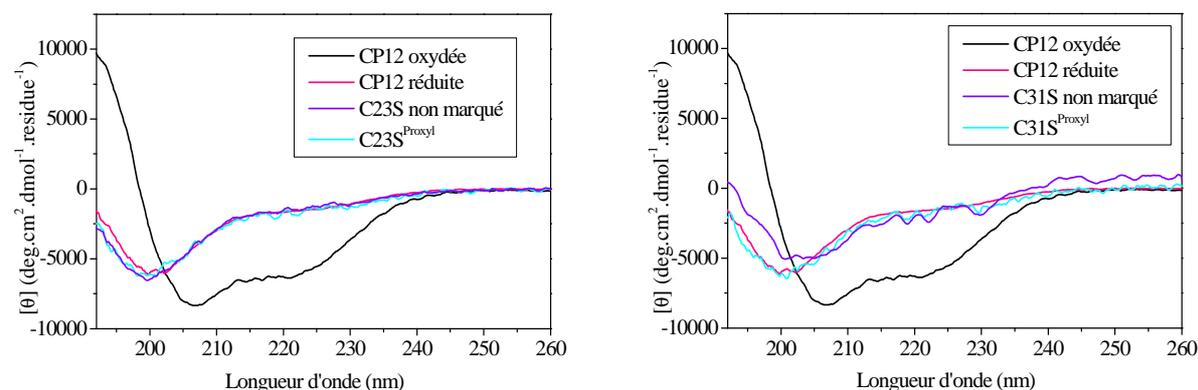


Figure 99 : Spectres CD des mutants C23S et C31S non marqués et marqués ainsi que de la CP12 dans ses deux états rédox. 10 μM de protéine ont été utilisés pour chaque expérience. Tampon phosphate 10 mM, pH 6, filtré. Cuve de 1 mm de trajet optique.

Comme le montre la figure 99, les mutants C23S et C31S de la CP12 ont des spectres similaires à la CP12 réduite c'est-à-dire qu'ils sont déstructurés. Les mutants marqués possèdent le même profil spectral que les protéines non marquées, celui d'une protéine désordonnée. La mutation a donc induit la perte de structure secondaire des protéines et l'ajout du marqueur n'a eu aucune influence.

C. Activité enzymatique de la GAPDH en présence des mutants C23S et C31S marqués ou non

Après la modification de la CP12 sauvage, l'effet des protéines mutées et mutées marquées sur l'activité de la GAPDH vis-à-vis du NADPH a été mesuré.

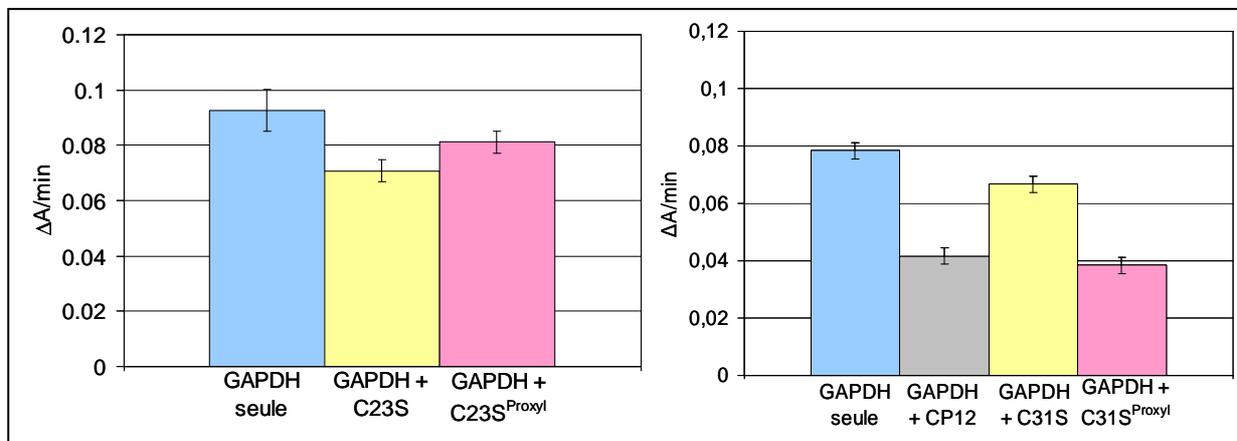


Figure 100 : Effet des mutants C23S et C31S marqués ou non sur l'activité NADPH-GAPDH. 5 μ M de protéines sont utilisées pour chaque test. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de la moyenne de trois mesures réalisées dans des conditions identiques.

Pour la CP12, on observe une inhibition de l'activité de la GAPDH d'environ 50 % (figure 100). Les mutants non marqués C23S et C31S provoquent une plus faible diminution de l'activité GAPDH, de 24 % et de 15 % respectivement. Par contre, les différentes protéines marquées ont des comportements très différents. Pour le C23S^{Proxyl}, on observe une perte d'activité moins importante que le C23S (12 %) ce qui pourrait être dû à la présence de la sonde. En revanche, le mutant C31S^{Proxyl} a un comportement identique à la CP12 sauvage malgré le fait que la protéine soit marquée. On peut supposer qu'il y a moins de gêne stérique lorsque la cystéine 23 est marquée. Malgré tout, ce mutant n'étant marqué qu'à 40 %, il est difficile de savoir si ce résultat est attribuable au C31S marqué ou au C31S non marqué ou aux deux.

D. Electrophorèse en conditions natives et immunoempreinte

Pour vérifier la formation d'un complexe stable entre les deux partenaires, des mélanges de GAPDH et des différents mutants ont été chargés sur un gel natif en utilisant un test de reconstitution *in vitro* comme vu précédemment (cf paragraphe 3.4.3) (figure 101).

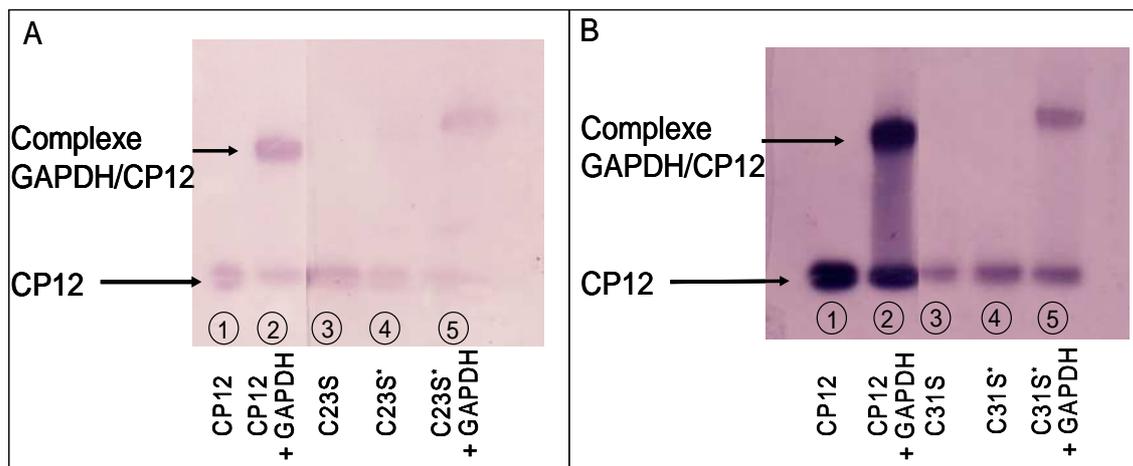


Figure 101 : Analyse de la formation du complexe GAPDH-CP12 par reconstitution in vitro. (A) Immunoempreinte pour le mutant C23S. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 + GAPDH ; 3 : C23S seule ; 4 : C23S* seul ; 5 : C23S* + GAPDH. (B) Immunoempreinte pour la protéine C31S. 1 : CP12 seule ; 2 : CP12 + GAPDH ; 3 : C31S seule ; 4 : C31S* ; 5 : C31S* + GAPDH. Les mélanges CP12/GAPDH ont été faits avec un rapport molaire de 1 : 3 (CP12 : GAPDH) pour les deux tests. (*) = 3-maleimido-proxyl.

En utilisant la CP12 non marquée, la présence du complexe a été détectée (pistes 2). Pour les deux mutants, on obtient des résultats identiques entre eux et similaires à ceux de la CP12 sauvage, mais dès lors que la CP12 est mélangée à la GAPDH un complexe stable est détecté quelque soit la forme de la protéine, mutée ou non, marquée ou non. Il est à noter tout de même que lorsqu'il s'agit des mutants marqués, ceux-ci migrent à une masse plus élevée que celle de la CP12 sauvage, ce qui peut être expliqué par la présence du marqueur. Les expériences montrent que pour chaque mutant marqué ou non le complexe GAPDH/CP12 se forme.

5.4.5 Etude de l'interaction des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} en RPE

A. Faible évolution des spectres RPE en présence de GAPDH

Une fois les différents contrôles biochimiques et spectroscopiques réalisés, les deux mutants marqués sont analysés en spectroscopie RPE en présence de leur partenaire, la GAPDH. Chacun d'eux a été mélangé avec la GAPDH en quantité stoechiométrique 1 : 1 (1 monomère de CP12 : 1 tétramère de GAPDH).

Comme le montre la figure 102, on observe un faible effet de la GAPDH sur les spectres RPE, effet équivalent à celui du saccharose sur ces protéines, effet que l'on peut par conséquent attribuer à un alourdissement de l'édifice. Quantitativement, on passe d'un rapport $h(-1)/h(0)$ de 0,40 (C23S^{Proxyl} seul en solution) à 0,32 (C23S^{Proxyl} en présence de GAPDH) dans le cas du mutant C23S^{Proxyl} et de 0,33 pour le mutant C31S^{Proxyl} seul à 0,30 lors de l'ajout de la GAPDH. L'incertitude sur les rapports de raies étant de 0,02, on a donc une diminution du rapport $h(-1)/h(0)$ significative dans le cas du C23S^{Proxyl} et non significative pour le C31S^{Proxyl}.

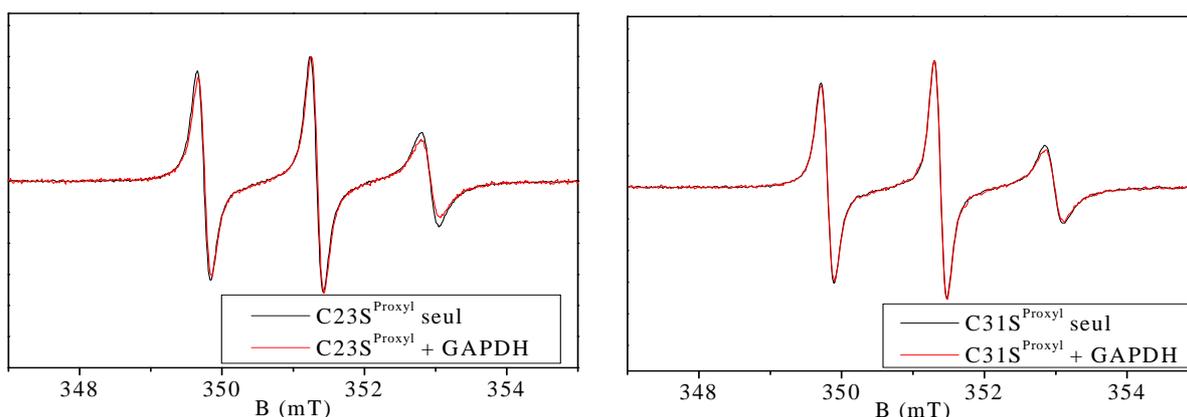


Figure 102 : Effet de la GAPDH sur les mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl}. Les spectres RPE ont été normalisés à l'amplitude de la raie centrale.

