



HAL
open science

Le complexe de la NADPH oxydase : études structurales des facteurs cytosoliques.

Virginie Dubosclard

► To cite this version:

Virginie Dubosclard. Le complexe de la NADPH oxydase : études structurales des facteurs cytosoliques.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2004. Français. NNT : . tel-00011537

HAL Id: tel-00011537

<https://theses.hal.science/tel-00011537v1>

Submitted on 4 Feb 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
SCIENCE & GÉOGRAPHIE

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique

Présentée et soutenue publiquement par

Virginie DUBOSCLARD

Le 12 Juillet 2004

LE COMPLEXE DE LA NADPH OXYDASE : ÉTUDES STRUCTURALES DES
FACTEURS CYTOSOLIQUES

Composition du jury

Président	Mme Dominique Durand
Rapporteurs	Mme Catherine Vénien-Bryan Mme Dominique Durand
Examineur	Mme Marie-Claire Dagher
Directeurs de thèse	M Jean-François Legrand Mme Eva Pebay-Peyroula

Thèse préparée au Laboratoire Structure et Propriétés des Architectures Moléculaires et à
l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre EBEL

Savez je suis docteur et pour couronner le tout docteur es physique !

Tout cela a été possible grâce à un soutien sans faille de mes parents, de mes sœurs, et du reste de la maisonnée et dans la dernière ligne droite, Yves. Merci à tous !

Mais, je ne dois pas oublier de remercier le jury : Mesdames Dominique Durand, Catherine Vénien-Bryan et Marie-Claire Dagher, d'avoir accepté de porter leur œil critique sur ces trois années de travail.

Eva Pebay-Peyroula et Jean-François Legrand m'ont permis au cours de cette thèse de découvrir de nombreuses approches et d'apprendre qu'il n'y avait pas que la cristallographie de rayons X dans la vie de la Biologie Structurale. Merci à eux deux de m'avoir offert cette opportunité.

Ce travail a été rendu possible grâce à l'aide de Franck Fieschi pour toute la partie biochimie et biologie moléculaire, à Claudine Cohen-Addad pour la cristallogénèse, Laurence Serre pour la cristallographie, les David's pour les analyses de spectro de masse, Laurence Martel pour l'ellipsométrie, Mari-Claire Dagher pour ses échantillons de protéines et Jean-Pierre Andrieu pour les séquençages.

Enfin, je tiens à remercier Patrick Bron de m'avoir accueillie dans son laboratoire et initiée à la microscopie électronique, Patrice Vachette et Dominique Durand pour la diffusion aux petits angles . Un grand merci à Dominique pour ses explications et corrections du chapitre petits angles de cette thèse.

Au cours de ces trois ans, mon chemin a croisé celui de beaucoup de monde et si maintenant j'en oublie toutes mes excuses. Je commencerai par remercier le LPM d'avoir recueilli une « pauvre biochimiste » qui se sentait un peu seule dans son labo de physicien. Merci à Sylvie non seulement pour nos discussions NADPH oxydase (elle nous en aura fait voir...) et pour nos délires (...), tu tiens le bon bout. Merci à Corinne (je crois que je suis parée pour les clonages...), Eve, Dominique, Anne, Hugues (bon courage pour la thèse...), Laurence et puis tous les autres....Manou (der man suiss ...), Béber (ton flegme nous a parfois énervé avec Sylvie), Richard (j'ai un problème ...), Laurence, Laurent.....

A tous bonne route !!!

Quelle merveille la page blanche...

E.D.

Liste des abréviations	11
Introduction générale.....	13
LE COMPLEXE DE LA NADPH OXYDASE	15
I. Le système immunitaire	17
II. Destruction des agents pathogènes par les neutrophiles.....	17
1. Les neutrophiles	17
2. Destruction du contenu du phagosome par le complexe de la NADPH oxydase.....	18
III. Le complexe de la NADPH oxydase.....	19
1. Dysfonctionnement du complexe de la NADPH oxydase.....	20
2. Les différents domaines structuraux.....	20
3. Les protéines membranaires.....	26
4. Les facteurs cytosoliques.....	27
IV. Structures des facteurs cytosoliques et interactions.	30
1. Les domaines PX de p47 ^{phox} et p40 ^{phox}	30
2. Les connaissances structurales de p47 ^{phox}	31
3. La structure de p67TPR seul et en complexe avec Rac	33
4. Les interactions entre les facteurs cytosoliques.....	35
5. L'interaction PB1-PB1.....	36
6. L'interaction SH3-p47 ^{phox} avec PP-p22 ^{phox}	37
V. Études en solution des facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase.....	38
VI. Combinaison d'approches pour obtenir des structures de macromolécules.....	40
VII. Sujet de thèse.....	41
PRODUCTION DES PROTÉINES	45
I. Introduction générale.....	47
II. p47	48
1. Présentation	48
2. Expression et purification des différentes constructions	49
3. Caractérisation par chromatographie d'exclusion des différentes constructions de p47	61
III. p47 Cter.....	64
1. Présentation	64
2. Expression et purification.....	65
3. Analyses quantitatives et caractérisation.....	67
IV. p67	69
1. Présentation	69
2. Expression et purification.....	69
3. Analyses quantitatives et caractérisation.....	71
V. p67 TPR et p67 Nter	73
1. Présentation	73
2. Expression et purification.....	74
3. Caractérisation des différentes formes	75
4. Stabilité de p67Nter.....	78

VI. p40 Cter	80
1. Présentation	80
2. Expression et purification	80
3. Analyses quantitatives et caractérisation	82

ÉTUDE PAR CRISTALLOGRAPHIE DES RAYONS X DES FACTEURS CYTOSOLIQUES DU COMPLEXE DE LA NADPH OXYDASE 87

I. Introduction générale 89

II. Principe général 89

1. La cristallisation	90
2. Enregistrements des données de diffraction	95
3. Traitements des données de diffraction	97

III. Les facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase..... 101

1. Introduction	101
2. Étude structurale du domaine PB1 de p40.....	101
3. Étude structurale de p67Nter	103

ÉTUDE DES FACTEURS CYTOSOLIQUES DU COMPLEXE DE LA NADPH OXYDASE À L'INTERFACE AIR-EAU. 111

I. Introduction générale 113

II. Monocouches de protéines à l'interface air-eau. 113

1. Principe général de formation des monocouches.	113
2. Les lipides	114
3. Formation des monocouches	117

III. Microscopie électronique 118

1. Les différentes étapes de la microscopie électronique	118
2. Les avantages de la microscopie électronique.....	121
3. Stratégie pour l'étude des facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase.....	123
4. Les conditions expérimentales.	124
5. Résultats	128
6. Vers la cristallisation des complexes.....	133
7. Conclusions et perspectives.....	133

IV. Caractérisation des monocouches 134

1. Introduction	134
2. Principe général de l'ellipsométrie.....	135
3. Montage expérimental	137
4. Les conditions testées.....	138
5. Résultats	138
6. Conclusions et perspectives.....	142

ÉTUDE DES FACTEURS CYTOSOLIQUES DU COMPLEXE DE LA NADPH OXYDASE EN SOLUTION..... 145

I. Principe de la diffusion des rayons X par la matière..... 147

II. Diffusion aux petits angles de protéines en solution..... 148

1. Théorie	148
2. Paramètres structuraux	149

III. Diffusion aux petits angles des facteurs cytosoliques p47 et p67 du complexe NADPH oxydase..... 156

1. Le dispositif expérimental	156
2. Les conditions expérimentales	157
3. Diffusion aux petits angles de p47.	159
4. Diffusion aux petits angles de p67.	164
IV. Détermination de distances intramoléculaires dans p47.	170
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.	177
I. Conclusions.	179
1. Étude des domaines PB1-p40 et p67Nter par cristallographie des rayons X.	179
2. Études des facteurs cytosoliques entiers du complexe de la NADPH oxydase.	180
II. Perspectives.	182
ANNEXES	185
BIBLIOGRAPHIE	199

Liste des abréviations

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

ITC : isothermal titration calorimetry

RMN : résonance magnétique nucléaire

N-His/ C-His : séquence de polyhistidine respectivement à l'extrémité N et C-terminale

MBP : maltose binding protein

GST : glutathion S-transférase

Ni-NTA : nickel nitrilotriacétate

SDS-PAGE : gel d'acrylamide en condition dénaturante

HEPES : acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(éthanesulfonique)

Tris :tris (hydroxyméthyl) aminoéthane

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

DTT :1-4-dithiothréitol

u.a. : unité arbitraire

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactoside

CGD : Chronic Granulomatous Disease

Introduction générale

Cette thèse a été réalisée en collaboration entre le laboratoire « Structure et Propriétés des Architectures Moléculaires du CEA-Grenoble » et le « Laboratoire des Protéines Membranaires de l'Institut de Biologie Structurale, Grenoble ».

Le complexe de la NADPH oxydase est un complexe multi-protéique impliqué dans la défense immunitaire non spécifique. Il se décompose en deux parties : une partie membranaire de deux protéines, gp 91^{phox} et p22^{phox} et une partie cytosolique avec trois protéines p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à ces trois facteurs cytosoliques. Ce sont des protéines modulaires : toutes les données structurales connues au début de ce travail concernaient des domaines isolés. Cependant, la connaissance des structures des facteurs cytosoliques entiers seuls et en complexe permettrait de mieux comprendre la dynamique des interactions du complexe mises en jeu lors de son activation et de sa désactivation. Une première approche envisagée pour obtenir des informations structurales sur les facteurs cytosoliques entiers a été la cristallisation bidimensionnelle sur des monocouches de lipides à l'interface air/eau et la microscopie électronique. Mais devant les difficultés rencontrées, nous nous sommes orientées vers une étude en solution des facteurs cytosoliques par diffusion des rayons X aux petits angles. Ces deux approches ont été utilisées car elles permettent d'obtenir des enveloppes des protéines dans lesquelles il sera possible de replacer les différentes structures connues des domaines isolés. Parallèlement, la cristallographie des rayons X sur deux domaines des facteurs cytosoliques alors inconnus a été entreprise.

Avant de présenter ces différents aspects du travail, nous introduirons le complexe de la NADPH oxydase, puis nous établirons un bilan des connaissances à l'heure actuelle.

Le complexe de la NADPH oxydase

I. Le système immunitaire

Un organisme vivant est perpétuellement soumis à des agressions extérieures par des agents pathogènes comme les bactéries ou les virus. Sa défense est assurée par les globules blancs ou leucocytes. Cette lignée cellulaire responsable de la défense immunitaire est composée par cinq types de cellules différentes : les monocytes, les granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles et les lymphocytes. Elles permettent le fonctionnement de deux types d'immunité : spécifique et non spécifique qui interviennent simultanément. Le système immunitaire spécifique permet la reconnaissance et l'élimination d'organismes étrangers, par exemple certaines souches du virus de la grippe. La réaction de défense va se traduire par la production de cellules lymphocytes spécialisées et d'anticorps : ceci est déclenché par les antigènes présents sur l'agresseur. Chacune des réactions de ce système agit contre une cible spécifique la reconnaissant au milieu des autres, ceci la différencie du système immunitaire non spécifique. La défense non spécifique de l'organisme contre un agent pathogène fait intervenir des leucocytes phagocytaires ou phagocytes qui vont ingérer les agents infectieux afin de les détruire : c'est la phagocytose. Le principal acteur de ce système de défense est le granulocyte neutrophile (neutrophile) qui représente plus de 60% de la population leucocytaire. Les systèmes immunitaires spécifiques et non spécifiques agissent en étroit rapport l'un avec l'autre. Nous allons dans un premier temps décrire les neutrophiles ainsi que leur fonctionnement.

II. Destruction des agents pathogènes par les neutrophiles

1. Les neutrophiles

Les neutrophiles appartiennent à la lignée granulocytaire des leucocytes. Ces cellules ont pour caractéristique un noyau polylobé et la présence de granules dans le cytoplasme (Figure 1). De plus, elles possèdent la capacité à quitter le compartiment vasculaire afin de

migrer vers le foyer infectieux. Des trois représentants de la famille des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), les neutrophiles sont les principaux acteurs de la phagocytose, les deux autres intervenant dans la réponse allergique et la lutte contre les infections parasitaires.

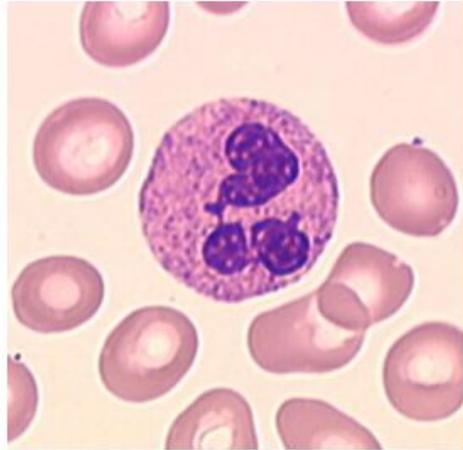


Figure 1: Granulocyte neutrophile entouré d'hématies. La partie plus sombre à l'intérieur du neutrophile est le noyau polylobé.

La destruction d'un agent infectieux par les neutrophiles passe tout d'abord par sa phagocytose. Lors d'une infection, les neutrophiles sont attirés par des médiateurs chimiques, ils vont donc quitter la circulation sanguine et migrer vers le foyer infectieux. À ce niveau, l'agent infectieux a été préalablement préparé : sa surface est recouverte d'opsonines par le système immunitaire spécifique. Les neutrophiles possèdent à leur surface des récepteurs aux anticorps de type IgG et aux protéines du complément. Ceux-ci leur permettent de reconnaître l'agent infectieux et de s'attacher dessus. La phagocytose se fait ensuite par l'intermédiaire de l'invagination de la membrane du neutrophile.

2.Destruction du contenu du phagosome par le complexe de la NADPH oxydase.

Suite à l'internalisation de l'agent pathogène par les neutrophiles, le phagosome formé doit être ensuite détruit. Pour cela, le neutrophile synthétise des espèces dérivées de l'oxygène : l'eau oxygénée (H_2O_2) puis de l'eau de javel ($HOCl$). Elles sont formées à partir d'ions superoxydes (O_2^-), eux-mêmes produits au sein d'un complexe multi-protéique, le

complexe de la NADPH oxydase (Figure 2). Il s'agit d'une enzyme qui permet la réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire en ion superoxyde. Le donneur d'électrons est le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit). La formation des ions superoxydes consiste en un transfert d'électrons du NADPH à l'oxygène O_2 selon la réaction suivante : $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^-$

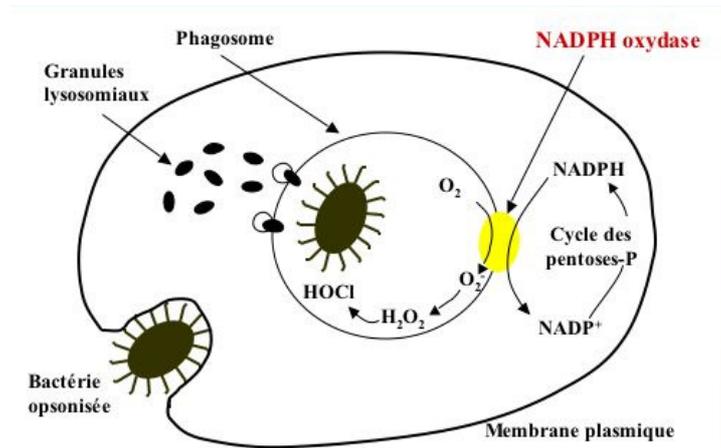


Figure 2: Destruction d'une bactérie par un neutrophile. Par invagination de la membrane plasmique du neutrophile, l'agent infectieux est ingéré. Ceci entraîne la formation du phagosome et d'espèces réactives dérivées de l'oxygène.