B. Protection par la GAPDH de l'attaque du DTT sur le marqueur de chaque mutant

Il a été montré dans une précédente étude [205] que seule la présence du substrat (BPGA) et du DTT permet de dissocier le complexe GAPDH/CP12. Afin de vérifier si l'effet observé en RPE lors de l'ajout de la GAPDH résulte de la formation du complexe, une première expérience a été réalisée avec du DTT à 5 mM final, puis une deuxième en ajoutant du BPGA au mélange mutants marqués/GAPDH/DTT.

Dans un premier temps, les deux mutants ont été étudiés seuls en présence de DTT. Le DTT est un agent réducteur qui agit sur le radical nitroxyde en le réduisant en hydroxylamine ($\text{NO}^\bullet \rightarrow \text{NOH}$) conduisant à la disparition progressive du signal RPE. A $t = 0$ min, le DTT est ajouté au mutant à une concentration finale de 5 mM. On suit ensuite la cinétique de disparition du signal en mesurant l'amplitude de la raie centrale toutes les deux minutes (figure 103). Pour le mutant C23S^{Proxyl} et le mutant C31S^{Proxyl}, on a une disparition du signal complète à environ 35 minutes avec un temps caractéristique de disparition du

marqueur, qui correspond au temps écoulé pour atteindre une amplitude de 0,5 de 25 minutes environ.

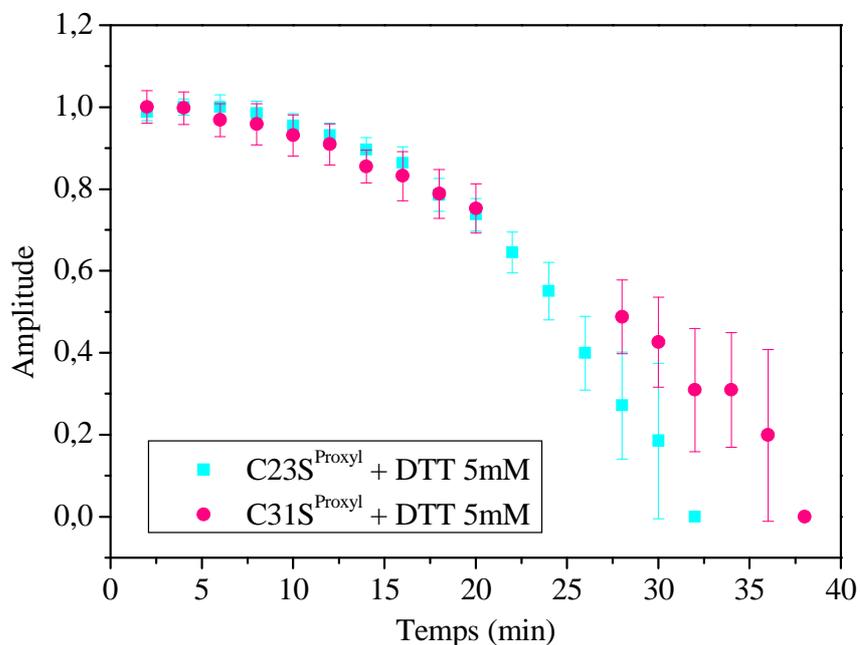


Figure 103 : Disparition du signal RPE pour les mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} après ajout de 5 mM de DTT. L'amplitude correspond à la mesure pic à pic de la raie centrale et elle est normalisée à 1 à t = 0.

Les mélanges protéines marquées/GAPDH tétramérique ont ensuite été réalisés, toujours dans un rapport molaire de 1 : 1. Une fois le mélange fait, à t = 0 minute le DTT a été ajouté pour avoir une concentration finale de 5 mM et la cinétique de réduction du radical a été suivie comme précédemment, par enregistrement des spectres RPE à différents temps. On observe qu'en présence de GAPDH, sur la plage de temps observé, le DTT n'a aucun effet réducteur sur le marqueur (figure 104) et cela que ce soit pour le C23S* ou le C31S*. Le signal RPE commence seulement à disparaître après 60 minutes.

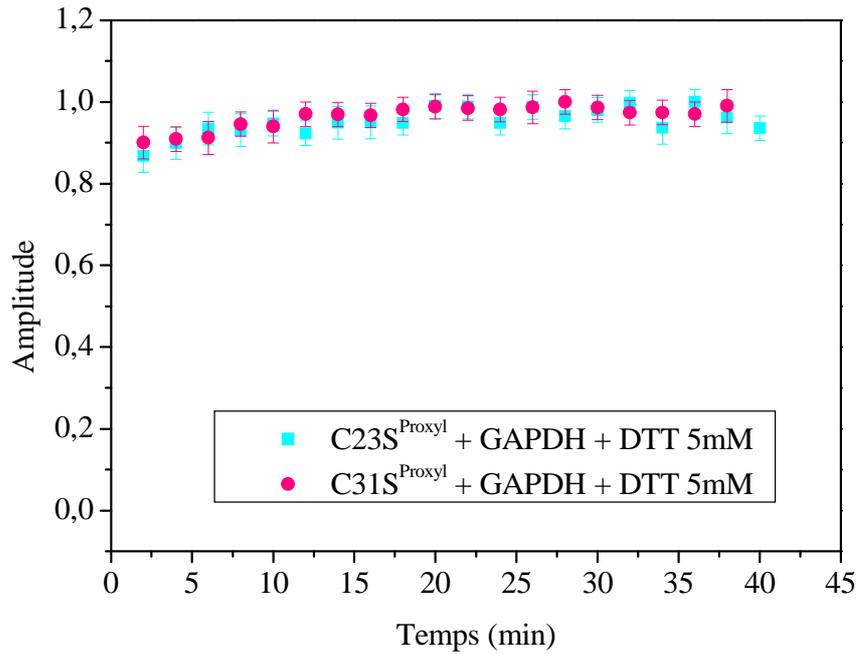


Figure 104 : Cinétique de réduction du radical pour les mutants $C23S^{Proxyl}$ et $C31S^{Proxyl}$. Chaque échantillon est composé d'un des mutants marqués et de GAPDH en quantité équimolaire ainsi que du DTT à 5 mM final.

Cette expérience a également été réalisée sur le marqueur libre. Lors de l'ajout du DTT, on a une disparition complète du signal après 20 minutes de réaction avec un temps caractéristique de 12 minutes. Lorsqu'on réalise le mélange Proxyl/GAPDH, le signal RPE diminue dès la 2^e minute de réaction et disparaît totalement au bout de 120 minutes (figure 105).

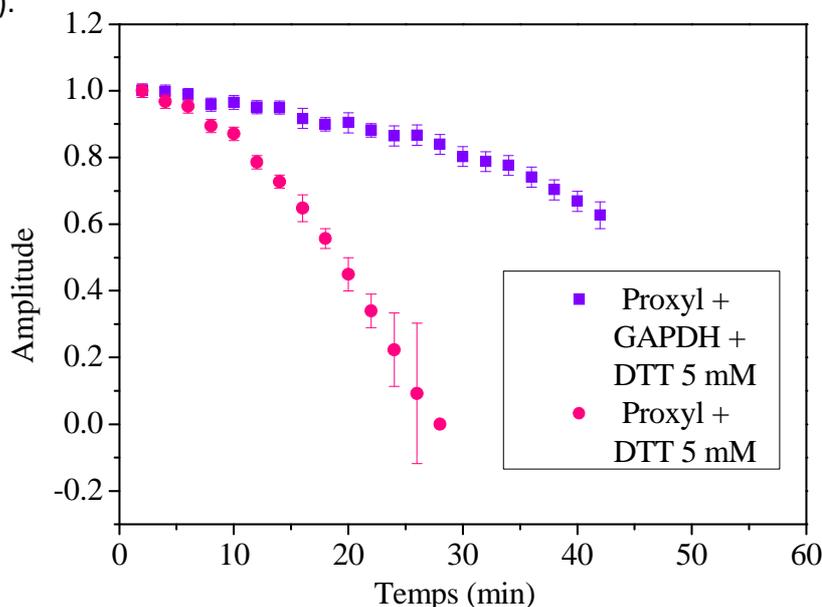


Figure 105 : Cinétique de réduction du radical Proxyl soit en présence de DTT 5 mM final soit en présence de GAPDH et de DTT 5 mM final.

Ce résultat montre que la GAPDH forme bien un complexe avec les deux protéines marquées puisque l'attaque du DTT sur la fonction NO[°] est fortement ralentie en présence de GAPDH. La différence de temps de disparition pour le Proxyl libre en présence ou non de GAPDH peut s'expliquer par la présence des cystéines libres de cette dernière qui peuvent donc réagir avec le Proxyl et aussi ralentir l'effet du DTT. L'utilisation du DTT dans ces expériences permet ainsi de sonder l'accessibilité du marqueur.

Pour confirmer la présence du complexe CP12^{Proxyl}/GAPDH, le substrat de la GAPDH, le BPGA, a été ajouté au mélange des deux partenaires avec le DTT. A t = 0 minute, seul le DTT est présent dans le mélange CP12^{Proxyl}/GAPDH. A t = 10 minutes, le BPGA est injecté dans le milieu réactionnel. La figure 106 montre que la GAPDH protège la sonde paramagnétique pendant les dix premières minutes, puis dix minutes après l'injection, le signal RPE commence à diminuer, pour disparaître complètement après 100 minutes avec un temps caractéristique de disparition de 30 minutes. Le complexe entre la GAPDH et la CP12 est dissocié, cette dernière n'étant plus protégée par son partenaire, ceci permet au DTT de venir attaquer le Proxyl. On observe donc la dissociation du complexe en sondant l'accessibilité du marqueur au DTT.

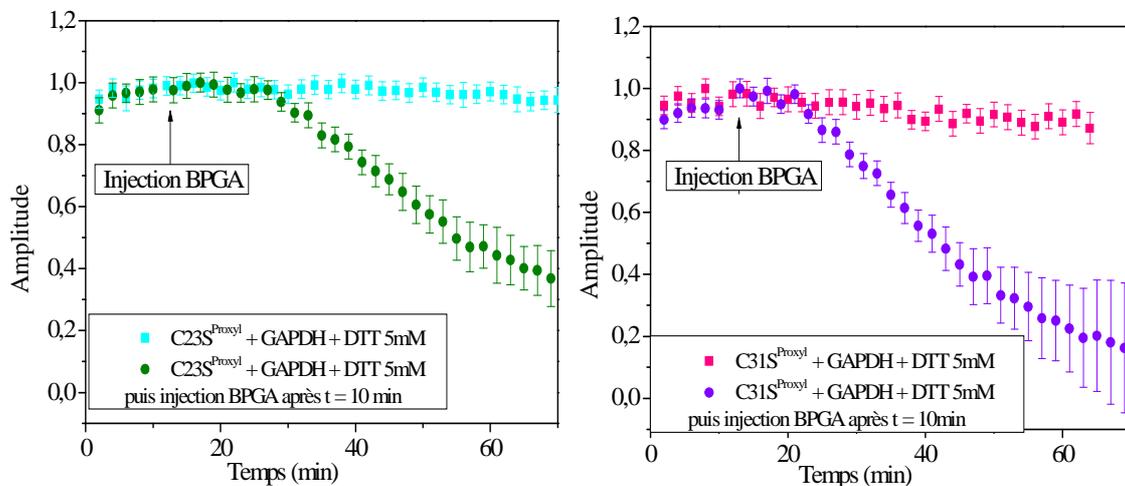


Figure 106 : Cinétique de réduction du radical nitroxyde sur les mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} par le DTT (5 mM) en présence de GAPDH (1 : 1) dans deux conditions différentes, en présence de substrat (rond) ou sans (carré).

5.4.6 Effet du TFE sur les mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl}

A. Structuration de la protéine visible en CD et RPE

On a vu précédemment que le TFE était un stabilisateur de structures secondaires, une expérience a ainsi été réalisée afin d'évaluer l'effet du TFE sur ces protéines désordonnées. Des solutions contenant les mutants marqués avec 10 %, 20 %, 30 % ou 40 % de TFE ont été préparées puis analysées en CD (figure 107). Une restructuration de la protéine correspondant à l'apparition de structure secondaire de type α -hélicale est observée dès 20 % de TFE en solution.

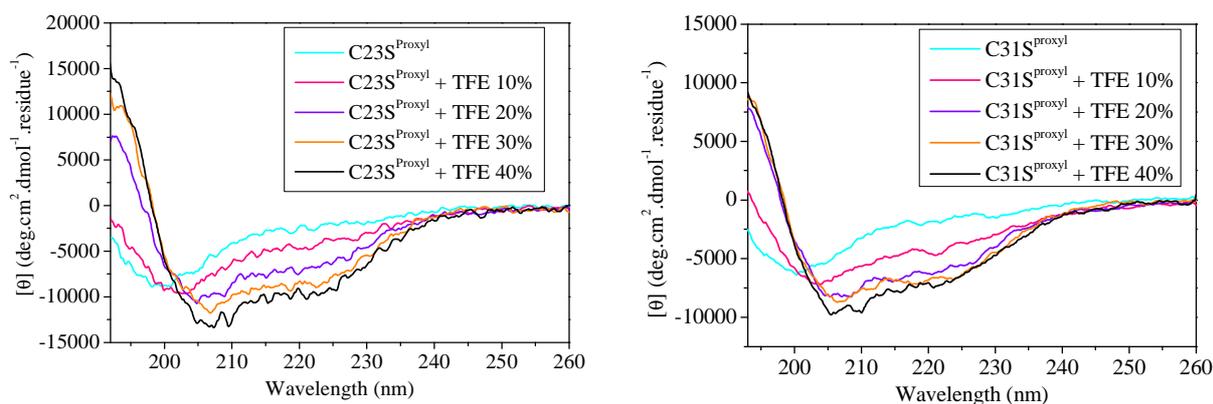


Figure 107 : Spectres CD du C23S^{Proxyl} et du C31S^{Proxyl} en présence ou non de TFE en proportion variable.

Le mélange des protéines marquées en présence de 30 % TFE en spectroscopie RPE a été étudié (figure 108). On observe une forte modification spectrale avec le passage d'un spectre caractéristique d'une sonde avec une grande mobilité à un spectre correspondant à une sonde avec une mobilité plus restreinte. Ces résultats sont en accord avec la reformation des hélices α dans le domaine N-terminal des deux mutants, à l'endroit où se trouve le marqueur.

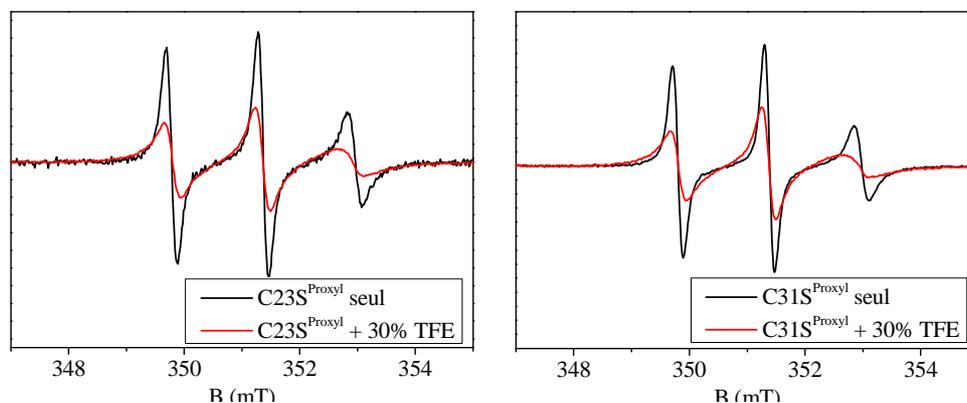


Figure 108 : Spectres RPE des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} sans TFE ou en présence de 30 % de TFE. Les spectres sont normalisés à l'intensité intégrée.

B. Effet de la GAPDH sur ces mélanges protéines marquées/TFE

Une fois la protéine structurée par le TFE, on s'est intéressé à l'effet que pourrait avoir la GAPDH sur celle-ci et si cela se répercutait sur le spectre RPE des mutants. Ainsi, une fois le mélange C23S^{Proxyl}/30 % TFE ou C31S^{Proxyl}/30 % TFE réalisé, la GAPDH est ajoutée en quantité équimolaire, puis l'échantillon est analysé en RPE (figure 109).

En ce qui concerne le mutant C23S^{Proxyl}, on observe une très faible modification spectrale pas significative. En revanche, le spectre obtenu pour le C31S^{Proxyl} est un peu plus complexe. On remarque que c'est un spectre composite constitué d'une composante correspondant à une mobilité contrainte et d'une forme plus étroite typique d'une mobilité de marqueur rapide.

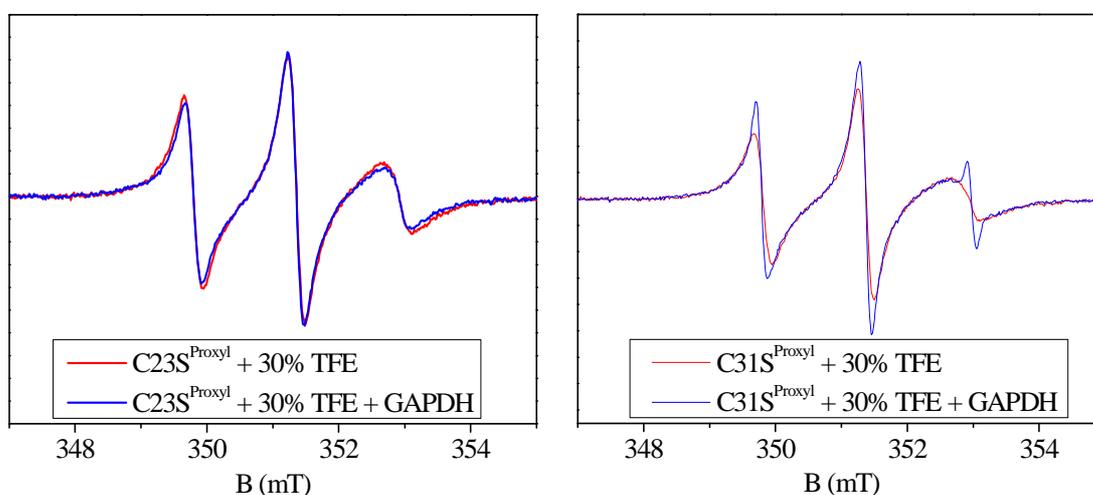


Figure 109 : Spectres RPE des mélanges des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl} en présence de 30 % TFE avec ou sans partenaire GAPDH. Les spectres sont normalisés à l'intensité intégrée.

Pour attribuer l'effet observé en RPE à la GAPDH, il a fallu tester l'activité de cette dernière en présence de TFE afin de voir si celui-ci n'affectait pas ses capacités enzymatiques. Des échantillons contenant soit la GAPDH seule, soit la GAPDH plus 30% de TFE, soit la GAPDH et le C23S^{Proxyl} ou le C31S^{Proxyl}, ou soit la GAPDH, le C23S^{Proxyl} ou le C31S^{Proxyl} et le TFE à 30 % ont été préparés, puis l'activité GAPDH a été mesurée (figure 110).

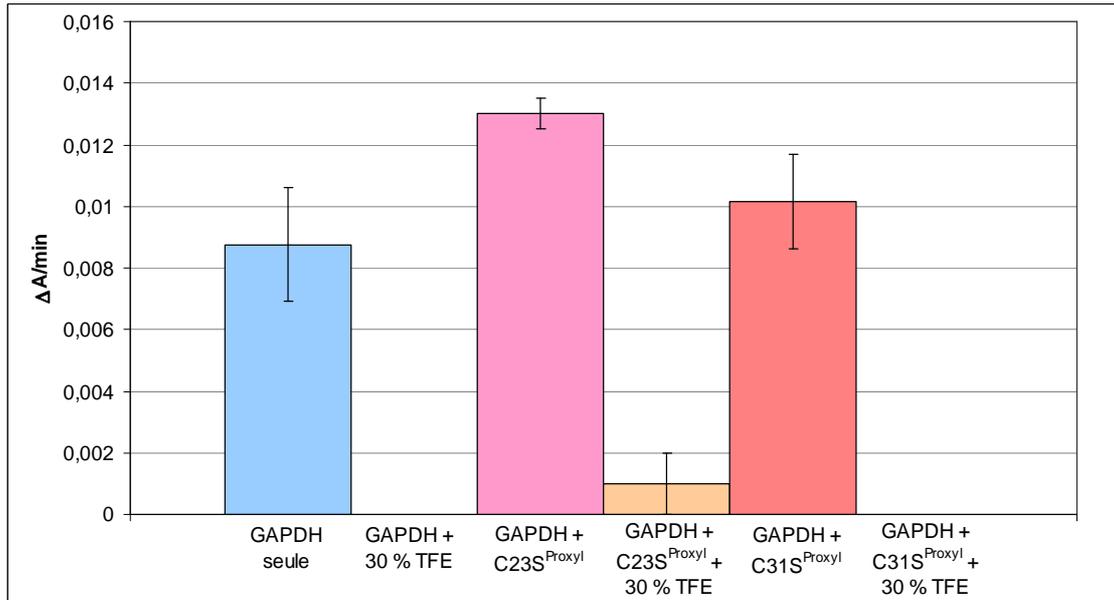


Figure 110 : Effet du TFE à 30 % sur l'activité GAPDH-NADPH en présence des mutants C23S^{Proxyl} et C31S^{Proxyl}.

Tout d'abord, on remarque que l'activité obtenue pour la GAPDH est plus faible que celle des deux mutants marqués. Ceci peut être dû à un effet de dilution. La GAPDH est fortement diluée dans ce test par rapport à celui fait sans TFE et pourrait se dissocier en monomères d'où la baisse de l'activité. Mais après ajout des protéines, celles-ci protégeraient la GAPDH de cet effet. Une deuxième observation majeure est que, lors de l'addition du TFE, la GAPDH perd complètement son activité et cela qu'elle soit seule ou en présence des deux protéines marquées.