Les espèces dérivées de l'oxygène produites sont fortement réactives et vont permettre la destruction de l'agent pathogène. Toutes les protéines de ce complexe sont présentes dans la cellule mais ce n'est que lorsqu'elles s'assemblent de façon spécifique que se déclenche la production d'ions superoxydes. De cette façon, la réponse d'un organisme à une agression est précise et rapide. La compréhension du mécanisme d'assemblage et le rôle des différents partenaires sont à la base de notre étude.

III. Le complexe de la NADPH oxydase

Le complexe de la NADPH oxydase est un complexe multi-protéique composé de deux protéines membranaires ($gp91^{phox}$, $p22^{phox}$) et de trois facteurs cytosoliques ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$) ainsi que de la petite protéine G dénommée Rac. La dénomination phox

indique la fonction dans laquelle intervient le complexe de la NADPH oxydase : **phagocyte oxydase**. Dans les trois protéines cytosoliques, des domaines structuraux ont été identifiés. Nous allons dans un premier temps nous attacher à les décrire, puis la composition et le rôle des différentes protéines au sein du complexe de la NADPH oxydase seront présentés.

1.Dysfonctionnement du complexe de la NADPH oxydase.

Le complexe de la NADPH oxydase est donc responsable de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Une dérégulation du système est responsable de dommages tissulaires comme l'arthrite rhumatoïde ou certaines formes de glomérulonéphrites. L'absence ou un très faible niveau d'activité du complexe NADPH oxydase est due à des mutations des gènes codant pour un des composants du complexe. Elles sont responsables d'un syndrome d'immunodéficience du système immunitaire non spécifique : la granulomatose septique chronique (CGD). Les espèces réactives dérivées des ions superoxydes sont importantes pour la destruction des pathogènes. Par conséquent, les patients atteints de CGD sont touchés par de sévères infections. Dans la majorité des cas, les mutations responsables ont lieu sur le gène codant pour gp91^{phox}, les facteurs cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} ainsi que p22^{phox} sont aussi impliqués dans la CGD. Les différents types de CGD existant sont décrits dans la revue de Heyworth [Heyworth et al, 2003].

2.Les différents domaines structuraux.

Les trois facteurs cytosoliques sont des protéines constituées de différents modules structuraux. Nous allons dans un premier temps décrire ces motifs avant d'expliciter les différentes fonctions des facteurs cytosoliques, p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox}. Les modules ont été identifiés sur la base d'alignement de séquences, et adoptent un repliement caractéristique indépendant du reste de la protéine. Au niveau des facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase cinq motifs structuraux différents sont présents :

- PX pour *Phox domain*
- SH3 pour *Src Homology domain 3*,

le domaine SH3 est influencée par la présence d'un résidu chargé positivement avant ou après le motif central PXXP. Ce résidu qui est souvent une arginine va former un pont salin avec un résidu acide conservé au niveau de la boucle RT. Ainsi, le motif (R/K)XXPXXP correspond à une orientation « plus » et le motif PXXPX(R/K) à l'orientation « moins ». Un exemple de l'interaction dans l'orientation « moins » est montré à la Figure 4. Il s'agit de l'interaction entre le domaine SH3-p40^{phox} et le motif PP-p47^{phox}.

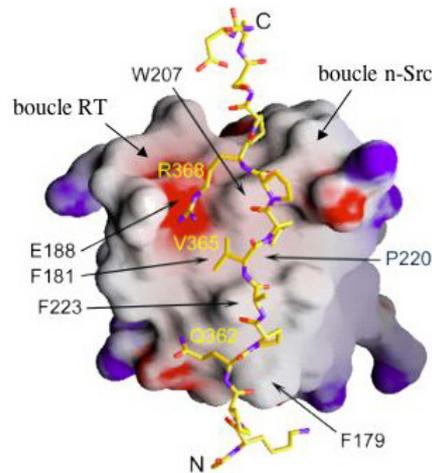


Figure 4 : Complexe SH3-p40^{phox}/PP-p47^{phox} : la surface moléculaire de SH3-p40^{phox} avec son potentiel électrostatique (en bleu sont représentées les surfaces chargées positivement, en rouge celles chargées négativement) et structure du PP-p47^{phox}. Les résidus impliqués dans l'interaction sont notés en noir pour SH3-p40^{phox} et en jaune pour PP-p47^{phox} [Massenet, 2002].

b) Domaine PX.

Les domaines PX (*phox domain*) sont capables d'interagir avec des phosphatidyl inositols [Wishart et al, 2001], lipides présents dans la membrane cellulaire. Ils ont été mis en évidence par homologies de séquences entre les phosphatidyl inositols 3 kinases de classe Cpk, les homologues des « sorting nexin » (SNX1), p47^{phox} et p40^{phox} par Ponting en 1996 [Ponting et al, 1996]. L'alignement des séquences des domaines PX de ces protéines montre la conservation d'une dizaine de résidus.

```

          141      150      160      170      180
          |        |        |        |        |
PX p40phox (2-120) DDVAISANIADIEEK-RGFTSHFVVFVIEVKTKG----GSK
PX p47phox (1-122) DTFIRHIALLGFEKR-FVPSQHYVYMFLVKWQD----LSE
SNX1_HUMAN      DQFDLTVGI TDPEKIGDGMNAYVAYKVTTQTSLPLFRSKQ
          * .      : . *:      . : .: . : . .      .:

          190      200      210      220      230      240
          |        |        |        |        |        |
PX p40phox (2-120) YLIYRRYRQPHALQSKLEERFGPDS-KSSALACTLPTLPAKVYVGVK---QEIAEMRIP
PX p47phox (1-122) KVVYRRFTEIYEFHKTLEKMFPIEAGAINPENRIIPHLPAKWFWDG----QRAAENRQG
PX SNX1_HUMAN     FAVKRRFSDFLGLYEKLESEKHSQNGFIVPPPEKSLIGMTKVKVKGKEDSSSAEFLEKRRR
          : **: : : : ..*.* . :. .      : ..      . * *

          250      260
          |        |
PX p40phox (2-120) ALNAYMKSLLSLPVVWLMDDEVRIFFYQS--
PX p47phox (1-122) TLTEYCSTLMSLPTKISRCPHLLDFFKVR--
SNX1_HUMAN      ALERYLQRIVNHPT-MLQDPDVREFLEKEEL
          :* * . :. . *. : . : * :

```

Figure 5 : Alignement de séquences de domaines PX. Les résidus strictement conservés sont notés par (*), par (:), ceux qui ont une forte similarité et par (.) ceux dont la similarité est plus faible. La numérotation est celle des résidus de la SNX1. Le domaine PP présent dans p40^{phox} et p47^{phox} est encadré. Le motif d'interaction avec les phosphatidyl inositols est surligné.

Dans la plupart des domaines PX isolés, la séquence consensus de reconnaissance d'un domaine SH3 existe : un motif de type P-X-X-P. Ceci confère donc une double fonctionnalité à un domaine PX. En effet, il est non seulement capable d'ancrer une protéine à la membrane lipidique, mais il peut aussi participer à l'assemblage des protéines au cours de la transduction du signal. Cette dernière fonction se fait par l'intermédiaire d'interaction PP-SH3. L'interaction du domaine PX à la membrane repose sur une interaction spécifique avec une poche basique formée par la séquence consensus RR(F/Y)(S)(D/E)F (surlignée en gris dans la Figure 5) et sur une interaction non spécifique avec des résidus hydrophobes conservés situés après le motif PP [Xu et al 2001].

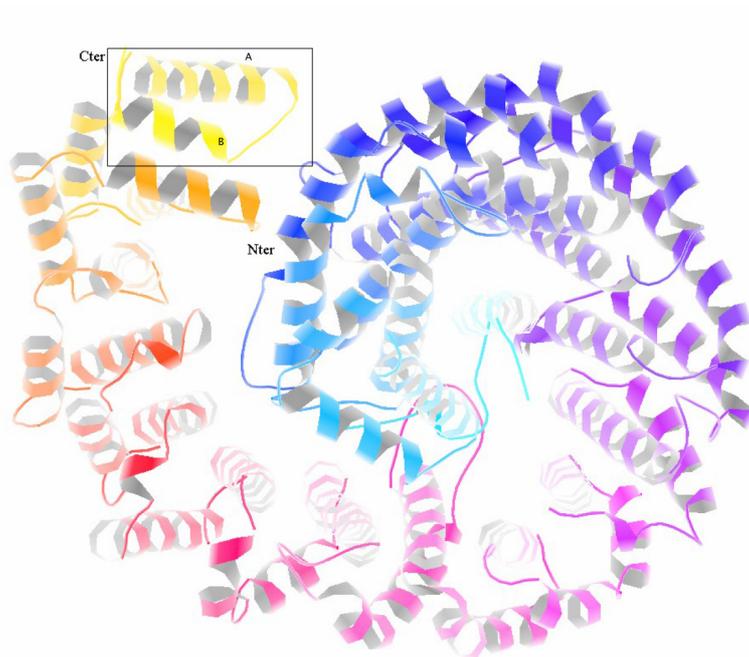


Figure 7 : Structure en super hélice droite des motifs HEAT de l'importine β . (d'après Cingolani et al, 1999, code PDB 1QGK). Les deux hélices A et B anti-parallèles dans le rectangle forment un motif TPR.

d) Le motif PC et les domaines PB1.

Le motif PC ou OPR (octicosapeptide) et désormais appelé OPCA est un motif de 28 acides aminés. Il a été mis en évidence pour la première fois dans les MAP kinases [English et al, 1995] ainsi que dans Cdc24 (protéine impliquée dans la polarité des levures) et p40^{phox} sur la base d'homologies de séquences. Ponting [Ponting et al, 1996] l'a par la suite mis en évidence dans d'autres familles de protéines telles que les protéines kinases de type C (Figure 8). Des études sur les protéines impliquées dans la polarité des cellules de la levure a permis de caractériser le partenaire du motif PC de Cdc24 au niveau de la protéine Bem1p. Ce nouveau motif structural est appelé PB1 [Ito et al, 2001]. Il existe aussi dans p67^{phox}. La structure du motif PC de Cdc24 déterminée par RMN montre un repliement de type $\beta\beta\alpha$ (voir paragraphe 6). D'après sa comparaison avec la précédente structure de PB1 [Terasawa et al 2001], les motifs PC et PB1 ont été regroupés en une seule famille sous le nom de domaine PB1 de type I pour ceux qui possèdent le motif PC (comme p40^{phox}) et de type II pour les autres (par exemple p67^{phox}) [Yoshinaga et al, 2003].

p40phox (237-329)	TNWLRCYYEDTISTIKD--IAVEEDLSSTPLLKDLELTRREFQ---RE <u>DIA</u> ----LN
Bem1p (478-551)	TTKIK-FYKDDI-----FALM--LKGDTTYKELRSKIAPRID---TDNFK----LQ
Cdc24 (761-854)	SILFRISYNNNSNNTSSSEIFLL--VEKVWNFDDLIMAINSKISNTHNNNISPITKIK
P67phox (351-429)	PYTLK-VHYKYTV-----VMK--TQPGLPYSQVRDMVSKKLELR-LEHTK----LS
	. : : : . : . : : . : . : . : . : . : . :

P40phox (237-329)	<u>YRDAEGDLVRLLSDEDVALMVRO</u> ARGLPSQKRLF PWKLHITQKD
Bem1p (478-551)	TKLFDGSGEEIKTDSQVSNI IQAKLKISVHDI-----
Cdc24 (761-854)	YQDEDGDFVVLGSDEDWN--VAKEMLAENNEKFLNIRLY-----
P67phox (351-429)	YRPRDSNELVPLSEDSMK----DAWGQVKNYCLTLWCENTV---
	: : : : : :

Figure 8 : Alignement des séquences de domaine PB1. Les résidus qui ont une forte similarité sont représentés par (:), et sont ceux qui ont une similarité plus faible par (.). Le motif PC de p40^{phox} est surligné.

3. Les protéines membranaires.

Les deux protéines, gp91^{phox} et p22^{phox}, se situent au niveau de la membrane plasmique. Elles constituent à elles deux le flavocytochrome b558 (Figure 9).

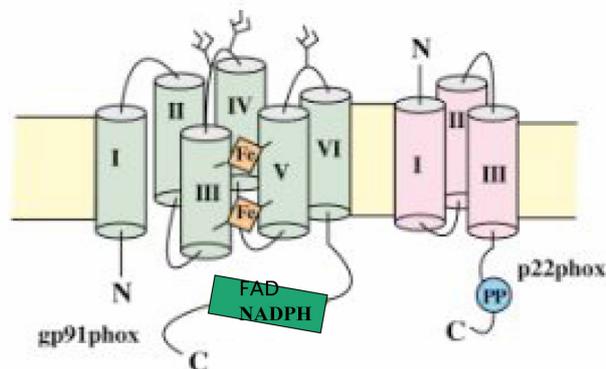


Figure 9 : Représentation du cytochrome b558 composant membranaire du complexe NADPH oxydase. Il est constitué de deux protéines gp91^{phox} et p22^{phox}.

La protéine gp91^{phox} serait formée par six hélices transmembranaires d'après le profil d'hydrophobie et elle est fortement glycosylée. De plus, elle joue un rôle important dans l'activité du complexe NADPH oxydase puisqu'elle est le site du transfert d'électrons nécessaires à la production des ions superoxydes. En effet, dans le cœur de gp91^{phox}, il existe deux groupements hèmes non identiques de bas potentiel rédox (-245 mV et -265 mV) [Yu et al, 1998]. Les six positions de coordination du fer des deux hèmes sont occupées. La partie cytosolique de gp9^{phox} du côté C-terminal lie les groupes flavine adénine dinucléotide (FAD) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Les deux hèmes et le FAD sont les intermédiaires du transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire. La protéine gp91^{phox} a besoin pour sa maturation et sa stabilisation d'une protéine, p22^{phox}. Celle-ci posséderait, d'après son profil d'hydrophobie trois hélices transmembranaires ainsi qu'une importante région C-terminale cytoplasmique. Cette dernière va interagir avec un des facteurs cytosoliques lors de l'activation du complexe par l'intermédiaire d'un domaine polyproline (PP).

4. Les facteurs cytosoliques.

Les trois facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} sont composés par les différents motifs structuraux présentés ci-dessus (Figure 10). Au sein de la NADPH oxydase, ils forment un complexe via différentes interactions intra et intermoléculaires où chaque protéine joue un rôle particulier.