La perte d'activité de la GAPDH en présence de TFE suggère un changement de structure de cette dernière, ce qui rend les observations faites en RPE difficilement exploitables.

5.4.7 Discussion

Dans cette partie j'ai étudié les mutants du domaine N-terminal de la CP12. Trois mutants sérine étaient disponibles, deux mutants dans le domaine N-terminal, C23S et C31S, et un mutant dans le domaine C-terminal, C66S. Ces trois mutants ont été marqués au MTSL puis caractérisés et étudiés en RPE. L'effet de la GAPDH a été évalué en RPE et comme pour la CP12, le marqueur a été libéré en solution. Un test de reconstitution fait sur les mutants C23S^{MTSL} et C66S^{MTSL} nous a permis d'observer la formation du complexe pour le mutant

C23S. Comme la GAPDH ne peut rompre que des liaisons soufre-soufre, le marquage de ce mutant avec une sonde formant une liaison carbone-soufre avec une cystéine était envisageable. Le mutant C23S a donc été marqué à 75 % avec le 3-maleimido-proxyl. Cette étude a été étendue à la deuxième hélice avec un deuxième mutant, le C31S afin de sonder ce domaine N-terminal, région suggérée comme zone d'interaction [205, 208]. Ce mutant a été marqué moins efficacement avec taux de marquage de 40 %.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des expériences faites sur les mutants C23S et C31S marqués ou non.

	C23S	C23S^{Proxyl}	C31S	C31S^{Proxyl}
Ponts	N-Ter : O C-Ter : F	N-Ter : O C-Ter : F	N-Ter : O C-Ter : F	N-Ter : O C-Ter : F
RPE		Faible diminution de h(-1)/h(0)		Diminution pas significative de h(-1)/h(0)
CD	Déstructurée	Déstructurée	Déstructurée	Déstructurée
Masse		Marqueur en 31 majoritaire		Marqueur non détecté en digestion trypsique
Gel	Ox : haut Red : haut	- DTT : bas + DTT : haut	Ox : bas + dimère Red : haut	- DTT : bas + dimère - DTT : haut
Reconstitution	+	+	+	+
Activité	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition

Ces deux protéines ont été analysées en spectrométrie de masse afin de vérifier la présence du marqueur sur la cystéine 23 ou 31 selon le mutant. La position 31 a bien été détectée portant le marqueur, ce qui ne fut pas le cas pour la cystéine 23 malgré une masse globale indiquant que la protéine portait bien la sonde. On peut malgré tout penser que la sonde est greffée au bon endroit.

Différents contrôles ont ensuite été réalisés afin de vérifier les caractéristiques biochimiques et structurales des mutants marqués.

Les gels SDS-PAGE réalisés ont montré une migration atypique des deux mutants marqués. En effet, ils ont une masse apparente plus petite que celle de la CP12 sauvage réduite alors qu'il devrait avoir la même migration, car il a été montré que la migration de la CP12 oxydée dépendait uniquement de la présence du pont N-terminal [209]. Ce phénomène peut être attribué à la présence du marqueur, puisque les mutants non marqués migrent à la masse attendue.

Une étude par spectrométrie CD a permis de montrer que les deux mutants étaient complètement déstructurés, leurs spectres étant similaires à celui de la CP12 réduite. La même observation a été faite pour les protéines mutées mais non marquées.

Les mesures d'activité de la GAPDH ont montré que le mutant C23S a une inhibition plus faible que celle de la CP12 ainsi que le C23S^{Proxyl}. La même observation est faite pour le C31S mais pas pour le C31S^{Proxyl} qui lui provoque une diminution de l'activité GAPDH équivalente à celle de la CP12 sauvage. Ceci peut résulter d'une moindre gêne stérique du marqueur lorsque qu'il se trouve sur la cystéine 23. Cependant, du fait du moins bon taux de marquage, il est difficile d'attribuer formellement ce comportement au C31S^{Proxyl}.

Les tests de reconstitution sur ces mutants marqués ont montré la formation du complexe pour les deux protéines. Le marquage n'a donc eu aucun effet sur la capacité des mutants à former un complexe stable avec leur partenaire.

L'effet du partenaire a finalement été analysé par spectroscopie RPE sur chacun des deux mutants dans des conditions stoechiométriques de 1 : 1 (1 monomère de CP12 : 1 tétramère de GAPDH). Le mutant C23S possédant la cystéine 31 marquée donne un spectre RPE caractéristique d'un radical ayant une grande mobilité. Lors de l'ajout de la GAPDH, une faible diminution du rapport $h(-1)/h(0)$ est observée. Le mutant C31S qui a, quant à lui, la cystéine 23 marquée, possède aussi un radical très mobile, mais après mélange avec le partenaire, la diminution du rapport $h(-1)/h(0)$ n'est pas significative. Cependant, les tests de reconstitution montrant la formation du complexe, ces faibles diminutions doivent être dues à l'interaction entre les deux protéines. Pour vérifier cette hypothèse, un mélange protéine-GAPDH-BPGA (substrat de la GAPDH)-DTT a été analysé sachant que le BPGA et le DTT dissocient le complexe CP12/GAPDH. Une extinction du signal RPE a été observée lors de l'ajout du DTT sur les deux protéines marquées, ceci étant dû au pouvoir réducteur du DTT. En revanche, si le DTT est rajouté au mélange mutant^{Proxyl}/GAPDH, le signal RPE n'est pas affecté immédiatement et la cinétique est plus longue. Le DTT permet dans de telles expériences de sonder l'accessibilité de la sonde. Ces expériences nous ont permis de montrer que les spectres observés, malgré la faible variation de forme spectrale, résultent du complexe GAPDH/CP12.

Le résultat majeur de cette étude est de montrer que les deux protéines marquées restent déstructurées dans le complexe formé avec la GAPDH contrairement à de nombreuses PID. On n'a pas de repliement induit lors de l'association du partenaire. La CP12 est donc capable d'interagir avec la GAPDH même en étant désordonnée. En 2009, la CP12 a été étudiée sous sa forme complètement déstructurée c'est-à-dire avec ses ponts disulfure rompus et il a été montré qu'elle était capable d'interagir avec la GAPDH [208]. Un modèle de la régulation de la GAPDH par la CP12 a récemment été publié grâce à l'étude de la CP12 dans son état oxydé et réduit [203]. Sachant que pour la GAPDH A₂B₂ de l'épinard, le dernier résidu de la sous-unité B joue un rôle dans la régulation de la GAPDH [207], les auteurs ont voulu vérifier si le résidu D80 de la CP12 pouvait jouer le même rôle. Ce résidu chargé négativement a d'abord été muté par un résidu alanine. Une perte d'énergie libre correspondant à la rupture d'une liaison hydrogène a été observée. Tous les autres contrôles sont identiques à la CP12 wt. Cependant, quand la charge négative du dernier résidu est remplacé par une charge positive (D80K), l'activité de la GAPDH ne diminue plus comme pour la CP12 wt malgré la formation du complexe. Ce comportement est identique à celui observé pour la CP12 réduite. Il est probable qu'une répulsion électrostatique empêche l'interaction de ce mutant avec la région chargée positivement de la GAPDH et ainsi, le site de liaison du NADPH ne serait pas bloqué et le NADPH pourrait entrer dans le site actif. Cette interaction entre le résidu D80 de la CP12 et les résidus positifs de la GAPDH dépend de la formation du pont disulfure C-terminal de la CP12. Le modèle suivant a été proposé : quand ce pont est présent, le résidu D80 interagit et empêche l'entrée du NADPH dans le site actif, mais quand ce pont est rompu, sous des conditions réductrices, ce résidu est éloigné du site actif, permettant au NADPH d'entrer [203].

Cependant, le site d'interaction suscite encore quelques questions. En effet, on a vu que le complexe se forme mais le spectre RPE reste très mobile alors que la GAPDH protège le marqueur de l'attaque du DTT. Il est connu que la CP12 va interagir au niveau d'une crevasse de la GAPDH. Cette crevasse appelée S-loop est une région chargée positivement [200]. La mutation de certains résidus situés dans cette zone ainsi que des résidus situés dans la deuxième hélice de la CP12 a permis de suggérer que l'interaction entre les deux partenaires était de type électrostatique [199-200, 207]. Le marqueur est donc situé dans la zone d'interaction prédite mais on a pu remarquer qu'il n'était pas en contact tertiaire avec la zone d'interaction entre la CP12 et la GAPDH. Une hypothèse pourrait être que le marqueur ne pointe pas à l'intérieur de la crevasse et qu'il ne subit donc pas de contrainte stérique. Ces résultats montrent aussi que la CP12 reste désordonnée lors de son interaction avec la GAPDH. Jusqu'à récemment, il était admis que les PID à l'état isolé s'ordonnaient lorsqu'elles s'associaient à leur partenaire. Or en 2008, Tompa et Fuxreiter introduisent une

nouvelle vision des interactions protéine-protéine : les « fuzzy complexes » ou « complexes flous » [48]. En s'appuyant sur différents exemples de PID décrites dans la littérature, les auteurs montrent que ces protéines, même dans un état lié, peuvent fluctuer entre différentes structures. Ils décrivent deux modes de désordre structural dans les interactions protéine-protéine, le désordre statique et le désordre dynamique. Le désordre statique est décrit par le modèle polymorphique. Ce modèle concerne les protéines qui sont complètement ordonnées dans l'état lié mais qui adoptent différentes conformations. Le désordre dynamique est décrit par trois modèles selon le degré de désordre de la protéine liée. Le modèle « clamp » est utilisé pour les protéines possédant deux régions ordonnées liées connectées par un lien qui reste désordonné dans l'état lié. Si une protéine ne possède qu'un court segment ordonné lors de son interaction, le reste de la protéine étant désordonnée, elle sera décrite par le modèle « flanking ». Enfin, le modèle « random » s'emploie pour les protéines qui restent entièrement désordonnées dans l'état lié avec des segments qui s'ordonnent de manière transitoire dans l'espace et le temps. Lors de l'interaction de la CP12 avec la GAPDH, aucune transition désordre → ordre n'est observée, ce qui est un nouvel exemple de systèmes biologique formant un « fuzzy complexe ».

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur le développement de différentes stratégies dédiées à l'étude de la flexibilité des protéines et à l'observation des changements structuraux qu'elles peuvent subir lors de l'interaction avec leur partenaire. La technique qui a été utilisée est le marquage de spin couplé à la spectroscopie RPE. Cette technique est particulièrement bien adaptée à l'étude des transitions structurales qui se produisent dans les protéines et est fortement utilisée depuis les années 90. Lorsque j'ai commencé cette thèse, le protocole classique consistait en l'insertion d'une sonde paramagnétique sur un résidu cystéine de la protéine situé à un endroit adéquat. De nombreux systèmes biologiques ont ainsi été explorés et de nombreux articles discutant de cette technique sont parus surtout avec les travaux de W. Hubbell et H. McHarouab [116-117, 148-149, 151, 223-224].

J'ai donc appliqué cette technique à un premier sujet d'étude : la protéine chaperon NarJ. Lorsque que cette étude a été entreprise, de précédents travaux avaient été réalisés montrant une certaine flexibilité de la protéine [178]. Mais aucune donnée expérimentale n'était disponible sur le site d'interaction de cette protéine avec son partenaire, un peptide de 15 acides aminés, ainsi que sur la dynamique de cette interaction.