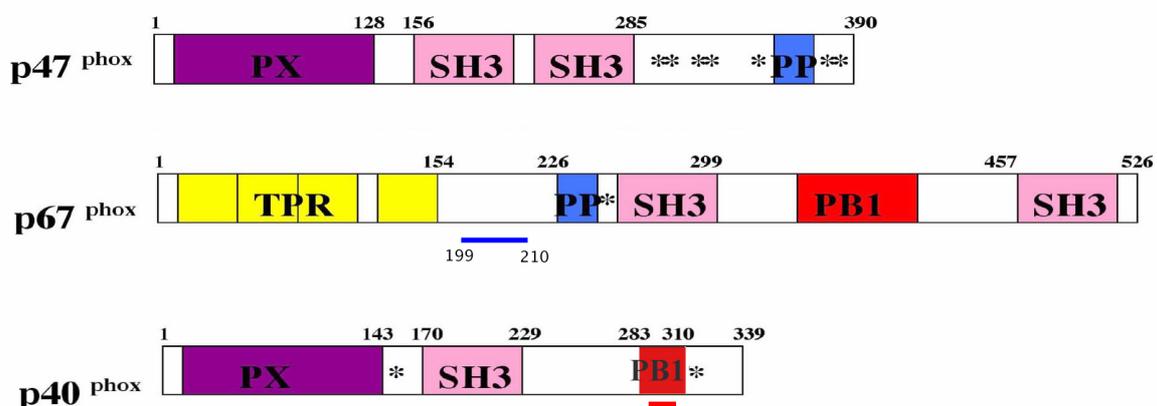


Figure 10: Représentation schématique des trois facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase. Les sites de phosphorylations sont indiqués par *. Le trait bleu au niveau de p67^{phox} représente le domaine d'activation. Le trait rouge au niveau du domaine PB1 de p40^{phox} indique le motif PC.

Nous allons expliciter la fonction de ces trois protéines au sein du complexe de la NADPH oxydase.

a) p47^{phox}

Du côté N-terminal, p47^{phox} possède un domaine PX capable d'interagir avec les phosphatidyl inositols et plus particulièrement les phosphatidyl inositols 3,4 diphosphates [Kanai et al, 2001]. En plus du domaine PX, p47^{phox} renferme deux domaines SH3 et un domaine PP. Elle possède également une forte proportion de résidus chargés positivement, notamment dans la région C-terminale. La protéine p47^{phox} est essentielle à l'activation du complexe. Elle permet le transport des trois facteurs cytosoliques à la membrane lors de l'activation du complexe. En effet, à l'état de repos, la protéine p67^{phox} serait complexée à p47^{phox} dans le cytoplasme. En l'absence de p47^{phox}, ni p67^{phox}, ni p40^{phox} ne seraient capables de migrer en direction de la membrane [Dusi et al, 1996] et par conséquent, l'activation du complexe ne pourra pas avoir lieu. Ceci pourrait expliquer certaines CGD impliquant la protéine p47^{phox}.

b) p67^{phox}

La protéine p67^{phox} est composée par quatre motifs structuraux différents. Du côté N-terminal, il existe un domaine TPR composé de quatre motifs de répétition suivi d'un PP. Deux domaines SH3 entourent un domaine PB1 du côté C-terminale. La protéine p67^{phox} intervient lors de l'activation du complexe de la NADPH oxydase comme un activateur du transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène pour former l'ion superoxyde. En effet, des expériences de mesure d'activité du complexe NADPH oxydase en milieu acellulaire avec différentes formes tronquées de p67^{phox} ont permis de mettre en évidence un domaine d'activation situé entre les résidus 199 et 210 de p67^{phox} pour le cytochrome *b558* [Han et al, 1998]. Ce domaine permet la régulation du flux d'électrons à travers gp91^{phox}. De plus, une interaction directe entre p67^{phox} et gp91^{phox} a été montrée lors de l'activation du complexe [Dang et al, 2001]. Par la suite, la même équipe a montré que le fragment 1-199 de p67^{phox} était suffisant à cette interaction mais pas au transfert d'électrons dans le complexe NADPH oxydase [Dang et al, 2002]. Enfin, dans le rôle de p67^{phox}, le domaine TPR est la deuxième zone importante pour le fonctionnement du complexe puisqu'il intervient dans l'interaction

avec la petite protéine G, Rac [Koga et al, 1999]. Le mode d'interaction entre le domaine TPR et Rac a été explicité par la résolution de la structure du complexe entre ces deux partenaires [Lapouge et al, 2000].

c) p40^{phox}

La protéine p40^{phox} a été mise en évidence il y a une dizaine d'année [Tsunawaki et al, 1994]. Elle est composée par trois motifs structuraux isolés PX, SH3 et PB1. Son rôle au sein du complexe NADPH oxydase est encore mal connu. Cependant, elle n'est pas essentielle à l'activité de la NADPH oxydase. Aucune forme de la CGD impliquant p40^{phox} n'est connue. Un premier modèle [Sathyamoorthy et al, 1997] a décrit que l'interaction de p40^{phox} avec p47^{phox} par l'intermédiaire du domaine SH3 de p40^{phox} et du PP de p47^{phox} aurait un rôle inhibiteur dans la production d'ions superoxydes en ne facilitant pas l'interaction p47^{phox} et p67^{phox}. Des études plus récentes ont montré que p40^{phox} faciliterait la translocation de p47^{phox} et p67^{phox} à la membrane lors de l'activation du complexe. Le recrutement de p47^{phox} et p67^{phox} à la membrane se fait par l'intermédiaire d'une interaction PB1-PB1 entre p40^{phox} et p67^{phox}. La production des ions superoxydes serait ainsi augmentée [Kuribayashi et al, 2002]. Récemment, un nouveau modèle de régulation de l'activité du complexe de la NADPH oxydase a été proposé dans lequel p40^{phox} jouerait un rôle important. En effet, la phosphorylation de p40^{phox} entraînerait un changement de conformation de la protéine et aurait pour conséquence l'inhibition de l'activité oxydase du complexe [Lopes et al, 2004].

d) Rac

Rac appartient à la famille des petites protéines G. Elle est nécessaire à l'activation du complexe de la NADPH oxydase : elle favoriserait l'interaction entre gp91^{phox} et p67^{phox} [Dang et al, 2001] et aurait un rôle dans l'activation du transfert d'électron du NADPH vers la flavine [Diebold et al, 2001].

IV. Structures des facteurs cytosoliques et interactions.

Nous allons maintenant décrire les informations dont nous disposons sur la structure des différentes parties des facteurs cytosoliques, sur les interactions intramoléculaires au sein de ces facteurs et sur les interactions intermoléculaires entre les différents facteurs.

1. Les domaines PX de p47^{phox} et p40^{phox}.

Les facteurs cytosoliques p40^{phox} et p47^{phox} du complexe de la NADPH oxydase peuvent interagir directement à la membrane via leur domaine PX [Ago et al, 2001]. La structure des domaines PX de p40^{phox} [Bravo et al, 2001] et p47^{phox} [Karathanassis et al, 2002] (Figure 11) ont été résolues par cristallographie des rayons X, mais aussi par RMN pour p47^{phox} [Hiroaki et al, 2001]. La comparaison des domaines PX de p40^{phox} et p47^{phox} montre un repliement similaire. La topologie adoptée consiste en trois brins β anti-parallèles suivis par un domaine hélicoïdal formé de quatre hélices α et d'une région polyproline de type II. Les deux structures se superposent parfaitement sauf au niveau de la région comprise entre les résidus 59 à 86 de p47^{phox}. Celle-ci est formée par une hélice gauche PP de type II et par une boucle d'insertion dans la membrane. De plus, il a été démontré que le domaine PX de p47^{phox} interagissait spécifiquement avec le phosphatidyl inositol 3,4 diphosphates (PtdIns 3,4P₂) alors que p40^{phox} a une préférence pour le phosphatidyl inositol 3 phosphate [Kanai et al, 2001].

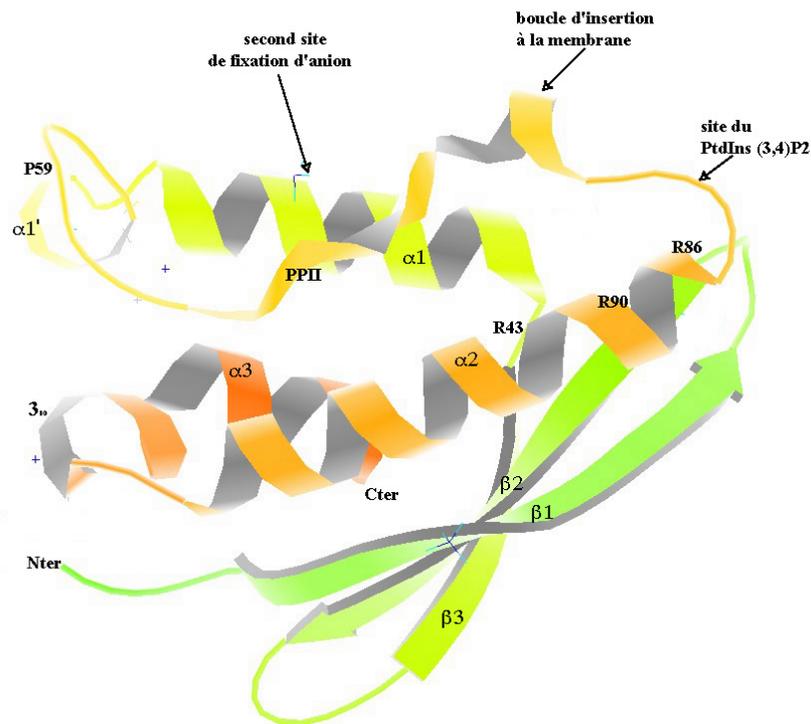


Figure 11 : Structure du domaine PX de p47^{phox} à 2 Å de résolution. (code PDB : 1O7K). Le site de fixation du phosphatidyl inositol 3,4 diphosphates, ainsi que les résidus impliqués dans l'interaction (R43 et R90) sont indiqués. La région de p47^{phox} allant des résidus P59 à R86 est la seule qui diffère avec le domaine PX de p40^{phox}. Le site d'insertion à la membrane et un deuxième site de fixation d'un anion sont également montrés.

La comparaison des structures des domaines PX de p47^{phox} et de p40^{phox} (non montré ici) montre que les résidus impliqués dans l'interaction avec le phosphatidyl inositol : Arg 58, Arg 105 de p40^{phox} et Arg 43, Arg 90 de p47^{phox} se superposent. La principale différence au niveau de p47^{phox} dans le site de fixation du phosphatidyl inositol est la formation par la région C-terminale du brin $\beta 2$ et N-terminale de l'hélice $\alpha 2$ d'une large crevasse.

2. Les connaissances structurales de p47^{phox}.

Deux conformations possibles de p47^{phox} à l'état de repos ont été décrites dans la littérature. Hiroaki a montré la possibilité d'une interaction intramoléculaire du domaine SH3 en position C-terminale (C-SH3) avec le motif PP présent dans le domaine PX [Hiroaki et al, 1994]. En effet, ce dernier possède un motif de type PXXP. De plus, une étude en système

acellulaire menée par Sumimoto suggère que le rôle du domaine PX n'est pas simplement de masquer le domaine C-SH3 [Sumimoto et al, 1998]. Afin de déterminer l'effet de cette interaction sur la liaison de p47 à la membrane, Williams a comparé l'interaction avec le phosphatidyl inositol (3,4) diphosphate du domaine PX seul et de p47^{phox} entier. Ainsi, il a montré qu'en mutant spécifiquement le résidu Trp 263 situé dans C-SH3 en Arg, le domaine PX pouvait interagir avec les phosphatidyl-inositols [Williams et al, 2002]. Un second modèle a été proposé suite à la résolution de la structure de la région 156-340, c'est à dire des deux domaines SH3 et du domaine polybasique [Groemping et al, 2003]. La structure révèle que les deux SH3 forment un sillon dans lequel vient se loger la région polybasique de p47^{phox}. L'interaction entre les deux domaines SH3 se fait par l'intermédiaire de la boucle n-Src. La séquence poly-basique (296-304) adopte le même type de structure que le motif PP de type II. Il vient interagir avec les deux domaines SH3 à la fois. Le domaine SH3 C-terminal n'est donc plus disponible pour interagir avec le motif PP du domaine PX.

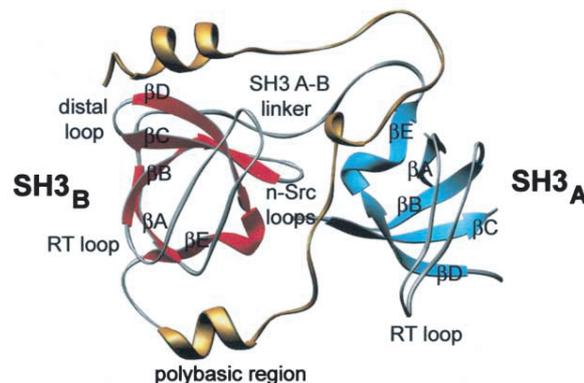


Figure 12 : Structure de la conformation auto-inhibitrice de p47^{phox} d'après Groemping et al. (code PDB : 1NG2). Les deux domaines SH3 forment un sillon dans lequel vient se loger la séquence polybasique.

Ce modèle a été confirmé par l'étude en solution du même domaine dans sa forme auto-inhibitrice [Yuzawa et al, 2004]

3. La structure de p67TPR seul et en complexe avec Rac

Le domaine TPR du facteur cytosolique p67^{phox} est situé du côté N-terminal des résidus 1 à 154. Il est composé de quatre motifs TPR distincts : TPR1, TPR2, TPR3 et TPR4. Chaque motif TPR comme cela a été décrit précédemment est une répétition de 34 résidus formant deux hélices α nommées A et B. La structure tridimensionnelle de ce domaine a été résolue à 1.8Å (Figure 13) [Grizot et al, 2001]. Les quatre motifs TPR forment une amorce de super hélice droite créant ainsi un sillon où vient s'insérer la grande boucle C-terminale. Les trois premiers motifs TPR sont continus, tandis que TPR3 et TPR4 sont séparés par deux brins β anti-parallèles.

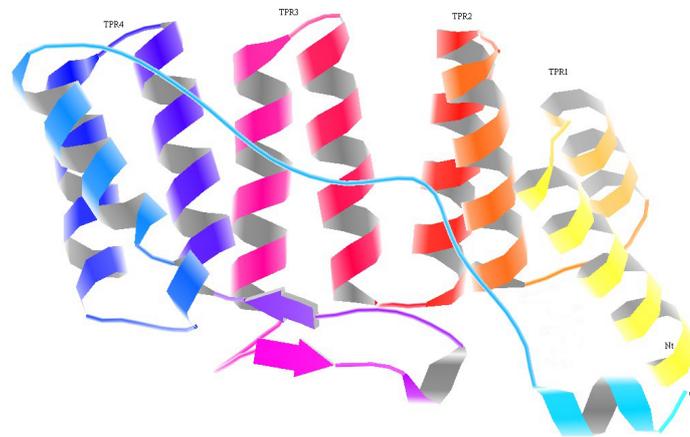


Figure 13 : Structure du domaine TPR de p67^{phox} à 1.8Å (Grizot et al, 2001, code PDB : 1HH8).

La structure du domaine TPR de p67^{phox} a aussi été résolue en complexe avec la protéine G, Rac 1 à 2.4Å de résolution [Lapouge et al, 2000] (Figure 14). Cette structure ne possède pas la dernière hélice C-terminale contrairement à la structure précédente.