Les résultats que j'ai obtenus à l'aide d'une sonde paramagnétique greffée en différentes positions de la protéine et observée en spectroscopie RPE a permis d'obtenir des informations sur ce site d'interaction. Sur les quatre sites de greffage choisis, trois ont montré peu ou pas de changement de la mobilité du nitroxyde lors de l'introduction du peptide. En revanche, le quatrième site, situé à l'intérieur d'une crevasse hydrophobe a montré un fort changement spectral après l'ajout du partenaire. Ceci traduit une diminution de la mobilité de la sonde et de l'espace conformationnel dans lequel elle peut se mouvoir impliquant des contacts tertiaires avec le partenaire.

Une fois le site d'interaction déterminé, restait la question sur la dynamique de cette interaction et les modifications structurales induites. Lors du marquage des quatre sites de NarJ, deux ont montré peu de changements pour être impliqués directement dans l'interaction. Mais ces faibles changements nous ont laissé supposer que cette interaction avait une influence sur la position l'un par rapport à l'autre de ces deux résidus. En effet, ces deux positions, 21 et 104, sont localisées de part et d'autre de la crevasse. Une stratégie de double marquage a donc été mise en place afin d'obtenir des informations sur la distance entre les deux marqueurs greffés. La recherche d'un protocole de marquage optimal, afin d'avoir le maximum de protéines doublement marquées, a d'abord été nécessaire. Cet objectif atteint, la RPE en onde continue a apporté des données qualitatives intéressantes puisqu'elle indiquait une diminution des interactions magnétiques spin-spin entre les deux

Conclusions générales et perspectives

spins donc un éloignement des deux radicaux lors de la présence du peptide. Pour pouvoir quantifier ces distances, la RPE en onde impulsionnelle a été utilisée. Ces expériences, réalisées dans un premier temps en collaboration avec H. Vezin du LASIR à Lille, ont été poursuivies au laboratoire grâce à l'implantation d'un spectromètre pulsé. Après la mise au point de la séquence DEER et des traitements des données, nous avons pu obtenir des profils de distance avec trois distances inter-sondes (1,9 ; 2,6 et 3,1 nm) pour la protéine seule en solution, et une distance (2,6 nm, distance déjà présente sans partenaire) lors de l'ajout du peptide. Ces résultats ont permis de montrer la présence de trois conformations différentes lorsque la protéine est sans partenaire pour n'en laisser qu'une existante lors de l'interaction avec le peptide. Ces résultats suggèrent un mécanisme de sélection conformationnelle comme mode de reconnaissance des deux partenaires. Par ailleurs, ils sont en accord avec ceux obtenus récemment sur l'étude de l'interaction NarJ-peptide par la mobilité ionique en spectrométrie de masse.

Ce travail a permis d'obtenir de nombreuses informations sur la protéine NarJ. Cependant il s'agit d'une protéine tronquée qui ne possède plus son extrémité C-terminale. Une des suites de ce travail sera donc de déterminer les positions que peut prendre ce domaine lors de l'interaction grâce à des mesures de distances entre la cystéine naturellement présente dans cette région et d'autres situés sur la partie globulaire de NarJ.

Le peptide partenaire a également fait l'objet d'une étude. En effet, ce peptide possède une structure en hélice α , hélice qui est amphiphile. Il a donc été marqué sur ces deux faces. Mais des problèmes sont apparus lors du protocole de marquage : problèmes liés aux colonnes utilisées qui ne permettent pas une séparation satisfaisante entre marqueur libre et peptide marqué. Les premières fractions non contaminées ont quand même été utilisées et observées en RPE en présence de NarJ. Les premiers résultats suggèrent que c'est la face apolaire du peptide qui serait en interaction avec NarJ. Un travail d'amélioration du protocole de marquage reste à faire au niveau du protocole de marquage et sera une des perspectives à réaliser.

Mon deuxième sujet d'étude a été la protéine CP12. Cette protéine a la particularité d'avoir quatre cystéines naturelles. Lors de l'application du protocole classique, une surprenante observation a été faite. En effet, lors de l'ajout de son partenaire, la GAPDH, celle-ci induit la libération des marqueurs en solution par la rupture de la liaison soufre-soufre entre le marqueur et la protéine [209]. Néanmoins, ce comportement surprenant nous a permis de dévoiler un autre rôle de la GAPDH : l'échange thiols – ponts disulfure. De nombreuses protéines possèdent des cystéines ayant des rôles fonctionnels ou structuraux,

Conclusions générales et perspectives

une nouvelle stratégie de marquage a donc du être mise en place pour ne pas avoir à utiliser des cystéines comme site de greffage afin de pouvoir étudier ces protéines et d'élargir ainsi le potentiel d'investigation de la technique SDSL. Notre choix s'est porté sur les résidus tyrosines. A l'aide d'une réaction de Mannich à trois composés, un nitroxyde a pu être lié de façon covalente à la protéine par la présence de formaldéhyde. Une fois cette réaction réalisée, la protéine a subi une série de tests biochimiques pour vérifier son intégrité. La spectrométrie de masse a montré la présence du nitroxyde sur le résidu tyrosine de la CP12. Enfin, la présence du partenaire a montré une faible mais significative diminution de la mobilité du radical indiquant que la région où se situe le marqueur reste très flexible et n'est pas directement impliquée dans le site d'interaction des deux partenaires.

Cette étude est une première dans le greffage de radicaux nitroxydes sur un résidu tyrosine. Elle montre la faisabilité de cette stratégie et ouvre les portes pour l'étude de protéines contenant des cystéines fonctionnelles [222]. D'autres marqueurs sont encore en cours de développement pour pouvoir marquer les tryptophanes également.

En parallèle, je me suis intéressée à deux mutants de la CP12 situés chacun dans une hélice de la protéine. Ces mutants sont toujours capables de former un complexe avec la GAPDH et ont donc été marqués avec un nitroxyde formant une liaison carbone-soufre avec les cystéines, évitant ainsi la libération du radical. Les études biochimiques et spectroscopiques ont indiqué la présence du radical sur le site souhaité et la formation du complexe entre la protéine marquée et son partenaire. La RPE a montré peu ou pas de changement dans la mobilité du marqueur. Cependant, lors de l'ajout de la GAPDH en présence d'un réducteur, le DTT, on observe que le nitroxyde est protégé de l'attaque du DTT, qui ne l'est pas en absence de GAPDH. De plus si on ajoute du BPGA au mélange CP12 marquée/GAPDH/DTT, la réduction du radical est observée. Or, il a été montré que seul la présence du DTT et du BPGA peut rompre le complexe CP12/GAPDH. Ainsi, nos résultats ont montré une interaction entre la CP12 qui est désordonnée et son partenaire la GAPDH. Dans le complexe, la CP12 reste désordonnée car on observe un faible changement spectral, alors que si une hélice se formait, on s'attendrait à trouver un spectre similaire à celui observé avec le TFE. Il s'agit d'un exemple de « fuzzy complexes » ou complexe flou dans lequel la PID, même liée à son partenaire, continue à fluctuer entre différentes structures.

Bibliographie

1. Lanciano, P., et al., *Biogenesis of a Respiratory Complex Is Orchestrated by a Single Accessory Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(24): p. 17468-17474.
2. Graciet, E., et al., *The small protein CP12: a protein linker for supramolecular assembly*. *Biochemistry*, 2003. 42(1): p. 8163-70.
3. Sanger, F. and H. Tuppy, *The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates*. *Biochem. J.*, 1951. 49(4): p. 463-481.
4. Paoli, M., et al., *Crystal Structure of T State Haemoglobin with Oxygen Bound At All Four Haems*. *Journal of Molecular Biology*, 1996. 256(4): p. 775-792.
5. Phillips, S.E.V., *Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution*. *Journal of Molecular Biology*, 1980. 142(4): p. 531-554.
6. Burley, S.K. and G.A. Petsko, *Weakly polar interactions in proteins*. *Advances in Protein Chemistry* 1988. 39(1): p. 125-189.
7. Petsko, G.A. and D. Ringe, *Fluctuations in Protein Structure from X-Ray Diffraction*. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1984. 13: p. 331-371.
8. Teilum, K., J. Olsen, and B. Kragelund, *Functional aspects of protein flexibility*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. 66(14): p. 2231-2247.
9. Aigrain, L., et al., *Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase*. *EMBO Rep*, 2009. 10(7): p. 742-747.
10. Fischer, E., *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1894. 27(3): p. 2985-2993.
11. Koshland, D.E., *Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1958. 44(2): p. 98-104.
12. Baldwin, R.L., *The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view*. *Journal of Biomolecular NMR*, 1995. 5(2): p. 103-109.
13. Lazaridis, T. and M. Karplus, *"New View" of Protein Folding Reconciled with the Old Through Multiple Unfolding Simulations*. *Science*, 1997. 278(5345): p. 1928-1931.
14. Kumar, S., et al., *Folding and binding cascades: Dynamic landscapes and population shifts*. *Protein Science*, 2000. 9(1): p. 10-19.

Bibliographie

15. Tsai, C.-J., et al., *Folding funnels, binding funnels, and protein function*. Protein Science, 1999. 8(6): p. 1181-1190.
16. Freire, E., *The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: Analysis of the binding of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. 96(18): p. 10118-10122.
17. Goh, C.-S., D. Milburn, and M. Gerstein, *Conformational changes associated with protein-protein interactions*. Current Opinion in Structural Biology, 2004. 14(1): p. 104-109.
18. Xu, Y., et al., *Flexibility of Aromatic Residues in the Active-Site Gorge of Acetylcholinesterase: X-ray versus Molecular Dynamics*. Biophysical Journal, 2008. 95(5): p. 2500-2511.
19. Rosenberry, T.L., *Acetylcholinesterase*, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 103-218.
20. Silman, I. and J.L. Sussman, *Acetylcholinesterase: [']classical' and [']non-classical' functions and pharmacology*. Current Opinion in Pharmacology, 2005. 5(3): p. 293-302.
21. James, L.C., P. Roversi, and D.S. Tawfik, *Antibody Multispecificity Mediated by Conformational Diversity*. Science, 2003. 299(5611): p. 1362-1367.
22. Oldstone, M.B.A., *Molecular mimicry and autoimmune disease*. Cell, 1987. 50(6): p. 819-820.
23. Kagawa, T.F., et al., *Crystal structure of the zymogen form of the group A Streptococcus virulence factor SpeB: An integrin-binding cysteine protease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. 97(5): p. 2235-2240.
24. Anfinsen, C.B., *Principles that Govern the Folding of Protein Chains*. Science, 1973. 181(4096): p. 223-230.
25. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm*. Journal of Molecular Biology, 1999. 293(2): p. 321-331.
26. Sickmeier, M., et al., *DisProt: the Database of Disordered Proteins*. Nucleic Acids Research, 2007. 35(suppl 1): p. D786-D793.
27. Raychaudhuri, S., et al., *The Role of Intrinsically Unstructured Proteins in Neurodegenerative Diseases*. PLoS ONE, 2009. 4(5): p. e5566.
28. Tompa, P., *Intrinsically unstructured proteins*. Trends Biochem Sci, 2002. 27(10): p. 527-33.
29. Dunker, A.K., et al., *Intrinsically disordered protein*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2001. 19(1): p. 26-59.