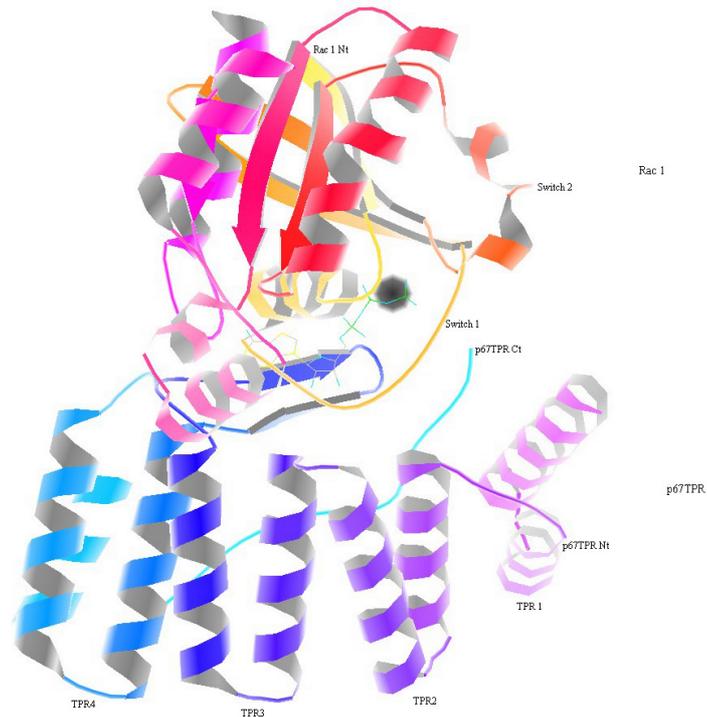


Figure 14 : Structure à 2.4Å du complexe p67TPR avec Rac 1 (Lapouge K et al, 2000, code PDB : 1E96).

Les structures de p67TPR en absence et en présence de Rac 1 sont semblables, donc l'interaction de Rac 1 avec p67TPR ne provoque de modifications structurales au niveau du domaine TPR de p67^{phox}. L'interaction entre les deux protéines implique du côté de Rac 1 les résidus Nterminaux de la région appelée « Switch I » ainsi que la boucle connectant le brin $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 5$. Il n'y a aucun contact avec la région appelée « Switch II ». De plus, le résidu Arg 102 de p67TPR joue un rôle essentiel dans la formation du complexe avec Rac 1, puisqu'elle est impliquée dans quatre liaisons hydrogène avec les résidus Ala 159, Leu 160, Asp 26 et Ser 22 de Rac1. La mutation de Arg 102 de p67TPR en Glu empêche la formation du complexe avec Rac [Koga et al, 1999]. Le complexe p67TPR-Rac 1 met en évidence un nouveau type d'interaction par rapport à ceux déjà connus des protéines G. En général, l'interaction entre une protéine G et son partenaire met en jeu les régions « Switch I » et « Switch II » de la protéine G.

4. Les interactions entre les facteurs cytosoliques.

Précédemment, les interactions intramoléculaires existantes dans la protéine p47^{phox} ont été décrites. Nous allons maintenant présenter les interactions intermoléculaires. Elles ont été rapportées par P. Vignais [Vignais et al, 2002]. Les trois facteurs cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} forment un complexe qui va être transporté à la membrane lors de l'activation de la NADPH oxydase. Différentes approches comme le système du double hybride [Fuchs et al, 1994] ont permis de mettre en évidence les interactions qui pourraient potentiellement exister entre les différents partenaires. Elles sont répertoriées dans la Figure 15. Elles sont principalement de type SH3-PP.

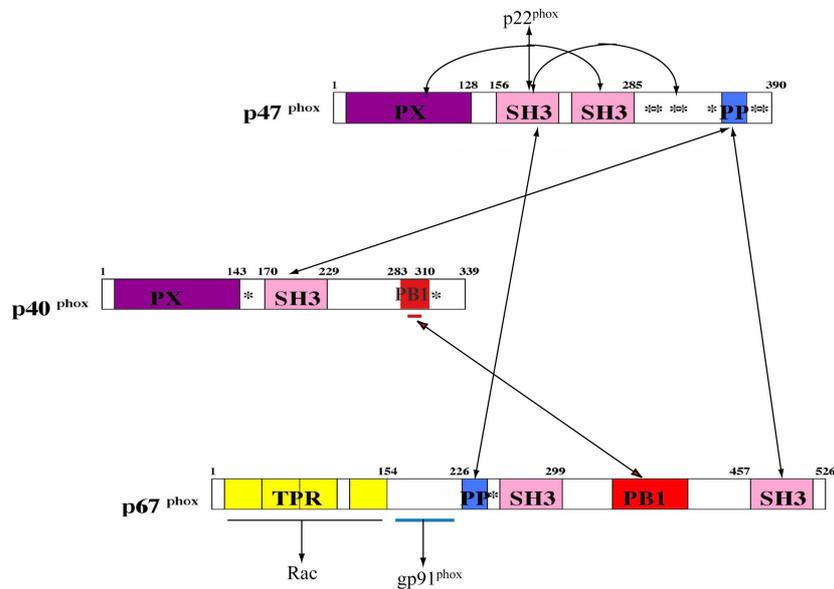


Figure 15 : Interactions entre les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase. Le trait bleu indique le domaine d'activation de p67^{phox} et le rouge le motif PC du domaine PB1 de p40^{phox}. Les flèches représentent les interactions possibles entre les facteurs cytosoliques. Les sites de phosphorylation sont indiqués par les *.

Ainsi, le motif PP de p47^{phox} (361-371) peut interagir avec le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (457-514) ou alors de p40^{phox} (170-227). Ce même PP pourrait former une interaction intramoléculaire avec le domaine SH3 N-terminal (156-213) qui est aussi impliqué dans la liaison du motif PP de p22^{phox}. Une autre zone d'interaction est possible entre le domaine SH3 N-terminal de p47^{phox} et le motif PP de p67^{phox}. Par l'intermédiaire de son motif PB1, p67^{phox} partage une zone de liaison avec le motif PB1 de p40^{phox}. Elle est aussi impliquée

dans l'interaction avec Rac et gp91^{phox}. Toutes les interactions citées ci-dessus sont possibles, l'existence de certaines n'a pas été démontrée *in vivo* notamment celle entre SH3-p47^{phox} et PP-p67^{phox}. Par la suite, nous allons décrire deux d'entre elles : PB1-p67^{phox}/PB1-p40^{phox} et SH3-p47^{phox}/PP-p22^{phox}.

5.L'interaction PB1-PB1.

Le domaine PB1 est présent dans deux des facteurs cytosoliques p40^{phox} et p67^{phox}. Il n'a été caractérisé comme tel que récemment. La structure du complexe PB1-p67^{phox}/PB1-p40^{phox} a été résolue à 2Å de résolution [Wilson et al, 2003]. Les domaines PB1 de ces deux facteurs cytosoliques adoptent un repliement similaire et sont parfaitement superposables. La topologie de ces deux domaines PB1 est de type ubiquitine « β gras » : deux hélices α entourent un feuillet β de cinq brins ordonnés en deux feuillets selon une topologie $(\beta\beta\alpha)_2\beta$ de la façon suivante 2-1-5-3-4 (Figure 16).

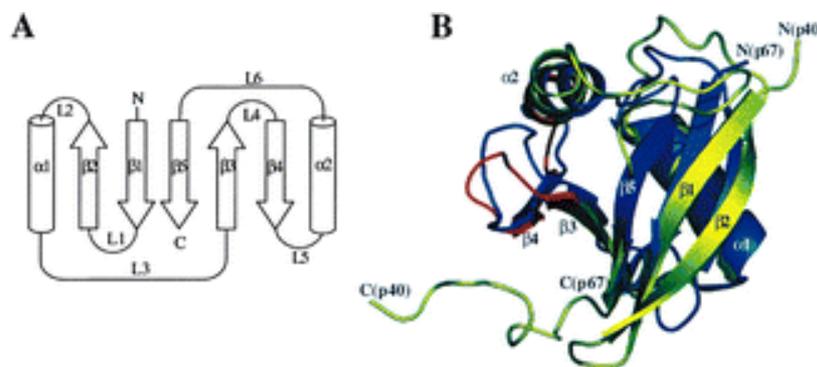


Figure 16 : Topologie du repliement du domaine PB1 (A) et superposition des structures de PB1-p67^{phox} et de PB1-p40^{phox} (B). (d'après Wilson et al, 2003 ; code PDB : 1OEY)

Le feuillet forme une face convexe qui s'enroule autour de l'hélice $\alpha 1$. L'interaction PB1-p67^{phox}/PB1-p40^{phox} se fait entre la surface convexe formée par le brin $\beta 2$ de PB1-p67^{phox} où vient s'intercaler la surface concave créée par l'hélice $\alpha 2$ de PB1-p40^{phox}. C'est une interaction de type « front-to-back ». Les deux domaines exposent des caractéristiques électrostatiques différentes, PB1-p67^{phox} possède deux zones basiques et PB1-p40^{phox} deux clusters acides. Les résidus acides ne sont pas impliqués dans des interactions directes avec

les résidus basiques, mais dans l'architecture du domaine PB1-p40^{phox}. L'interaction PB1-p67^{phox}/PB1-p40^{phox} est stabilisée par un bras situé en C-terminal du domaine PB1-p40^{phox}. En effet, dans cette région, il existe des interactions hydrophobes entre les deux partenaires et deux liaisons hydrogène. Ce bras permettrait également d'assurer la spécificité d'interaction entre domaines PB1 car il n'est pas toujours présent (Figure 17).

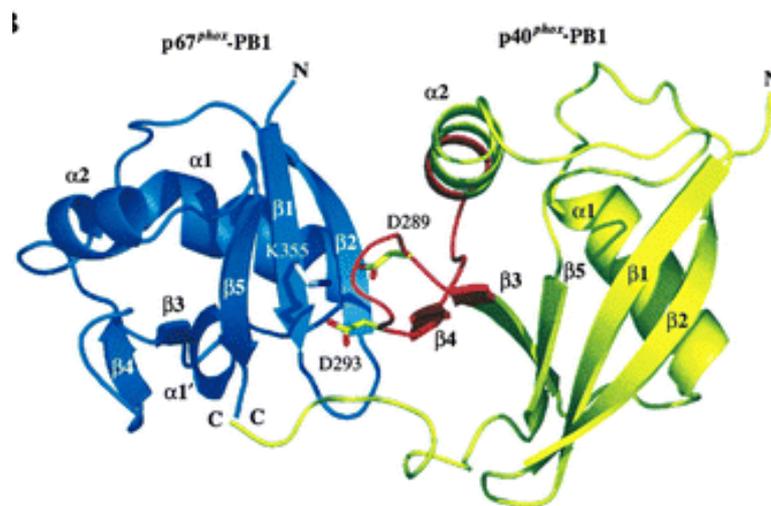


Figure 17 : Interaction de PB1-p67^{phox} et de PB1-p40^{phox}, (d'après Wilson et al 2003 ; code PDB : 1OEY).

6.L'interaction SH3-p47^{phox} avec PP-p22^{phox}.

La résolution de la structure des domaines SH3 de p47^{phox} en complexe avec un peptide correspondant au motif PP de p22^{phox} montre que le site d'interaction est le même que celui de la région polybasique de p47^{phox} (Figure 18). Les deux structures sont proches : le rms calculé à partir de la superposition des deux structures est de 1,3Å [Groemping et al, 2003]. Seuls des légers réarrangements ont lieu au niveau du Trp 194 du SH3 N-terminal et Trp 264 du SH3 C-terminal. Ces deux résidus vont pouvoir ainsi former une liaison hydrogène via une molécule d'eau à travers l'interface du domaine. La résolution de cette structure permet de proposer un modèle pour l'activation du complexe NADPH oxydase induite par les phosphorylations. La première étape de l'activation du complexe de la NADPH oxydase consiste en la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane. Elle est principalement régulée par p47^{phox} qui peut exister sous différentes formes. Ainsi, des phosphorylations au niveau de plusieurs sérines de la région polybasique pourraient entraîner

une déstabilisation donc relâcher la forme auto-inhibitrice et permettre ainsi l'interaction avec $p22^{\text{phox}}$.

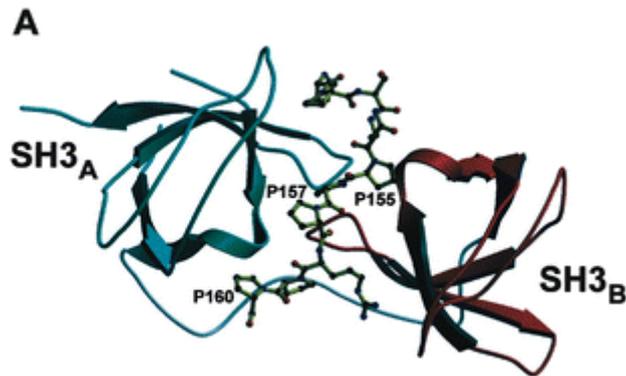


Figure 18 : Structure du complexe SH3-p47^{phox}/PP-p22^{phox} (D'après Groemping et al, 2003 ; code PDB : 1OV3).

V. Études en solution des facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase.

Certaines macromolécules du fait de leur flexibilité sont difficilement cristallisables sous forme entière. Des études sur des domaines isolés sont alors engagées permettant ainsi de résoudre des structures à haute résolution. Il est possible d'obtenir des informations structurales sur ces molécules par des études en solution. Nous avons ainsi accès à des informations sur la forme globale de la protéine et des complexes formés avec ces partenaires. Dans le cas du complexe de la NADPH oxydase, deux approches ont été jusqu'à présent utilisées : la diffusion des neutrons aux petits angles et l'ultracentrifugation analytique.

Les études sur les facteurs cytosoliques entiers ont été réalisées en solution par diffusion des neutrons aux petits angles dans un premier temps [Grizot et al, 2001]. Les résultats ont permis de mettre en évidence le caractère monomérique de $p40^{\text{phox}}$ et de $p47^{\text{phox}}$ et dimérique de $p67^{\text{phox}}$. Les rayons de giration déterminés ne sont pas ceux attendus pour des protéines globulaires mais seraient plutôt celui de molécules allongées. Le complexe formé par $p47^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ a lui aussi été étudié par diffusion aux petits angles. Sa stoechiométrie

est de 1 : 1 et il a aussi une forme allongée. L'interaction entre ces deux facteurs cytosoliques se fait par l'intermédiaire du domaine PP en position C-terminale de p47^{phox}. Une étude plus récente par ultracentrifugation analytique [Lapouge et al, 2002] a confirmé que p40^{phox} et p47^{phox} étaient des monomères. Pour p67^{phox}, des résultats contradictoires ont été publiés puisque les expériences d'ultracentrifugation analytique ont montré l'existence de p67^{phox} sous forme d'un monomère. Diverses approches ont mis en évidence que p67^{phox} était une protéine non seulement allongée mais aussi très flexible. Le complexe formé par les trois facteurs cytosoliques p40^{phox} et p47^{phox} et p67^{phox} dans le cytoplasme est un complexe trimérique sans protéine supplémentaire. La masse déterminée par centrifugation analytique (144 546 g/mol) est proche de la masse théorique attendue pour un complexe de stoechiométrie 1 : 1 : 1 (144 944 g/mol). Un modèle d'architecture du complexe cytosolique a ainsi été proposé. La protéine p67^{phox} servirait d'adaptateur entre p47^{phox} et p40^{phox} à l'état de repos contrairement à ce qui a pu être décrit où c'était p40^{phox} qui jouait ce rôle (Figure 19). La protéine p40^{phox} n'interviendrait qu'au niveau de la régulation de l'activité du complexe.