Bibliographie

30. Tompa, P., *The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins*. FEBS Letters, 2005. 579(15): p. 3346-3354.
31. Mukhopadhyay, R. and J.H. Hoh, *AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force*. FEBS Letters, 2001. 505(3): p. 374-378.
32. Trombitás, K., et al., *Titin Extensibility In Situ: Entropic Elasticity of Permanently Folded and Permanently Unfolded Molecular Segments*. The Journal of Cell Biology, 1998. 140(4): p. 853-859.
33. Iakoucheva, L.M., et al., *The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation*. Nucleic Acids Research, 2004. 32(3): p. 1037-1049.
34. Kim, T.D., S.R. Paik, and C.-H. Yang, *Structural and Functional Implications of C-Terminal Regions of α -Synuclein[†]*. Biochemistry, 2002. 41(46): p. 13782-13790.
35. Bhattacharyya, J. and K.P. Das, *Molecular Chaperone-like Properties of an Unfolded Protein, α s-Casein*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(22): p. 15505-15509.
36. Bartels, T., J.G. Choi, and D.J. Selkoe, *α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation*. Nature, 2011. 477(7362): p. 107-110.
37. Olashaw, N., T.K. Bagui, and W.J. Pledger, *Cell Cycle Control: A Complex Issue*. Cell Cycle, 2004. 3(3): p. 261-262.
38. Radhakrishnan, I., et al., *Solution Structure of the KIX Domain of CBP Bound to the Transactivation Domain of CREB: A Model for Activator:Coactivator Interactions*. Cell, 1997. 91(6): p. 741-752.
39. Holt, C., N.M. Wahlgren, and T. Drakenberg, *Ability of a beta-casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters*. Biochem. J., 1996. 314(3): p. 1035-1039.
40. Bennick, A., *Interaction of Plant Polyphenols with Salivary Proteins*. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 2002. 13(2): p. 184-196.
41. Tompa, P., C. Szász, and L. Buday, *Structural disorder throws new light on moonlighting*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. 30(9): p. 484-489.
42. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Linking folding and binding*. Current Opinion in Structural Biology, 2009. 19(1): p. 31-38.
43. Radhakrishnan, I., et al., *Conformational preferences in the Ser133-phosphorylated and non-phosphorylated forms of the kinase inducible transactivation domain of CREB*. FEBS Letters, 1998. 430(3): p. 317-322.
44. Richards, J.P., et al., *Analysis of the Structural Properties of cAMP-responsive Element-binding Protein (CREB) and Phosphorylated CREB*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(23): p. 13716-13723.

Bibliographie

45. Belle, V., et al., *Mapping alpha-helical induced folding within the intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein by site-directed spin-labeling EPR spectroscopy*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2008. 73(4): p. 973-988.
46. Habchi, J. and S. Longhi, *Structural disorder within paramyxovirus nucleoproteins and phosphoproteins*. *Molecular BioSystems*, 2011.
47. Houben, K., et al., *Interaction of the C-Terminal Domains of Sendai Virus N and P Proteins: Comparison of Polymerase-Nucleocapsid Interactions within the Paramyxovirus Family*. *J. Virol.*, 2007. 81(13): p. 6807-6816.
48. Tompa, P. and M. Fuxreiter, *Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008. 33(1): p. 2-8.
49. Agez, M., et al., *Structure of the Histone Chaperone Asf1 Bound to the Histone H3 C-Terminal Helix and Functional Insights*. *Structure*, 2007. 15(2): p. 191-199.
50. Charier, G., et al., *The Tudor Tandem of 53BP1: A New Structural Motif Involved in DNA and RG-Rich Peptide Binding*. *Structure*, 2004. 12(9): p. 1551-1562.
51. Hiller, S., et al., *Sequence-Specific Resonance Assignment of Soluble Nonglobular Proteins by 7D APSY-NMR Spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. 129(35): p. 10823-10828.
52. Bax, A., *Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics*. *Protein Science*, 2003. 12(1): p. 1-16.
53. Blackledge, M., *Recent progress in the study of biomolecular structure and dynamics in solution from residual dipolar couplings*. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2005. 46(1): p. 23-61.
54. MacDonald, D. and P. Lu, *Residual dipolar couplings in nucleic acid structure determination*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002. 12(3): p. 337-343.
55. Tolman, J.R., *Dipolar couplings as a probe of molecular dynamics and structure in solution*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001. 11(5): p. 532-539.
56. Tsui, V., et al., *Assessment of zinc finger orientations by residual dipolar coupling constants*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2000. 16(1): p. 9-21.
57. Wu, Z., et al., *Overall structure and sugar dynamics of a DNA dodecamer from homo- and heteronuclear dipolar couplings and ^{31}P chemical shift anisotropy*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2003. 26(4): p. 297-315.
58. Bernadó, P., et al., *Defining Long-Range Order and Local Disorder in Native α -Synuclein Using Residual Dipolar Couplings*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. 127(51): p. 17968-17969.

59. Mukrasch, M.D., et al., *Highly Populated Turn Conformations in Natively Unfolded Tau Protein Identified from Residual Dipolar Couplings and Molecular Simulation*. Journal of the American Chemical Society, 2007. 129(16): p. 5235-5243.
60. Gillespie, J.R. and D. Shortle, *Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. I. paramagnetic relaxation enhancement by nitroxide spin labels*. Journal of Molecular Biology, 1997. 268(1): p. 158-169.
61. Gillespie, J.R. and D. Shortle, *Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. II. distance restraints from paramagnetic relaxation and calculation of an ensemble of structures*. Journal of Molecular Biology, 1997. 268(1): p. 170-184.
62. Clore, G.M., C. Tang, and J. Iwahara, *Elucidating transient macromolecular interactions using paramagnetic relaxation enhancement*. Current Opinion in Structural Biology, 2007. 17(5): p. 603-616.
63. Dedmon, M.M., et al., *Mapping Long-Range Interactions in α -Synuclein using Spin-Label NMR and Ensemble Molecular Dynamics Simulations*. Journal of the American Chemical Society, 2004. 127(2): p. 476-477.
64. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2005. 1751(2): p. 119-139.
65. Provencher, S.W. and J. Gloeckner, *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*. Biochemistry, 1981. 20(1): p. 33-37.
66. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set*. Analytical Biochemistry, 2000. 287(2): p. 252-260.
67. Fontana, A., et al., *Probing protein structure by limited proteolysis*. Acta Biochimica Polonica, 2004. 51(2): p. 299-321.
68. Prilusky, J., et al., *FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded*. Bioinformatics, 2005. 21(16): p. 3435-3438.
69. Amir, R.E., et al., *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2*. Nature Genetics, 1999. 23(2): p. 185-188.
70. Adams, V.H., et al., *Intrinsic Disorder and Autonomous Domain Function in the Multifunctional Nuclear Protein, MeCP2*. Journal of Biological Chemistry, 2007. 282(20): p. 15057-15064.
71. Sreerama, N., S.Y. Venyaminov, and R.W. Woody, *Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis*. Analytical Biochemistry, 2000. 287(2): p. 243-251.

Bibliographie

72. Nan, X., R.R. Meehan, and A. Bird, *Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2*. *Nucleic Acids Research*, 1993. 21(21): p. 4886-4892.
73. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. *Nature*, 1998. 393(6683): p. 386-389.
74. Receveur-Bréchet, V., et al., *Assessing protein disorder and induced folding*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006. 62(1): p. 24-45.
75. Morin, B., et al., *Assessing induced folding of an intrinsically disordered protein by site-directed spin-labeling electron paramagnetic resonance spectroscopy*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006. 110(41): p. 20596-20608.
76. Hua, Q.-X., et al., *Transcriptional Activator–Coactivator Recognition: Nascent Folding of a Kinase-Inducible Transactivation Domain Predicts Its Structure on Coactivator Binding*. *Biochemistry*, 1998. 37(17): p. 5858-5866.
77. Longhi, S., et al., *The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein*. *J Biol Chem*, 2003. 278(20): p. 18638-48.
78. Kelly, S.M. and N.C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. *Curr Protein Pept Sci*, 2000. 1(4): p. 349-84.
79. Permyakov, S.E., et al., *Natively unfolded C-terminal domain of caldesmon remains substantially unstructured after the effective binding to calmodulin*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2003. 53(4): p. 855-n/a.
80. Lackowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1999, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
81. Stryer, L., *Fluorescence Spectroscopy of Proteins*. *Science*, 1968. 162(3853): p. 526-533.
82. Chen, Y. and M.D. Barkley, *Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins*. *Biochemistry*, 1998. 37(28): p. 9976-9982.
83. Lackowicz, J., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1983, New York: Plenum Press.
84. Matsumura, F. and S. Yamashiro, *Caldesmon*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1993. 5(1): p. 70-76.
85. Sobue, K. and J.R. Sellers, *Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266(19): p. 12115-12118.
86. Natalello, A. and S.M. Doglia, *Intrinsically disordered proteins and induced folding studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, in *Instrumental analysis of intrinsically disordered proteins*, V.N. Uversky and S. Longhi, Editors. 2010, Wiley: New York. p. 225-252.

Bibliographie

87. Goormaghtigh, E., V. Raussens, and J.-M. Ruyschaert, *Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1999. 1422: p. 105-185.
88. Barth, A. and C. Zscherp, *What vibrations tell about proteins*. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002. 35(04): p. 369-430.
89. Arrondo, J.L.R., et al., *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy*. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1993. 59(1): p. 23-56.
90. Tatulian, S.A., R.L. Biltonen, and L.K. Tamm, *Structural changes in a secretory phospholipase A2 Induced by membrane binding: a clue to interfacial activation?* *Journal of Molecular Biology*, 1997. 268(5): p. 809-815.
91. Kumar, R., et al., *Induced α -Helix Structure in AF1 of the Androgen Receptor upon Binding Transcription Factor TFIIIF \dagger* . *Biochemistry*, 2004. 43(11): p. 3008-3013.
92. Kohn, J.E., et al., *Random-coil behavior and the dimensions of chemically unfolded proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(34): p. 12491-12496.
93. Moncoq, K., et al., *SAXS Study of the PIR Domain from the Grb14 Molecular Adaptor: A Natively Unfolded Protein with a Transient Structure Primer?* *Biophysical Journal*, 2004. 87(6): p. 4056-4064.
94. Uversky, V.N., et al., *Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(14): p. 11970-11978.
95. Gast, K., *Dynamic and static light scattering*, in *Instrumental analysis of intrinsically disordered proteins*, V.N. Uversky and S. Longhi, Editors. 2010, Wiley: New York. p. 525-544.
96. Fabian, H., et al., *Secondary Structure and Oligomerization Behavior of Equilibrium Unfolding Intermediates of the λ Cro Repressor \dagger* . *Biochemistry*, 1999. 38(17): p. 5633-5642.
97. Sokolowski, F., et al., *Formation of Critical Oligomers Is a Key Event during Conformational Transition of Recombinant Syrian Hamster Prion Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(42): p. 40481-40492.
98. Nicoli, D.F. and G.B. Benedek, *Study of thermal denaturation of lysozyme and other globular proteins by light-scattering spectroscopy*. *Biopolymers*, 1976. 15(12): p. 2421-2437.
99. Gast, K., D. Zirwer, and G. Damaschum, *Time-resolved dynamic light scattering as a method to monitor compaction during protein folding*, in *Data evaluation in light scattering of polymers*, M. Helmstedt and K. Gast, Editors. 2000, Wiley: Germany. p. 205-220.