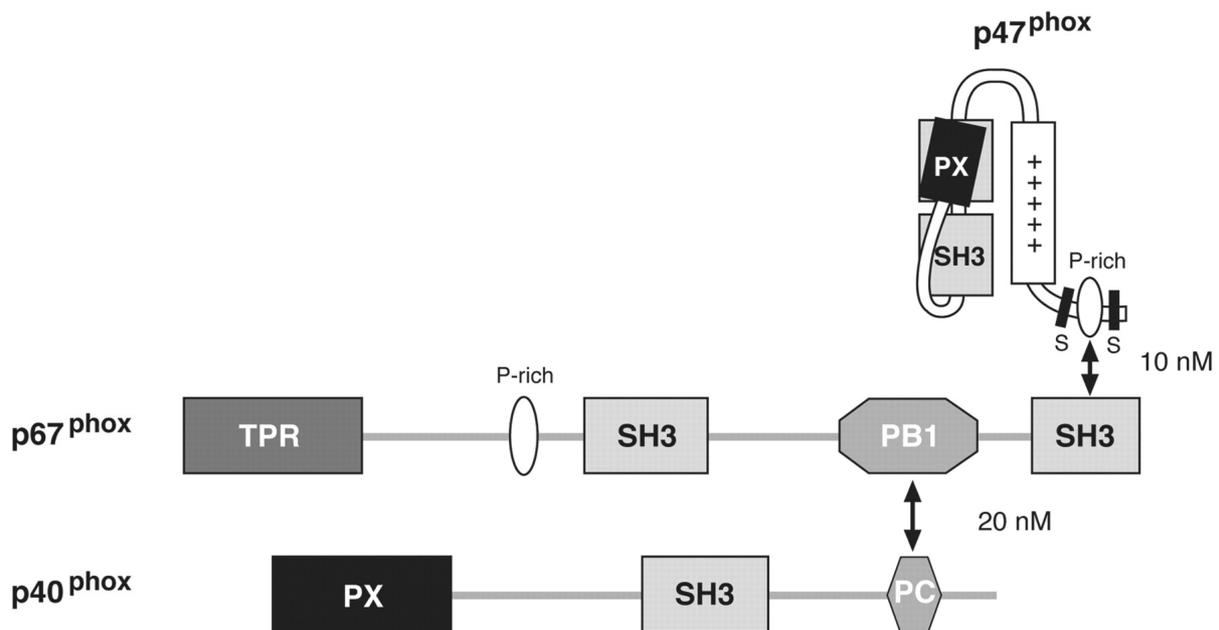


Figure 19 : Modèle de l'architecture du complexe formé par les facteurs cytosoliques au repos. (d'après Lapouge et al, 2002). Les constantes d'affinité déterminées par ITC sont indiquées pour les interactions entre p67^{phox} et p47^{phox} d'une part et p67^{phox} et p40^{phox} d'autre part.

VI. Combinaison d'approches pour obtenir des structures de macromolécules.

Il est possible de combiner des données structurales à haute résolution obtenues sur des domaines isolés de protéines à des données à des résolutions plus faibles sur les protéines entières. Cette combinaison donne ainsi accès à un modèle de la structure.

Des études en microscopie électronique peuvent être réalisées par deux approches différentes, les particules isolées et l'utilisation de cristaux 2D. Les particules isolées possèdent l'avantage de ne pas nécessiter l'obtention de cristaux, mais l'analyse nécessite des particules dans une orientation similaire. Par conséquent, la détermination de l'orientation est limitée par la taille des molécules, la masse molaire doit être supérieure à 10^6 g/mol. L'approche 2D nécessite l'obtention de cristaux mais c'est une alternative intéressante puisqu'elle est applicable à toutes les protéines sans limitation de taille. De plus, elle nécessite une plus faible quantité de protéines que la cristallisation 3D. Cependant, les approches particules isolées et cristaux 2D permettent d'obtenir une information de l'enveloppe de la protéine à une résolution de l'ordre de huit d'angströms. La diffusion aux petits angles des rayons X donne des renseignements structuraux à plus faible résolution en partie à cause de l'orientation aléatoire des particules en solution. Cette approche permet d'avoir une conformation moyenne des régions flexibles. Par conséquent, en combinant soit la microscopie électronique soit la diffusion des rayons X aux petits angles avec des parties de structure de la molécule à haute résolution, il est possible de modéliser l'ensemble de la structure et donc les interactions entre les domaines. Une deuxième application de cette combinaison est de modéliser les régions manquantes dans l'enveloppe de la protéine entière. En annexe est présenté un exemple de la combinaison microscopie électronique et cristallographie de rayons X pour l'étude structurale du récepteur 1,4,5 inositol triphosphate [Sato et al, 2004] (annexe 1) puis un exemple avec la diffusion aux petits angles dans le cas de l'étude de la glutamate synthase [Petoukhov et al, 2003] (annexe 2).

VII. Sujet de thèse.

Au début de ce travail, les principales données structurales existantes avaient été obtenues sur des domaines isolés des facteurs cytosoliques. Des études en diffusion aux petits angles de neutrons [Grizot et al, 2001b] et d'ultracentrifugation analytique [Lapouge et al, 2002] avaient montré que les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase n'étaient pas des protéines globulaires mais avaient une forme allongée et qu'il s'agissait de molécules flexibles. Elles avaient aussi permis de décrire un premier modèle du complexe ternaire de stoechiométrie 1 : 1 : 1 des facteurs cytosoliques au repos. Ce modèle est basé sur une interaction intramoléculaire de p47^{phox} entre un domaine SH3 et le motif PP contenu dans le domaine PX et une interaction avec p67^{phox}. Le troisième facteur p40^{phox} interagit quant à lui uniquement avec p67^{phox} par une interaction PB1/PB1. Certaines interactions ont été caractérisées par la résolution de structures 3D à haute résolution :

- interaction SH3-p40^{phox}/PP-p47^{phox}
- interaction PB1-p40^{phox}/PB1-p67^{phox}

De plus, le modèle du complexe ternaire proposé par Lapouge [Lapouge et al, 2002] a été remis en cause au niveau de l'interaction intramoléculaire de p47^{phox} par la résolution de la structure des deux domaines SH3 mettant en évidence une structure auto-inhibée où la région polybasique C-terminale vient interagir au niveau des domaines SH3. La connaissance du repliement des facteurs cytosoliques et des interactions mises en jeu serait une indication intéressante pour les réarrangements provoqués par l'activation du complexe. Les approches combinant des méthodes donnant des informations à basse résolution (diffusion aux petits angles) ou à moyenne résolution (microscopie électronique,...) avec celles permettant de voir les détails structuraux (cristallographie de rayons X) sont l'alternative choisie pour l'étude des facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase.

Les facteurs cytosoliques ont été exprimés et purifiés en fusion avec une séquence polyhistidine pour permettre une étude en microscopie électronique par cristallisation bi-dimensionnelle à l'interface air-eau en collaboration avec P.Bron (Equipe des Canaux et Récepteurs Membranaires)^a. Cette cristallisation a également été suivie par des mesures physiques. La seconde partie du travail a consisté en une étude en solution par diffusion aux petits angles de rayons X en collaboration avec P.Vachette et D. Durand (D24, LURE)^b et

^a P.Bron, Equipe des Canaux et Récepteurs Membranaires, UMR 6026, Rennes.

^b Adresse actuelle de P.Vachette et D.Durand : IBBMC, UMR 8619, Orsay.

F.Fieschi^c. Parallèlement, la cristallisation tridimensionnelle du domaine d'activation de p67^{phox} et du domaine PB1 de p40^{phox} a été engagée dans le but d'avoir des données structurales à haute résolution sur ces deux domaines. En effet, au début du projet, aucune structure les concernant n'avait été résolue. Une partie importante de ce travail a consisté en l'obtention et la caractérisation par diverses méthodes physico-chimiques des différentes protéines étudiées au laboratoire des Protéines Membranaires avec F. Fieschi. Après avoir décrit la production et la caractérisation des différentes constructions étudiées, nous présenterons les résultats des études de cristallisations tridimensionnelles puis bidimensionnelles. Ensuite, nous exposerons les études réalisées en solution par diffusion de rayons X aux petits angles. La dernière partie sera consacrée à la discussion de ces résultats et aux perspectives offertes par ce travail.

^c IBS/LPM UMR 5075, Grenoble

Production des protéines

I.Introduction générale

Les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} sont des protéines modulaires et par conséquent difficilement manipulables sous leur forme entière. En effet, le thème de la NADPH oxydase a été abordé au Laboratoire des Protéines Membranaires (IBS, Grenoble) au début des années 90 en collaboration avec Marie-Claire Dagher (BBSI-UMR 5092/ DRDC / CEA-Grenoble). Il a fait l'objet de quelques thèses qui ont mis en évidence la difficulté de production de ces protéines pour des études structurales. Les protéines p47^{phox} et p67^{phox} ont été dans un premier temps exprimées dans le système baculovirus. Sous sa forme entière, p67^{phox} se révélait instable et p47^{phox} était en partie phosphorylée au niveau des sites de phosphorylation situés en position C-terminale. Les essais de phosphorylation et déphosphorylation n'ont pas permis de s'affranchir de cette hétérogénéité. Le facteur cytosolique p47^{phox} a donc été exprimé dans *E.coli* sous forme de protéine de fusion pour empêcher la phosphorylation et faciliter sa purification. Cependant, les rendements de production sont restés faibles quelque soit la protéine de fusion utilisée, et son clivage par la thrombine entraînait une coupure aspécifique au niveau du motif polyproline. De plus, p40^{phox} était produite sous forme de protéine de fusion, et le clivage de cette protéine entraînait la perte de p40^{phox}. Devant les aléas de la production des formes entières des facteurs cytosoliques, une des solutions a été l'étude de ces protéines sous des formes tronquées. Par la suite, les systèmes d'expression et de purification des formes entières ont pu être améliorés nous permettant aujourd'hui leur étude.

Au cours de ce chapitre, seront présentées les étapes de production des différentes protéines étudiées, c'est-à-dire les formes entières et tronquées. Les différentes stratégies qui ont été mises en œuvre au niveau des différentes fusions utilisées : de la séquence polyhistidine à la maltose binding protein (MBP) et à la Gluthation S-transférase (GST). Par la suite, les facteurs cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} seront nommés respectivement p47, p67 et p40.

II.p47

1.Présentation.



Figure 20 : Représentation schématique des différents domaines composant le facteur cytosolique p47. Les étoiles (*) représentent les sites de phosphorylation.

La protéine p47 joue un rôle essentiel dans le processus d'activation du complexe NADPH oxydase du fait de sa capacité à interagir avec la région cytoplasmique de p22 (Figure 20). De plus, elle permet la translocation des facteurs cytosoliques p67 et p40 à la membrane. p47 est composée d'un domaine PX capable de lier des lipides, les phosphatidylinositols [Kanai et al, 2001] et plus particulièrement le phosphatidylinositol 3,4 biphosphates, de deux domaines SH3, d'une région polybasique et d'une séquence riche en proline, le domaine poly-proline (PP). Deux conformations possibles de p47 à l'état de repos ont été décrites dans la littérature par Hiroaki [Hiroaki et al, 1994] et par Groemping [Groemping et al, 2003]. La conformation décrite par Hiroaki est basée sur la structure RMN du domaine PX de p47, elle a été aussi décrite par d'autres auteurs utilisant d'autres approches. La seconde repose sur la structure RX des deux domaines SH3. Il est donc intéressant d'avoir des données structurales sur la protéine entière afin de connaître la position des différents domaines les uns par rapport aux autres. Devant la difficulté d'obtention et de cristallisation de p47, nous avons choisi des méthodes telles que la microscopie électronique qui demande peu de matériel et la diffusion de rayons X aux petits angles qui évitent l'étape de cristallisation. Deux premières constructions étaient à notre disposition p47 N-His et p47 C-His. Elles seront utilisées pour les études en microscopie électronique. Les échantillons obtenus n'étaient pas homogènes, par conséquent, p47 a par la suite été exprimée et purifiée à partir de deux nouvelles constructions permettant d'augmenter sa solubilité : MBP-(His)₆-p47 et GST-p47. MBP-(His)₆-p47 va nous permettre d'obtenir p47 avec une séquence polyhistidine en position N-terminale, donc équivalente à p47 N-His. Elle servira aux mesures d'ellipsométrie. La

construction GST-p47, quant à elle, nous donnera la forme native de p47 qui sera utilisée pour les expériences de diffusion aux petits angles.

2.Expression et purification des différentes constructions

a) p47 N-His et p47 C-His.

(i) Expression et purification

L'ADNc de p47 a été préalablement cloné dans le vecteur d'expression pEt 15b pour la construction p47 N-His et pEt 30b pour p47 C-His. La protéine recombinante est exprimée dans la souche *Escherichia coli* BL21(DE3). Le protocole de purification des deux constructions est identique, nous présenterons ici l'exemple de p47 C-His. À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et ultracentrifugation, la protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA (Qiagen) (Figure 21). L'élution de la protéine est faite par un gradient linéaire de 0 à 300 mM Imidazole.

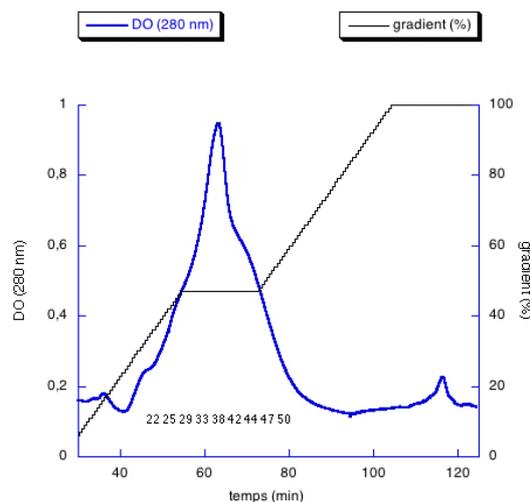


Figure 21 : Chromatographie d'affinité (colonne Ni-NTA, Qiagen) de la construction p47 C-His. L'élution se fait par un gradient de 0 à 300 mM Imidazole. Les nombres représentent les fractions analysées sur gel.

Afin de déterminer où p47 C-His est élué au cours du gradient, les fractions du pic sont analysées sur gel SDS-PAGE 12% (Figure 22).

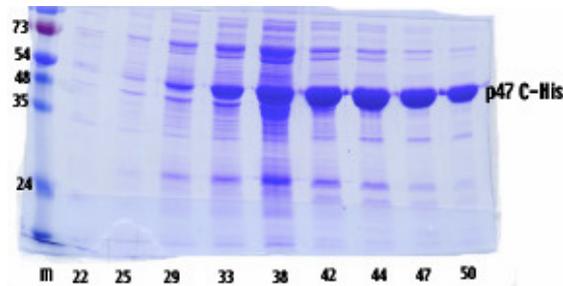


Figure 22 : Gel SDS-PAGE 12% des fractions correspondant aux pics élués au cours du gradient. M est le marqueur de masses molaires (Fermentas), les nombres correspondent au numéro des fractions testées.

La protéine p47 C-His est présente dans toutes les fractions du pic, mais avec beaucoup de contaminants malgré l'utilisation d'une chromatographie d'affinité. La séquence polyhistidine devrait avoir une plus forte affinité pour le nickel que les contaminants présents. Ces derniers ne devraient pas interagir avec la matrice ou alors être élués dès le début du gradient. Ici, nous pouvons supposer que l'interaction de la séquence polyhistidine avec les ions Nickel est défavorisée par la protéine. Néanmoins, les fractions contenant la protéine (Figure 22) sont déposées sur colonne échangeuse de cations (Mono S) (Figure 23).