Bibliographie

100. Dubin, S.B., G. Feher, and G.B. Benedek, *Study of the chemical denaturation of lysozyme by optical mixing spectroscopy*. *Biochemistry*, 1973. 12(4): p. 714-720.
101. Uversky, V.N., *Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule*. *Biochemistry*, 1993. 32(48): p. 13288-13298.
102. Withka, J., et al., *Use of high-performance size-exclusion, ion-exchange, and hydrophobic interaction chromatography for the measurement of protein conformational change and stability*. *Journal of Chromatography A*, 1987. 398: p. 175-202.
103. Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink, *Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(14): p. 10737-10744.
104. Grzela, R., et al., *Virulence Factor of Potato Virus Y, Genome-attached Terminal Protein VPg, Is a Highly Disordered Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(1): p. 213-221.
105. Laue, T.M., *Sedimentation equilibrium as thermodynamic tool*, in *Methods in Enzymology*, G.K.A. Michael L. Johnson, Editor. 1995, Academic Press. p. 427-452.
106. Goldgur, Y., et al., *Desiccation and Zinc Binding Induce Transition of Tomato Abscisic Acid Stress Ripening 1, a Water Stress- and Salt Stress-Regulated Plant-Specific Protein, from Unfolded to Folded State*. *Plant Physiology*, 2007. 143(2): p. 617-628.
107. Marsh, D., D. Kurad, and V.A. Livshits, *High-field electron spin resonance of spin labels in membranes*. *Chem Phys Lipids*, 2002. 116(1-2): p. 93-114.
108. Belle, V., et al., *Site-directed spin labeling EPR spectroscopy*, in *Assessing Structures and Conformations of Intrinsically Disordered Proteins* L.S. Uversky VN, Editor. 2009, John Wiley and Sons: New Jersey.
109. Stoll, S. and A. Schweiger, *EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR*. *J Magn Reson*, 2006. 178(1): p. 42-55.
110. Stone, T.J., et al., *Spin-labeled biomolecules*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1965. 54(4): p. 1010-1017.
111. Altenbach, C., et al., *Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines*. *Biochemistry*, 1989. 28(19): p. 7806-7812.
112. Todd, A.P., et al., *Site-directed mutagenesis of colicin E1 provides specific attachment sites for spin labels whose spectra are sensitive to local conformation*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1989. 6(3): p. 294-305.
113. Fanucci, G.E. and D.S. Cafiso, *Recent advances and applications of site-directed spin labeling*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006. 16(5): p. 644-653.

Bibliographie

114. Klare, J.P. and H.J. Steinhoff, *Spin labeling EPR*. Photosynthesis Research, 2009. 102(2-3): p. 377-390.
115. Columbus, L. and W.L. Hubbell, *A new spin on protein dynamics*. Trends Biochem Sci, 2002. 27(6): p. 288-95.
116. Hubbell, W.L., D.S. Cafiso, and C. Altenbach, *Identifying conformational changes with site-directed spin labeling*. Nat Struct Biol, 2000. 7(9): p. 735-9.
117. Hubbell, W.L., et al., *Recent advances in site-directed spin labeling of proteins*. Current Opinion in Structural Biology, 1998. 8: p. 649-656.
118. Timofeev, V.P. and V.I. Tsetlin, *Analysis of mobility of protein side chains by spin-label technique*. Biophysics of Structure and Mechanisms, 1983. 10(1-2): p. 93-108.
119. Qu, K., et al., *Kinetics and motional dynamics of spin-labeled yeast iso-1-cytochrome c: 1. Stopped-flow electron paramagnetic resonance as a probe for protein folding/unfolding of the C-terminal helix spin-labeled at cysteine 102*. Biochemistry, 1997. 36(10): p. 2884-97.
120. Budil, D.E., et al., *Non linear least-squares analysis of slow motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm* Journal of Magnetic Resonance Series A, 1996. 120(2): p. 155-189.
121. Stopar, D., et al., *Exploring the local conformational space of a membrane protein by site-directed spin labeling*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2005. 45(6): p. 1621-1627.
122. Strancar, J., et al., *Spin label EPR-based characterization of biosystem complexity*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2005. 45(2): p. 394-406.
123. Altenbach, C., et al., *A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(5): p. 1667-71.
124. Doebber, M., et al., *Salt-driven equilibrium between two conformations in the HAMP domain from Natronomonas pharaonis - The language of signal transfer?* Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(42): p. 28691-28701.
125. Bertrand, P., *La Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique*, ed. G. sciences. 2011, Grenoble: EDP Sciences.
126. Rabenstein, M.D. and Y.-K. Sgin, *Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. 92: p. 8239-8243.
127. Steinhoff, H.J., et al., *Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: Comparison of electron paramagnetic resonance data with the x-ray structure*. Biophysical Journal, 1997. 73(6): p. 3287-3298.

Bibliographie

128. Schweiger, A. and G. Jeschke, *Principles of pulse electron resonance*, O.U. Press, Editor. 2005: New York.
129. Jeschke, G., in *Biological Magnetic Resonance*, Kluwer, Editor. 2001: New York.
130. Pannier, M., et al., *Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2000. 142(2): p. 331-340.
131. Jeschke, G., et al., *DeerAnalysis2006 - a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data*. *Applied Magnetic Resonance*, 2006. 30(3-4): p. 473-498.
132. Perozo, E., D.M. Cortes, and L.G. Cuello, *Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating*. *Science*, 1999. 285(5424): p. 73-78.
133. Tiebel, B., et al., *Domain motions accompanying Tet repressor induction defined by changes of interspin distances at selectively labeled sites*. *J Mol Biol*, 1999. 290(1): p. 229-40.
134. Mollaaghababa, R., et al., *Time-Resolved Site-Directed Spin-Labeling Studies of Bacteriorhodopsin: Loop-Specific Conformational Changes in M⁺*. *Biochemistry*, 2000. 39(5): p. 1120-1127.
135. Steinhoff, H.J., et al., *TIME-RESOLVED DETECTION OF STRUCTURAL-CHANGES DURING THE PHOTOCYCLE OF SPIN-LABELED BACTERIORHODOPSIN*. *Science*, 1994. 266(5182): p. 105-107.
136. Belle, V., et al., *Probing the opening of the pancreatic lipase lid using site-directed spin labeling and EPR spectroscopy*. *Biochemistry*, 2007. 46(8): p. 2205-2214.
137. Ranaldi, S., et al., *Lid Opening and Unfolding in Human Pancreatic Lipase at Low pH Revealed by Site-Directed Spin Labeling EPR and FTIR Spectroscopy*. *Biochemistry*, 2009. 48(3): p. 630-638.
138. Polverini, E., et al., *Electron paramagnetic resonance spectroscopy and molecular modelling of the interaction of myelin basic protein (MBP) with calmodulin (CaM)--diversity and conformational adaptability of MBP CaM-targets*. *Journal of Structural Biology*, 2004. 148(3): p. 353-369.
139. Hanson, S.M., et al., *Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(13): p. 4900-4905.
140. Crane, J.M., et al., *Mapping of the docking of SecA onto the chaperone SecB by site-directed spin labeling: Insight into the mechanism of ligand transfer during protein export*. *Journal of Molecular Biology*, 2005. 353(2): p. 295-307.
141. Ranaldi, S., et al., *Amplitude of Pancreatic Lipase Lid Opening in Solution and Identification of Spin Label Conformational Subensembles by Combining Continuous*

- Wave and Pulsed EPR Spectroscopy and Molecular Dynamics*. *Biochemistry*, 2010. 49(10): p. 2140-2149.
142. Park, S.-Y., et al., *Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. 13(5): p. 400-407.
143. Grote, M., et al., *Transmembrane Signaling in the Maltose ABC Transporter MalFGK2-E*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(26): p. 17521-17526.
144. Borovykh, I.V., et al., *Distance between a native cofactor and a spin label in the reaction centre of Rhodobacter sphaeroides by a two-frequency pulsed electron paramagnetic resonance method and molecular dynamics simulations*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2006. 180(2): p. 178-185.
145. Matthews, B.W., *Studies on Protein Stability With T4 Lysozyme*, in *Advances in Protein Chemistry*, F.M.R.J.T.E. C.B. Anfinsen and S.E. David, Editors. 1995, Academic Press. p. 249-278.
146. Alber, T., et al., *Temperature-sensitive mutations of bacteriophage T4 lysozyme occur at sites with low mobility and low solvent accessibility in the folded protein*. *Biochemistry*, 1987. 26(13): p. 3754-3758.
147. Weaver, L.H. and B.W. Matthews, *Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7 Å resolution*. *Journal of Molecular Biology*, 1987. 193(1): p. 189-199.
148. Hubbell, W.L., et al., *Watching proteins move using site-directed spin labeling*. *Structure*, 1996. 4(7): p. 779-83.
149. McHaourab, H.S., et al., *Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics*. *Biochemistry*, 1996. 35(24): p. 7692-704.
150. Langen, R., et al., *Crystal structures of spin labeled T4 lysozyme mutants: implications for the interpretation of EPR spectra in terms of structure*. *Biochemistry*, 2000. 39(29): p. 8396-405.
151. McHaourab, H.S., et al., *Conformation of T4 lysozyme in solution. Hinge-bending motion and the substrate-induced conformational transition studied by site-directed spin labeling*. *Biochemistry*, 1997. 36(2): p. 307-316.
152. Zhang, Z., et al., *Multifrequency Electron Spin Resonance Study of the Dynamics of Spin Labeled T4 Lysozyme*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010. 114(16): p. 5503-5521.
153. Columbus, L., et al., *Molecular motion of spin labeled side chains in alpha-helices: analysis by variation of side chain structure*. *Biochemistry*, 2001. 40(13): p. 3828-46.
154. Fleissner, M.R., et al., *Site-directed spin labeling of a genetically encoded unnatural amino acid*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(51): p. 21637-21642.

Bibliographie

155. Fleissner, M.R., D. Cascio, and W.L. Hubbell, *Structural origin of weakly ordered nitroxide motion in spin-labeled proteins*. *Protein Science*, 2009. 18(5): p. 893-908.
156. Bridges, M.D., K. Hideg, and W.L. Hubbell, *Resolving Conformational and Rotameric Exchange in Spin-Labeled Proteins Using Saturation Recovery EPR*. *Applied Magnetic Resonance*, 2010. 37(1-4): p. 363-390.
157. König, B., et al., *Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. 86(18): p. 6878-6882.
158. Farahbakhsh, Z.T., et al., *Mapping Light-Dependent Structural Changes in the Cytoplasmic Loop Connecting Helices C and D in Rhodopsin: A Site-Directed Spin Labeling Study*. *Biochemistry*, 1995. 34(27): p. 8812-8819.
159. Altenbach, C., et al., *Structural Features and Light-Dependent Changes in the Cytoplasmic Interhelical E-F Loop Region of Rhodopsin: A Site-Directed Spin-Labeling Study†*. *Biochemistry*, 1996. 35(38): p. 12470-12478.
160. Farrens, D.L., et al., *Requirement of Rigid-Body Motion of Transmembrane Helices for Light Activation of Rhodopsin*. *Science*, 1996. 274(5288): p. 768-770.
161. Altenbach, C., et al., *High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. 105(21): p. 7439-7444.
162. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
163. Lowry, O.H., et al., *PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT*. *Journal of Biological Chemistry*, 1951. 193(1): p. 265-275.
164. Habchi, J., et al., *Monitoring structural transitions in IDPs by site-directed spin labeling*, in *"Methods in Molecular Biology": Experimental Tools for the Intrinsically Disordered Proteins Analysis*, V.N. Uversky and A.K. Dunker, Editors. A paraître, Humana Press.
165. Strancar, J., *Eprsim-c: A spectral analysis package*, in *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*, M.A. Hemminga and L.J. Berliner, Editors. 2007, Kluwer Academic/Plenum Publ: New York. p. 323-341.
166. Guigliarelli, B., et al., *EPR and redox characterization of iron-sulfur centers in nitrate reductases A and Z from Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1992. 207(1): p. 61-68.
167. Blasco, F., et al., *NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1998. 28(3): p. 435-447.