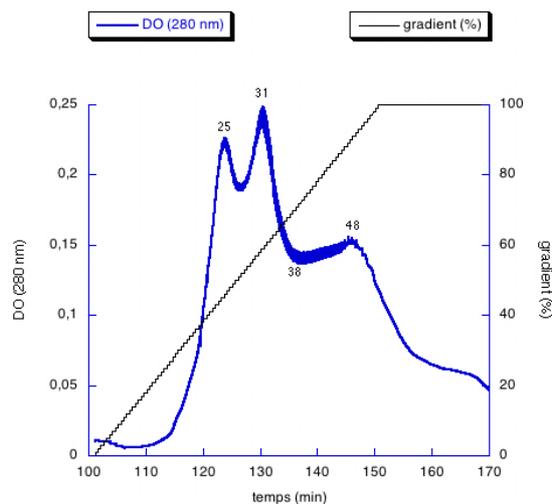


Figure 23: Chromatographie échangeuse de cations (Mono S, Pharmacia) des fractions de la chromatographie d'affinité diluées trois fois avec du tampon 20 mM HEPES .Na pH 7.5. L'élution se fait par un gradient de 0 à 500 mM NaCl sur 50 mL.

Les fractions des pics élués pendant le gradient sont testées sur gel SDS-PAGE 12% (Figure 24). D'après cette analyse, toutes les fractions contiennent la protéine p47 C-His, mais dans les deux premiers pics (fractions 20 à 41) des contaminants ainsi que des produits de dégradation sont observables. Par conséquent, nous n'utiliserons pour les études en microscopie électronique que les fractions à partir de la fraction 42, soient celles du troisième pic.

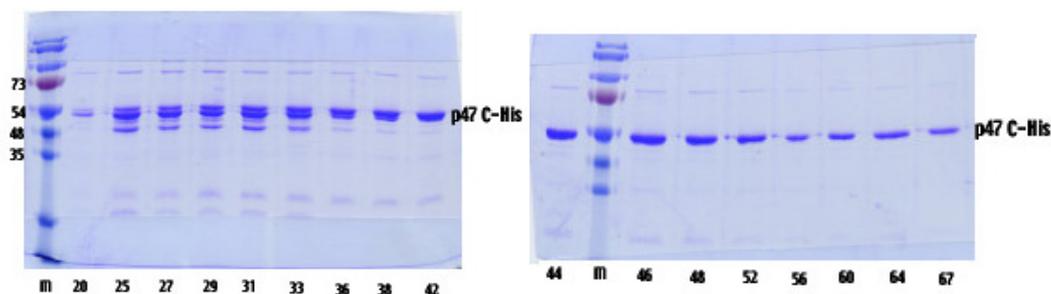


Figure 24: Gels SDS-PAGE 12% des fractions des pics élués au cours du gradient de la colonne Mono S. M est le marqueur de masses molaires (Fermentas), les nombres correspondent au numéro des fractions testées.

Les fractions récupérées sont ensuite concentrées sur membrane YM10, soit un seuil de coupure de 10000 g/mol.

La forme p47 est obtenue par clivage de la séquence polyhistidine de p47 N-His par la thrombine (Sigma) et l'échantillon est purifié par chromatographie d'exclusion (Superdex 200, 16/60, Pharmacia).

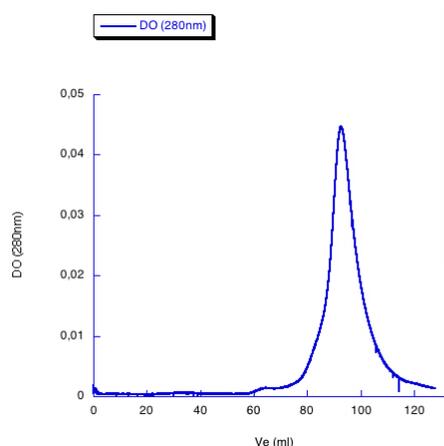


Figure 6 : Chromatographie d'exclusion de type Superdex 200 de p47 après la coupure de la séquence polyhistidine par la thrombine. Le tampon d'élution est 20 mM HEPES.Na, 310 mM NaCl.Ve représente le volume d'élution.

La protéine p47 après coupure à la thrombine est éluée à un volume de 96 mL, ce qui correspond d'après la calibration de la colonne avec des protéines globulaires à une masse molaire apparente de 13 000 g/mol alors que la masse attendue est de 47 260 g/mol. La fraction du pic est déposée sur gel SDS-PAGE 12% pour savoir à quoi correspond l'échantillon élué.

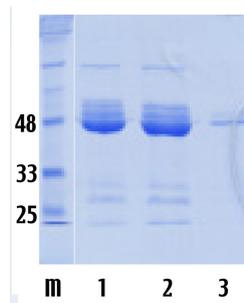


Figure 25 : Gel SDS-PAGE 12% de la chromatographie d'exclusion de p47 après coupure à la thrombine de p47 N-His. 1 est l'échantillon non coupé, 2 après coupure, 3 p47 après coupure et chromatographie d'exclusion. M est le marqueur de masses molaires (Biolabs)

D'après le gel présenté à la Figure 25, p47 migre apparemment à un niveau correspondant à sa masse molaire. Le fait qu'il s'agisse bien de la protéine p47 est confirmé par le séquençage N-terminal, où nous retrouvons bien le début de la séquence de la protéine. Cette masse apparente obtenue ne s'explique que par un problème lors de l'élution.

(ii) Analyses quantitatives et caractérisation

Tous les échantillons de protéine seront quantifiés par mesure de l'absorbance à 280 nm. Ils seront parallèlement analysés par spectrométrie de masse et séquençage N-terminale. L'absorbance à 280 nm (A_{280nm}) est mesurée à toutes les étapes, elle permet de déterminer la concentration des échantillons ainsi que la quantité de protéine dont nous disposons. La concentration en protéine est calculée selon la loi de Beer-Lambert : $A_{280nm} = \epsilon lc$, où ϵ est le coefficient d'extinction molaire, c la concentration molaire et l l'épaisseur que traverse l'onde, dans tous les cas, l sera de 1 cm. Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé expérimentalement pour p47 et p67. Pour les autres constructions, il a été calculé d'après la composition en résidus tryptophanes et tyrosines des séquences. Nous utiliserons tout au long de ce chapitre les concentrations massiques, elles seront calculées à partir des concentrations

molaires déterminées comme décrit ci-dessus et de la masse molaire de la protéine. Celle-ci sera dans un premier temps calculée à partir de la séquence et ensuite déterminée exactement par spectrométrie de masse. Ceci est valable pour toutes les analyses quantitatives montrées au cours de ce chapitre. Le Tableau 1 montre les résultats obtenus pour p47 C-His, p47 N-His et p47.

		Concentration en mg/mL	Quantité de protéines en mg	Rendement (%)	Rendement cumulé de purification (%)
Colonne Ni-NTA	p47 C-His	1.7	11		
	p47 N-His	2.0	35		
Colonne Mono S	p47 C-His	0.12	0.8	7	7
	p47 N-His	1.0	6.0	16	16
Concentration	p47 C-His	1.0	0.8	100	7
Chromatographie d'exclusion	p47	1.0	0.6	30	

Tableau 1: Bilan de purification pour un litre de culture de p47 C-His et p47 N-His. Dans le cas de p47, on digère par la thrombine l'équivalent de 2 mg de p47 N-His. Le rendement est calculé à partir de cette quantité.

Les rendements de purification des constructions p47 C-His et p47 N-His restent relativement faibles, avec cependant une meilleure efficacité pour p47 N-His. Les conditions de purification étant identiques, nous pouvons supposer que la présence de la séquence polyhistidine en position N-terminale ou C-terminale peut avoir une influence sur la quantité de protéine obtenue. De plus, la coupure de la séquence polyhistidine entraîne la perte de la majorité de la protéine même si le rendement reste supérieur par rapport aux étapes précédentes. L'analyse par séquençage N-terminal faite selon la méthode d'Edman nous indique que nous sommes en présence de la bonne protéine dans les trois cas et qu'il n'y aurait a priori aucune séquence supplémentaire. Les analyses en spectrométrie de masse montrent que les deux échantillons sont fortement hétérogènes et il n'est pas possible de déterminer une masse molaire (Figure 26). Le spectre présenté est celui de p47 N-His, mais pour les deux autres formes de p47, il n'est pas non plus possible de déterminer une masse molaire. Les échantillons sont eux aussi très hétérogènes.

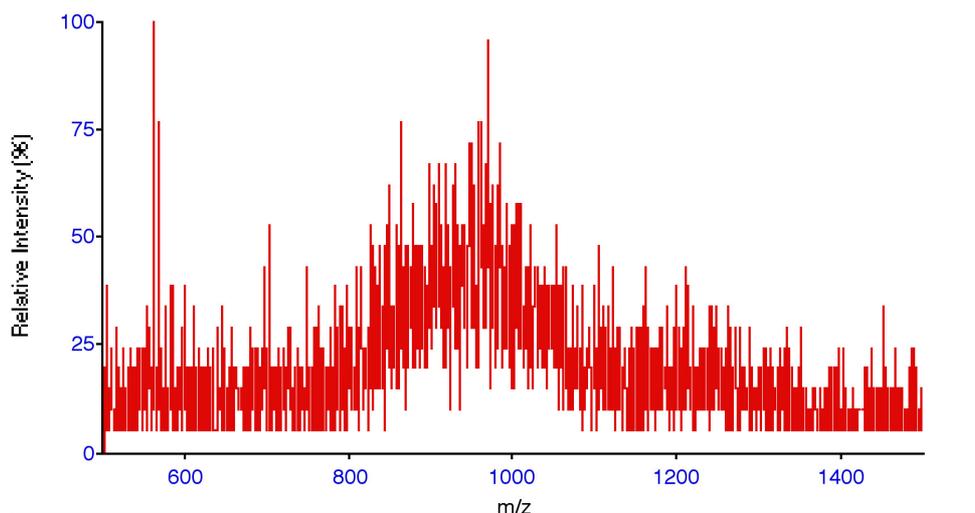


Figure 26 : Spectre de masse de p47 N-His réalisé par electrospray après dessalage sur colonne C4.

À partir de ces deux constructions, il est difficile d'obtenir un échantillon de p47 homogène et sans agrégats. Par conséquent, nous avons choisi d'exprimer p47 en fusion avec la GST ou en fusion avec la MBP dans le cas de p47 N-His.

b) GST-p47.

(i) Expression et purification

Le protocole de purification de la construction GST-p47 a été mis au point d'après les expériences d'ultracentrifugation analytique [Lapouge et al, 2002] qui selon le protocole utilisé permettait d'obtenir un échantillon de p47 homogène. L'ADNc de p47 a été préalablement cloné dans le vecteur d'expression pGEX-6P (Amersham Biosciences). Il nous a été fourni par B. Babior du Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute (Californie, USA). La protéine recombinante est exprimée dans la souche BL21(DE3) pLys S. À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et ultracentrifugation, la protéine GST-p47 est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) (Figure 27).

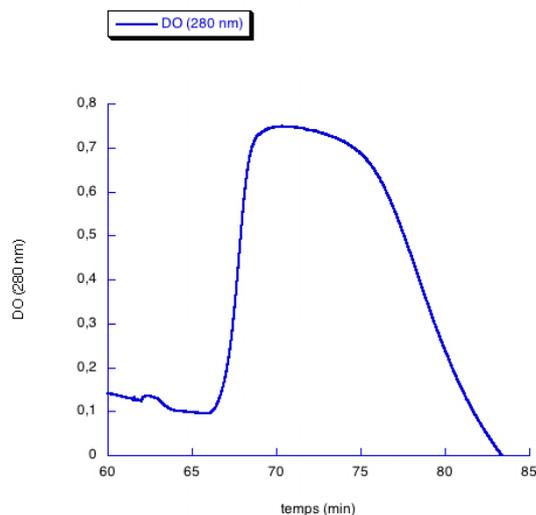


Figure 27: Chromatogramme de l'élution de la colonne de Gluthation Sepharose 4B. Le tampon d'élution utilisé est 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM glutathion réduit, 100 mM NaCl.

La séquence GST est enlevée par coupure avec la protéase Precision, (Amersham Biosciences), puis séparée de p47 par une chromatographie échangeuse de cations (Mono S, Pharmacia) (Figure 28).

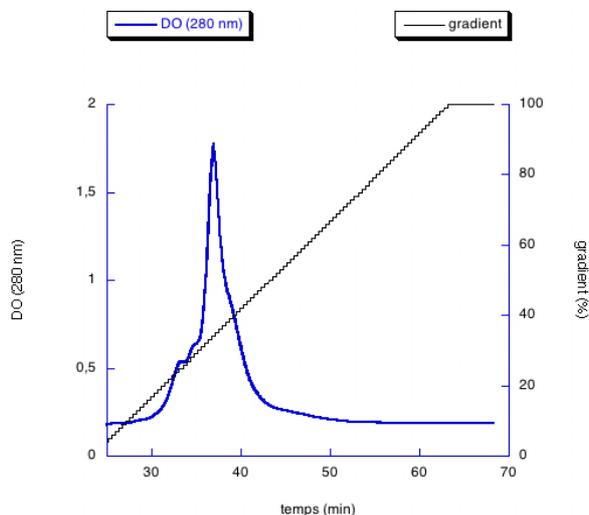


Figure 28: Chromatogramme d'élution de la colonne Mono S de p47 après coupure de la GST. L'élution est faite par un gradient de 0 à 500 mM NaCl.

Les fractions contenant p47 sont ensuite concentrées sur membrane YM 10 et le tampon sera changé en 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 2 mM DTT, 5 % glycérol pour les études de diffusion aux petits angles.

Pour les études en spectrométrie de masse, le tampon de p47 est changé en tampon phosphate PBS pH 7.5, par chromatographie d'exclusion (Superdex 75 16/60, Pharmacia) (Figure 36).

(ii) Analyses quantitatives et caractérisation

Comme nous l'avons fait pour les trois premières formes de p47, la quantité de protéine a été estimée à chaque étape de purification par mesure de la densité optique à 280 nm (Tableau 2) selon le principe décrit précédemment. Le coefficient d'extinction molaire utilisé pour les calculs de concentration a été déterminé expérimentalement.

	Concentration en mg/mL	Quantité en mg	Rendement (%)	Rendement cumulé (%)
Gluthione Sepharose 4B	3.7	28.0		
Mono S	1.0	5.0	18	18
Chromatographie d'exclusion	0.5	4.0	80	14

Tableau 2: Bilan de purification de p47 issue de la construction GST-p47. Le rendement final est de 18% pour la protéine utilisée en diffusion aux petits angles et de 14% pour celle analysée en spectrométrie de masse. Les quantités de protéines sont estimées pour un litre de culture.

Par comparaison avec les résultats obtenus avec les deux premières constructions, le rendement de purification pour un litre de culture est plus élevé. La construction GST semble donc favoriser la solubilisation de la protéine. De plus, à chaque étape de purification, un échantillon est conservé pour être déposé sur gel SDS-PAGE 12%, (Figure 29).

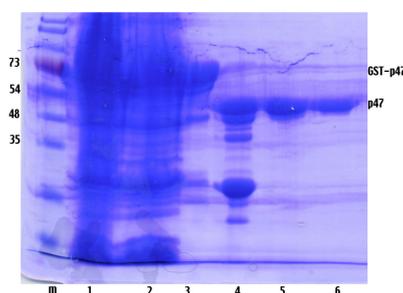


Figure 29: Gel SDS-PAGE 12% du suivi de purification de la construction GST-p47. M indique le marqueur de masses molaires (Fermentas), 1, l'échantillon après lyse des cellules, 2, après l'ultracentrifugation, 3, issu de la colonne Gluthation Sepharose, 4, après coupure de la séquence GST, 5, issu de la colonne Mono S, 6, après chromatographie d'exclusion.

En fin de purification, nous obtenons donc un échantillon pur, nous n'avons pas de mélange GST-p47, p47. De plus, la protéine ne semble pas se dégrader. Afin d'initier les études de spectrométrie de masse, une première analyse en électrospray a été réalisée afin de contrôler son homogénéité.

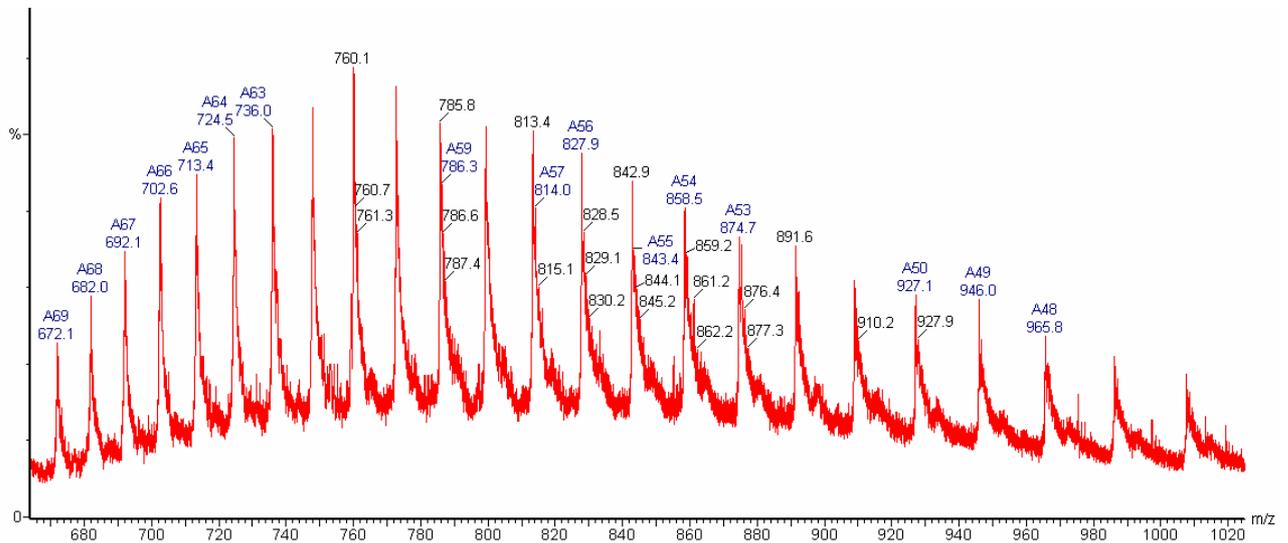


Figure 30 : Spectre de masse réalisé par électrospray de p47 purifié à partir de la construction GST-p47.

La détermination de la masse molaire d'une protéine par spectrométrie de masse se fait à partir de deux états de charge (m/z) successifs suivant les équations suivantes :

$$(m/z)_A = \frac{M + nH^+}{n}$$

$$(m/z)_B = \frac{M + (n+1)H^+}{(n+1)}$$

A et B représentent deux états de charge, M la masse molaire de la protéine et n le nombre de protons.

Avec cette nouvelle préparation de p47, nous pouvons observer une seule espèce et déterminer une masse molaire de 46 300 g/mol (Figure 30). Cette masse est supérieure à la masse attendue d'après la séquence en acides aminés soit 45 620 g/mol. Cette dernière a été vérifiée et validée par séquençage N-terminal. Cette différence de masse peut être expliquée par la fixation de glutathion sur les résidus cystéines. La caractérisation de l'état

d'oligomérisation par chromatographie d'exclusion sera présentée dans un paragraphe suivant.

c)MBP-(His)₆-p47

Afin d'essayer d'éviter les problèmes d'agrégation de p47, j'ai cloné p47 en fusion avec la maltose binding protein (MBP). La MBP est présentée dans la littérature pour augmenter la solubilité des protéines en fusion [Hård et al, 2002].

(i)Production

L'ADNc de p47 N-His a été préalablement cloné dans le vecteur d'expression pMal-c2x (Biolabs). La protéine recombinante est exprimée dans la souche BL21(DE3). À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et ultracentrifugation, la protéine MBP-(His)₆-p47 est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne amylose (Figure 31).

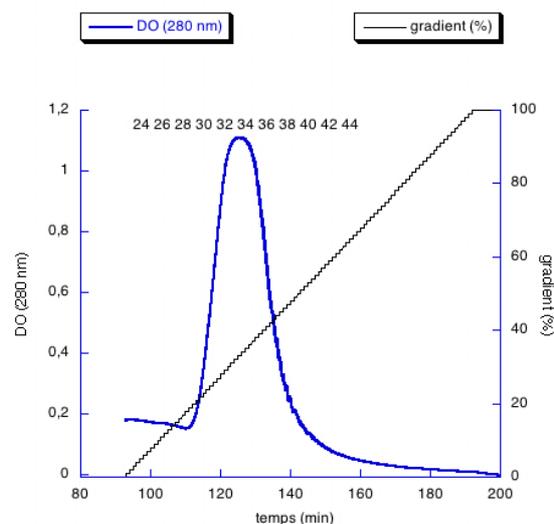


Figure 31: Chromatogramme d'éluion de la colonne d'amylose. L'éluion est faite avec un gradient linéaire de 0 à 100 mM maltose.

Les fractions du pic élué au cours du gradient ont été analysées sur gel SDS-PAGE 10%.

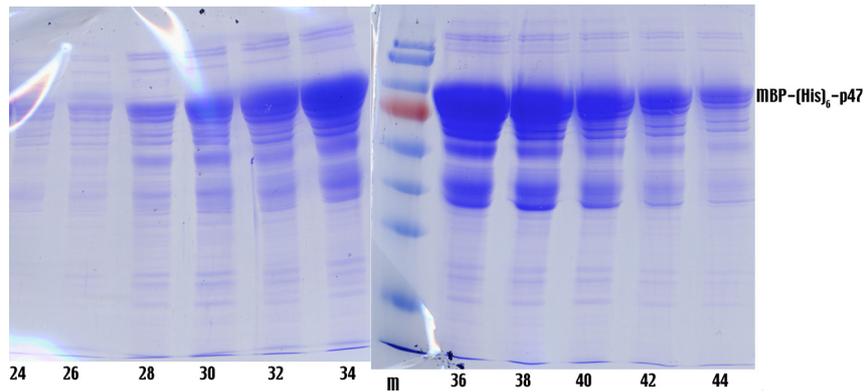


Figure 32 : gels SDS-PAGE 10% des fractions du pic élué au cours du gradient d'éluion de la colonne amylose. M est le marqueur de masses molaires (Fermentas).

D'après le gel (Figure 32), nous observons une bande à la taille attendue pour la protéine MBP-(His)₆-p47, toutes les fractions du pic sont récupérées. La séquence MBP est enlevée par coupure avec la protéase facteur Xa (Novagen) et est séparée de p47 par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA (Qiagen).

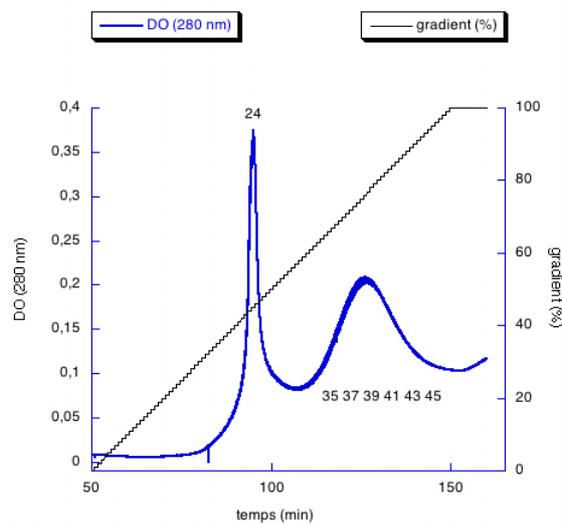


Figure 33: Chromatogramme d'éluion de la colonne Ni-NTA de (His)₆-p47 après coupure de la séquence MBP par le facteur Xa (Novagen).

Afin de déterminer le pic qui contient notre protéine, nous analysons sur gel SDS-PAGE 12% les fractions correspondantes aux pics élués (Figure 34).

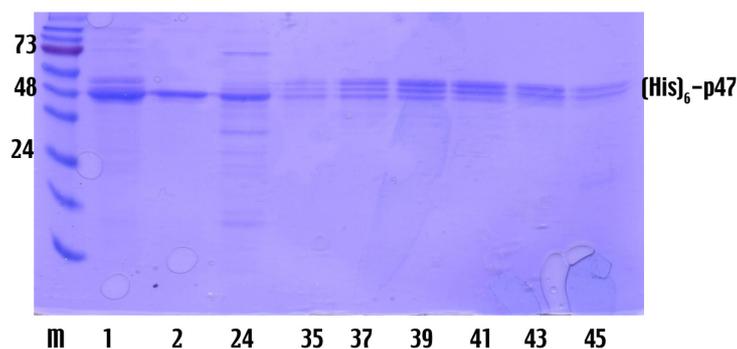


Figure 34 Gel SDS-PAGE 12% de la chromatographie de la colonne Nickel de $(\text{His})_6\text{-p47}$. M est le marqueur de masses molaires (Fermentas), 1 l'échantillon déposé sur la colonne, 2 le filtrat, les nombres suivants indiquent les numéros des fractions testées.

Les fractions contenant $(\text{His})_6\text{-p47}$ sont ensuite concentrées sur membrane YM 10 (seuil de coupure à 10 000 g/mol) puis déposées sur une chromatographie d'exclusion (Superdex 75 16/60, Pharmacia) et $(\text{His})_6\text{-p47}$ est éluée dans le tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 5% Glycérol (Figure 37).

(ii) Analyses quantitatives et caractérisation

La concentration et la quantité de protéines ont été estimées à chaque étape de purification par mesure de la densité optique à 280 nm. Nous avons ainsi une idée du rendement de purification.

	Concentration en mg/mL	Quantité en mg	Rendement (%)	Rendement cumulé (%)
Colonne amylose	3.0	16.0		
Colonne Ni-NTA	0.3	2.0	13	13
Chromatographie d'exclusion	0.1	1.0	50	6
Concentration	1.2	1.0	100	7

Tableau 3: Bilan de purification de la construction MBP- $(\text{His})_6\text{-p47}$ pour un litre de culture.

Avec cette construction qui aurait dû nous permettre d'améliorer la production de p47 N-His, nous restons au même niveau de rendement de purification qu'avec les premières constructions utilisées. La séquence polyhistidine semble donc avoir un effet défavorable sur la solubilisation de p47.

3.Caractérisation par chromatographie d'exclusion des différentes constructions de p47

Suite aux purifications, les différentes formes de p47 ont été caractérisées par chromatographie d'exclusion (chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 ou Superdex 200, Pharmacia) préalablement calibrée avec des protéines globulaires de masses molaires réparties sur toute la gamme de séparation de chromatographie d'exclusion.

a) p47 N-His, p47 C-His et p47

Les protéines p47 N-His et p47 C-His et p47 ont été caractérisées sur Superdex 200 (Pharmacia). Le protocole est le même dans tous les cas, seul change le tampon d'élution pour p47. Entre 5 et 8 mg de protéine sont injectées sur chromatographie d'exclusion et les protéines sont éluées dans un tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl et pour p47, 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 310 mM NaCl (dans le cas de p47, cette chromatographie d'exclusion fait suite au clivage de la séquence polyhistidine par la thrombine.) Dans le cas de p47 N-His, elle est éluee à environ 74 mL, ce qui d'après la calibration de la colonne correspond à une protéine de masse molaire de 90 000 g/mol alors que la masse molaire attendue est de 47 317 g/mol.

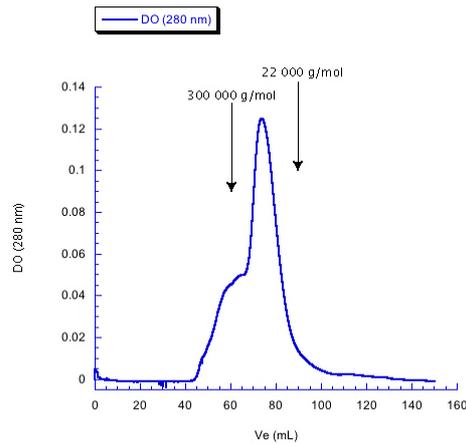


Figure 35 : Chromatographie d'exclusion de type Superdex 200 (Pharmacia) de p47 N-His. Le tampon d'élution est 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl. Le volume d'élution de p47 N-His est de 74 mL.

Le pic d'élution de la chromatographie d'exclusion de p47 N-His, (Figure 35), présente un épaulement le précédent. Cet épaulement après analyse sur gel SDS-PAGE contient aussi p47 N-His certainement sous forme d'agrégats. Cette partie ne sera pas utilisée pour les études concernant p47 N-His.

b) GST-p47

La protéine p47 issue de la construction GST-p47 a été injectée sur Superdex 75 16/60 (Figure 36) dans le cadre d'étude en spectrométrie de masse, son volume d'élution dans du tampon PBS est 55 mL ce qui correspond à une masse molaire apparente de 79 000 g/mol.

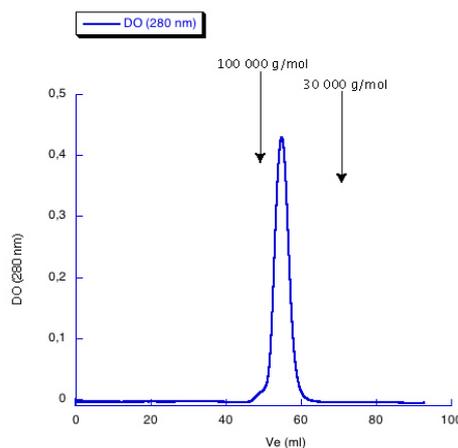


Figure 36 : Chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 de p47 (forme issue de la construction GST-p47). Le tampon d'élution est le tampon phosphate PBS de pH 7.5. Le volume d'élution de la protéine est de 55 mL.

Dans le cas de p47 issu de la construction avec la GST, le chromatogramme d'exclusion (Figure 36) ne présente pas l'épaulement contrairement à ce qui a été décrit pour p47 N-His à la Figure 35. Cette forme de p47 semble donc plus soluble que la précédente.

c) MBP-(His)₆-p47

L'échantillon de (His)₆-p47 a été déposé sur chromatographie d'exclusion de type Superdex 75. Cette étape sert à la fois d'étape de changement de tampon de la protéine mais aussi pour la caractériser.

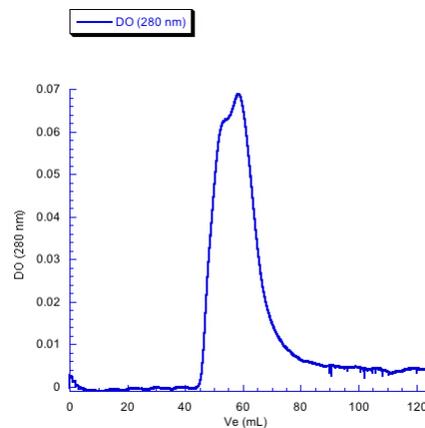


Figure 37 : Chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 (Pharmacia) de (His)₆-p47. Le tampon d'élution est 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 5% Glycérol. Le volume d'élution est de 55.6 mL.