Bibliographie

168. Bertero, M.G., et al., *Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A*. Nature Structural Biology, 2003. 10(9): p. 681-687.
169. Jormakka, M., et al., *Architecture of NarGH Reveals a Structural Classification of Mo-bisMGD Enzymes*. Structure, 2004. 12(1): p. 95-104.
170. Blasco, F., et al., *Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 1992. 6(2): p. 209-219.
171. Blasco, F., et al., *Involvement of the narJ or narW gene product in the formation of active nitrate reductase in Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 1992. 6(2): p. 221-230.
172. Vergnes, A., et al., *Involvement of the Molybdenum Cofactor Biosynthetic Machinery in the Maturation of the Escherichia coli Nitrate Reductase A*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(40): p. 41398-41403.
173. Vergnes, A., et al., *NarJ chaperone binds on two distinct sites of the apoferritin reductase of Escherichia coli to coordinate molybdenum cofactor insertion and assembly*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(4): p. 2170-2176.
174. Turner, R.J., A.L. Papish, and F. Sargent, *Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs)*. Canadian Journal of Microbiology, 2004. 50(4): p. 225-238.
175. Kirillova, O., et al., *An extremely SAD case: structure of a putative redox-enzyme maturation protein from Archaeoglobus fulgidus at 3.4 Å resolution*. Acta Crystallographica Section D, 2007. 63(3): p. 348-354.
176. Qiu, Y., et al., *The 1.38 Å crystal structure of DmsD protein from Salmonella typhimurium, a proofreading chaperone on the Tat pathway*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008. 71(2): p. 525-533.
177. Tranier, S., et al., *A Novel Protein Fold and Extreme Domain Swapping in the Dimeric TorD Chaperone from Shewanella massilia*. Structure, 2003. 11(2): p. 165-174.
178. Zakian, S., et al., *Basis of recognition between the NarJ chaperone and the N-terminus of the NarG subunit from Escherichia coli nitrate reductase*. Febs Journal, 2010. 277(8): p. 1886-1895.
179. Blasco, F., et al., *The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001. 58(2): p. 179-193.
180. Rothery, R.A., et al., *The Diheme Cytochrome b Subunit (NarI) of Escherichia coli Nitrate Reductase A (NarGHI): Structure, Function, and Interaction with Quinols*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001. 3(2): p. 273-283.

Bibliographie

181. Dubourdieu, M. and J.A. DeMoss, *The narJ gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1992. 174(3): p. 867-872.
182. Maillard, J., et al., *Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104(40): p. 15641-15646.
183. Olmo-Mira, M.F., et al., *NapF Is a Cytoplasmic Iron-Sulfur Protein Required for Fe-S Cluster Assembly in the Periplasmic Nitrate Reductase*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(48): p. 49727-49735.
184. Boehr, D.D., R. Nussinov, and P.E. Wright, *The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition*. Nat Chem Biol, 2009. 5(11): p. 789-796.
185. Bassham, J.A., A.A. Benson, and M. Calvin, *THE PATH OF CARBON IN PHOTOSYNTHESIS*. Journal of Biological Chemistry, 1950. 185(2): p. 781-787.
186. Gontero, B., L. Avilan, et al, *Control of Carbon Fixation in Chloroplasts*, in *Control of primary metabolism in plants. Annual Plant Reviews, Volume 22*. 2006, Oxford: Blackwell Publishing.
187. Avilan, L., et al., *Memory and Imprinting Effects in Multienzyme Complexes*. European Journal of Biochemistry, 1997. 246(1): p. 78-84.
188. Scheibe, R., et al., *Co-existence of two regulatory NADP-glyceraldehyde 3-P dehydrogenase complexes in higher plant chloroplasts*. European Journal of Biochemistry, 2002. 269(22): p. 5617-5624.
189. Howard, T.P., et al., *Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(10): p. 4056-4061.
190. Marri, L., et al., *Reconstitution and Properties of the Recombinant Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase/CP12/Phosphoribulokinase Supramolecular Complex of Arabidopsis*. Plant Physiology, 2005. 139(3): p. 1433-1443.
191. Oesterhelt, C., et al., *Redox Regulation of Chloroplast Enzymes in Galdieria sulphuraria in View of Eukaryotic Evolution*. Plant and Cell Physiology, 2007. 48(9): p. 1359-1373.
192. Lebreton, S., E. Graciet, and B. Gontero, *Modulation, via Protein-Protein Interactions, of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Activity through Redox Phosphoribulokinase Regulation*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(14): p. 12078-12084.
193. Graciet, E., et al., *Characterization of native and recombinant A4 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*. Eur J Biochem, 2003. 270(1): p. 129-36.

Bibliographie

194. Wedel, N., J. Soll, and B.K. Paap, *CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. 94(19): p. 10479-10484.
195. Linding, R., R.B. Russel, et al, *GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder*. Nucleic Acid Research, 2003. 31(13): p. 3701-3708.
196. Linding, R., et al., *Protein Disorder Prediction: Implications for Structural Proteomics*. Structure, 2003. 11(11): p. 1453-1459.
197. Ward, J.J., et al., *Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life*. Journal of Molecular Biology, 2004. 337(3): p. 635-645.
198. Gardebien, F., et al., *Construction of a 3D model of CP12, a protein linker*. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2006. 25(2): p. 186-195.
199. Falini, G., et al., *Dual Coenzyme Specificity of Photosynthetic Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Interpreted by the Crystal Structure of A4 Isoform Complexed with NAD⁺*. Biochemistry, 2003. 42(16): p. 4631-4639.
200. Graciet, E., et al., *Involvement of two positively charged residues of Chlamydomonas reinhardtii glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the assembly process of a bi-enzyme complex involved in CO assimilation*. Eur J Biochem, 2004. 271(23-24): p. 4737-44.
201. Baalman, E., et al., *Functional studies of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunits A and B expressed in Escherichia coli: formation of highly active A4 and B4 homotetramers and evidence that aggregation of the B4 complex is mediated by the B subunit carboxy terminus*. Plant Molecular Biology, 1996. 32(3): p. 505-513.
202. Tamoi, M., et al., *The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions*. The Plant Journal, 2005. 42(4): p. 504-513.
203. Eroles, J., et al., *Molecular Mechanism of NADPH-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Regulation through the C-Terminus of CP12 in Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemistry, 2011. 50(14): p. 2881-2888.
204. Sparla, F., et al., *Regulation of Photosynthetic GAPDH Dissected by Mutants*. Plant Physiology, 2005. 138(4): p. 2210-2219.
205. Lebreton, S., et al., *Mapping of the interaction site of CP12 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Journal, 2006. 273(14): p. 3358-3369.
206. Sparla, F., et al., *Coenzyme Site-directed Mutants of Photosynthetic A4-GAPDH Show Selectively Reduced NADPH-dependent Catalysis, Similar to Regulatory AB-GAPDH*

- Inhibited by Oxidized Thioredoxin*. Journal of Molecular Biology, 2004. 340(5): p. 1025-1037.
207. Sparla, F., P. Pupillo, and P. Trost, *The C-terminal Extension of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Subunit B Acts as an Autoinhibitory Domain Regulated by Thioredoxins and Nicotinamide Adenine Dinucleotide*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(47): p. 44946-44952.
208. Eroles, J., S. Lignon, and B. Gontero, *CP12 from Chlamydomonas reinhardtii, a Permanent Specific "Chaperone-like" Protein of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*. Journal of Biological Chemistry, 2009. 284(19): p. 12735-12744.
209. Eroles, J., et al., *A New Function of GAPDH from Chlamydomonas reinhardtii: A Thiol-Disulfide Exchange Reaction with CP12*. Biochemistry, 2009. 48(25): p. 6034-6040.
210. Delobel, A., et al., *Mass spectrometric analysis of the interactions between CP12, a chloroplast protein, and metal ions: a possible regulatory role within a PRK/GAPDH/CP12 complex*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. 19(22): p. 3379-3388.
211. Sriram, G., et al., *Single-Gene Disorders: What Role Could Moonlighting Enzymes Play?* The American Journal of Human Genetics, 2005. 76(6): p. 911-924.
212. Schürmann, P. and B.B. Buchanan, *The Ferredoxin/Thioredoxin System of Oxygenic Photosynthesis*. Antioxidants & Redox Signaling, 2008. 10(7): p. 1235-1274.
213. Michelet, L., et al., *Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore*. Photosynthesis Research, 2006. 89(2): p. 225-245.
214. Rouhier, N., S.D. Lemaire, and J.-P. Jacquot, *The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation*. Annual Review of Plant Biology, 2008. 59(1): p. 143-166.
215. Brustad, E.M., et al., *A General and Efficient Method for the Site-Specific Dual-Labeling of Proteins for Single Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Journal of the American Chemical Society, 2008. 130(52): p. 17664-17665.
216. Best, M.D., *Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules*. Biochemistry, 2009. 48(28): p. 6571-6584.
217. Antos, J.M. and M.B. Francis, *Selective Tryptophan Modification with Rhodium Carbenoids in Aqueous Solution*. Journal of the American Chemical Society, 2004. 126(33): p. 10256-10257.
218. Ban, H., J. Gavriilyuk, and C.F. Barbas, *Tyrosine Bioconjugation through Aqueous Ene-Type Reactions: A Click-Like Reaction for Tyrosine*. Journal of the American Chemical Society, 2010. 132(5): p. 1523-1525.

Bibliographie

219. McFarland, J.M., N.S. Joshi, and M.B. Francis, *Characterization of a Three-Component Coupling Reaction on Proteins by Isotopic Labeling and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. 130(24): p. 7639-7644.
220. Mannich, C. and W. Krösche, *Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin*. *Archiv der Pharmazie*, 1912. 250(1): p. 647-667.
221. Tramontini, M. and L. Angiolini, *Further advances in the chemistry of mannich bases*. *Tetrahedron*, 1990. 46(6): p. 1791-1837.
222. Lorenzi, M., et al., *Tyrosine-Targeted Spin Labeling and EPR Spectroscopy: An Alternative Strategy for Studying Structural Transitions in Proteins*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011. 50(39): p. 9108-9111.
223. Hubell, W.L. and C. Altenbach, *Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling*. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1994. 4: p. 566-573.
224. Mchaourab, H.S., et al., *Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme: effect of side chain structure*. *Biochemistry*, 1999. 38(10): p. 2947-55.