La forme (His)₆-p47 est éluée à un volume de 55.6 mL dans un tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl (Figure 37). Ce volume d'élution correspond à une masse molaire de 76 000 g/mol. La masse molaire attendue étant de 47 517 g/mol. Enfin, le fait que le chromatogramme ne revienne pas à la ligne de base est certainement un artefact dû à un mauvais fonctionnement du détecteur de l'appareil.

d) Conclusion

D'après le Tableau 4, les masses molaires apparentes sont supérieures à celles attendues. Ce phénomène peut s'expliquer de différentes façons. La première étant de dire que nous sommes en présence d'un dimère vu que le rapport des masses est proche de 2.

Deuxièmement, cela peut signifier que la protéine est flexible, voir même présentant des zones désordonnées et donc ne pas être globulaire mais allongée. Des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles ont décrit p47 comme étant une particule allongée et non globulaire [Grizot et al, 2001b]. De plus, des expériences de centrifugation analytique ont montré le caractère monomérique de p47 [Lapouge et al, 2002] Par conséquent, les résultats que nous avons obtenus par chromatographie d'exclusion tendraient à confirmer que nous sommes en présence d'une protéine monomérique allongée.

	Masse molaire apparente en g/mol	Masse molaire attendue en g/mol	rapport
p47 N-His	90000	47317	1,9
GST-p47 Superdex 75	79000	45620	1,7
MBP-(His) ₆ -p47	76000	47517	1,6

Tableau 4: Récapitulatif des masses molaires obtenues par chromatographie d'exclusion pour les différentes formes de p47. Dans le cas de GST-p47 et MBP-(His)₆-p47, la dénomination GST et MBP sont pour rappeler la construction d'origine.

III.p47 Cter

1.Présentation

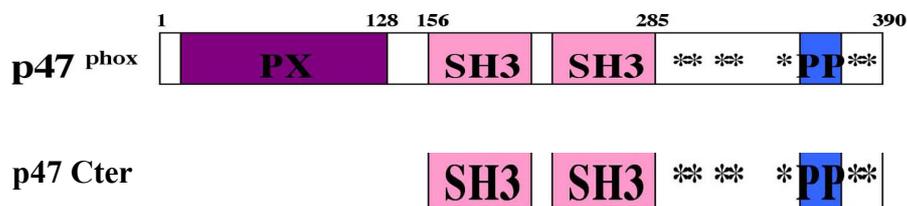


Figure 38 : Représentations schématiques de p47 et p47 Cter. * représentent les sites de phosphorylation.

La forme p47 Cter (Figure 38) ne diffère de la forme entière du facteur cytosolique p47 uniquement par l'absence du domaine de liaison aux phosphatidyl inositols, le domaine PX. Cette construction est intéressante car il a été démontré qu'elle était suffisante à la

formation du complexe entre les trois facteurs cytosoliques via une interaction entre les domaines SH3 C-terminal de p67 et PP C-terminal de p47 [Grizot et al, 2001] et à l'activation du complexe de la NADPH oxydase en système acellulaire [de Mendez et al, 1996]. Deux constructions étaient à notre disposition p47 Cter N-His et p47 Cter C-His dont l'obtention est décrite dans le paragraphe suivant.

2.Expression et purification

L'ADNc de p47 Cter a été préalablement cloné dans le vecteur d'expression pEt 15b pour la construction p47 Cter N-His et pEt 30b pour p47 Cter C-His. La protéine recombinante est exprimée dans la souche BL21(DE3). À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et ultracentrifugation, la protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA (Qiagen) (Figure 39).

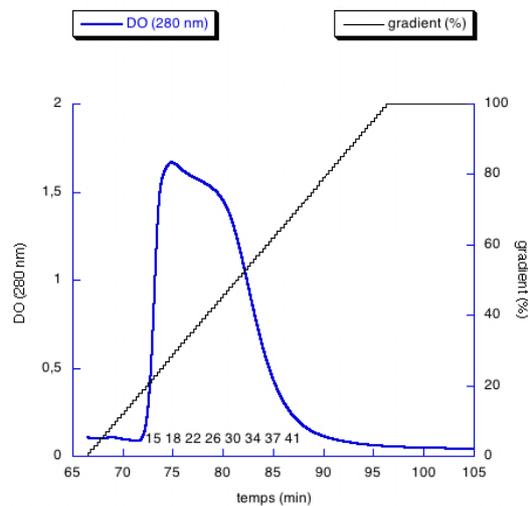


Figure 39: Chromatographie d'éluion de la colonne Ni-NTA. L'éluion est faite par un gradient linéaire de 0 à 300 mM Imidazole.

Les fractions éluées au cours du gradient sont analysées sur gel SDS-PAGE 12% afin de déterminer celles qui contiennent la protéine p47Cter.

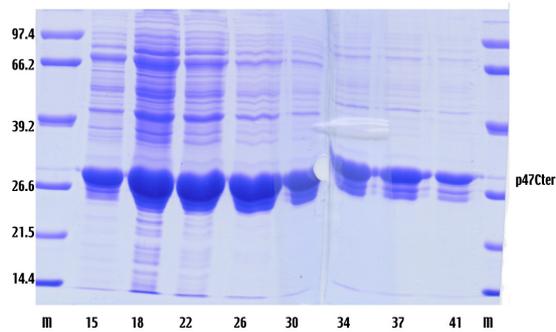


Figure 40 : Gel SDS-PAGE 12% des fractions du pic élué au cours du gradient. M est le marqueur de masses molaires (Boehringer).

Les fractions contenant p47Cter (Figure 40), c'est-à-dire les fractions 14 à 48 sont déposées sur colonne échangeuse de cations (SP Sepharose, Pharmacia) afin d'éliminer les contaminants que nous pouvons observer sur le gel.

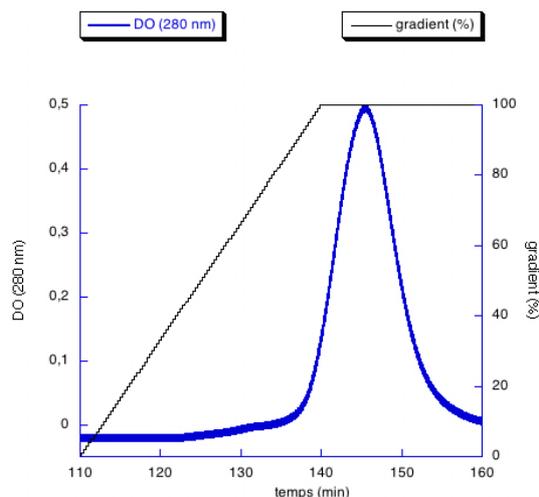


Figure 41 : Chromatogramme d'éluion de la colonne SP Sepharose. L'éluion est faite par un gradient de 0 à 500 mM NaCl.

La protéine n'est pas éluée au cours du gradient mais lors de l'étape de lavage à forte force ionique, c'est-à-dire à une concentration en NaCl de 500 mM. Cette éluion tardive peut s'expliquer par une interaction très forte entre p47Cter et la matrice ou par une surestimation de la concentration en sel présente dans le tampon. Les fractions contenant de p47Cter sont concentrées sur membrane YM 10 (seuil de coupure 10000 g/mol) puis déposées sur chromatographie d'exclusion (Superdex 200 16/60). Cette étape permet à la fois de

caractériser la protéine mais aussi de modifier son tampon. Elle est éluée dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 2 mM DTT.

3.Analyses quantitatives et caractérisation

Comme les productions précédentes, nous avons estimé la concentration et la quantité de protéines selon la même approche que celle décrite pour p47.

		Concentration (mg/mL)	Quantité de protéine (mg)	Rendement (%)	Rendement cumulé (%)
Colonne Ni-NTA	p47Cter C-His	1.4	29.0		
	p47Cter N-His	3.0	105.0		
Colonne SP Sephrose	p47Cter C-His	1.3	19.0	65	65
	p47Cter N-His	3.0	18.0	17	17
Concentration	p47Cter C-His	3.0	10.0	53	35
	p47Cter N-His	3.0	9.0	55	9
Chromatographie d'exclusion	p47Cter C-His	0.5	4.5	45	16
	p47Cter N-His	0.5	5.0	50	5
Concentration	p47Cter C-His	1.0	1.0	25	3
	p47Cter N-His	1.0	5.0	100	5

Tableau 5: Bilan de purification de p47Cter N-His et p47Cter C-His. Les valeurs sont données pour un litre de culture.

Les quantités de protéines obtenues sont faibles (Tableau 5). En effet, les différentes étapes de purification entraînent des pertes importantes, notamment la concentration ainsi que la chromatographie d'exclusion. Le faible rendement de la seconde étape s'explique par le fait qu'après la colonne Ni-NTA, il reste des contaminants (Figure 39) séparés à l'étape de chromatographie échangeuse de cations. Pour les deux constructions, les analyses en spectrométrie de masse (Figure 42) et en séquençage N-terminal, confirment la pureté de notre échantillon. La masse déterminée par spectrométrie de masse est de 28 986 g/mol, ce qui correspond à la masse attendue moins la méthionine N-terminale. Nous ne présentons le

spectre de masse uniquement de p47 Cter C-His mais le résultat obtenu pour p47Cter N-His est similaire.

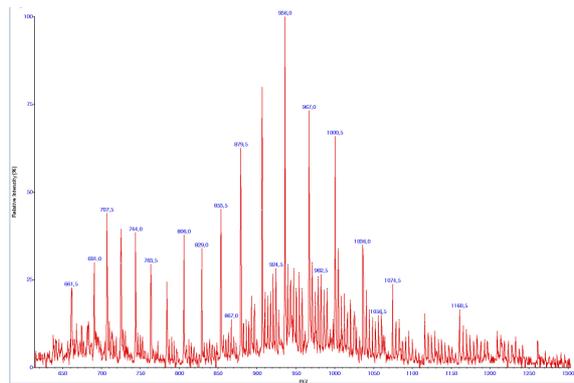


Figure 42 : Spectre de masse réalisé par électrospray après dessalage sur colonne C4 de p47 Cter C-His. Entre chaque état de charge, nous pouvons noter la présence d'adults non identifiés.

La pureté de l'échantillon obtenu est également visible sur le gel de bilan de purification, ici pour p47Cter C-His (Figure 43). D'après le chromatogramme d'exclusion (non montré ici), le volume d'élution est de 80 mL, ce qui correspond à une masse molaire apparente de 53 000 g/mol soit 1.8 fois la masse molaire attendue. Il a été décrit dans la littérature que p47Cter avait une forme allongée. Ce résultat est en accord avec notre expérience de chromatographie d'exclusion.

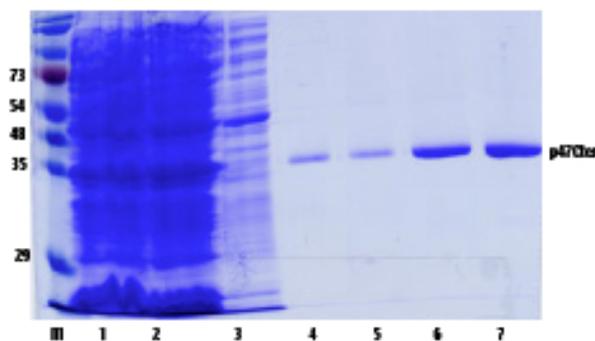


Figure 43: Gel SDS-PAGE 12% du suivi de purification de p47 Cter C-His. M représente le marqueur de masses molaires (Fermentas), 1, l'échantillon après lyse des cellules, 2, après ultracentrifugation, 3, la fraction non fixée sur la colonne Ni-NTA, 4, après colonne Ni-NTA, 5, après dilution dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH7.5, 6, après SP Sepharose, 7, après chromatographie d'exclusion.

La forme p47Cter semble plus homogène que p47 entier, mais la quantité de protéine obtenue reste cependant très faible. Nous pouvons donc supposer que le domaine PX (domaine qui

n'existe pas dans la construction p47Cter) peut induire une hétérogénéité de l'échantillon par des interactions intermoléculaires aspécifiques pouvant entraîner l'agrégation de la protéine.

IV.p67

1.Présentation

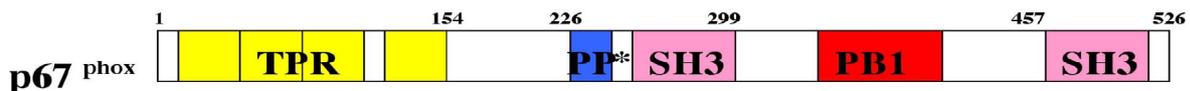


Figure 44 : Représentation schématique de p67. Les sites de phosphorylation sont représentés par *.

Le facteur cytosolique p67 est une protéine de 526 acides aminés composée de deux domaines SH3, d'un domaine polyproline, d'un domaine TPR ainsi qu'un domaine PB1 (Figure 44). Associée à p47 dans le cytosol, sous l'effet de l'activation du complexe, elle est transloquée à la membrane. De plus, elle interagit avec la protéine G Rac et avec la partie membranaire du complexe de la NADPH oxydase par l'intermédiaire de gp91 [Dang et al, 2001]. Une seule construction fusionnée à la GST est à notre disposition à l'heure actuelle. Nous allons décrire le protocole d'obtention.

2.Expression et purification

L'ADNc de p67 a été préalablement cloné dans le vecteur d'expression pGEX-6P (Amersham Biosciences). Ce clone nous a été donné par B. Babor du Scripps Research Institute (Californie). La protéine recombinante est exprimée dans la souche BL21(DE3)pLysS. À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et ultracentrifugation, la protéine GST-p67 est purifiée en « batch » sur billes de glutathion Sepharose 4B (Pharmacia). La séquence GST est enlevée par coupure avec la protéase Precision (Amersham Biosciences) (Figure 45).

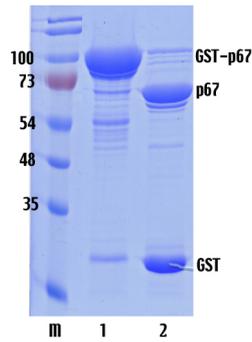


Figure 45 : Gel SDS-PAGE 12% de la coupure par la protéase Precision (Amersham Biosciences) de l'échantillon GST-p67 après élution des billes de glutathion Sepharose (Pharmacia). M est le marqueur de masses molaires (Fermentas), 1, l'échantillon avant incubation avec la Precision, 2, après 4 heures de digestion.

La séquence GST est ensuite séparée par une chromatographie échangeuse d'anions, une colonne Mono Q (Pharmacia). La protéine est éluee par un gradient linéaire de 0 à 500 mM NaCl (Figure 46).

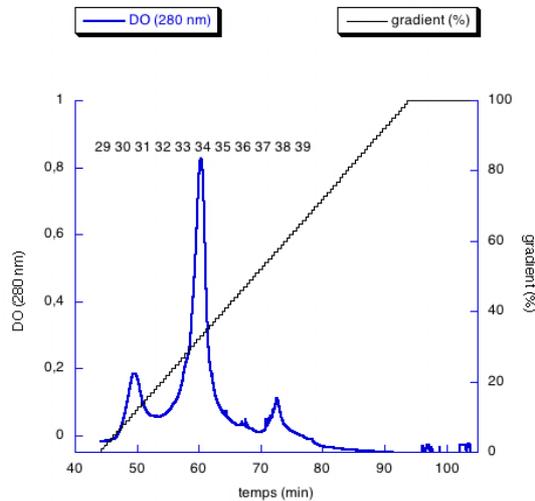


Figure 46 : Chromatogramme d'élution de la colonne Mono Q par un gradient linéaire de 0 500 mM NaCl.

Les fractions du pic principal élué au cours du gradient sont analysées sur gel SDS-PAGE 12% (Figure 47).

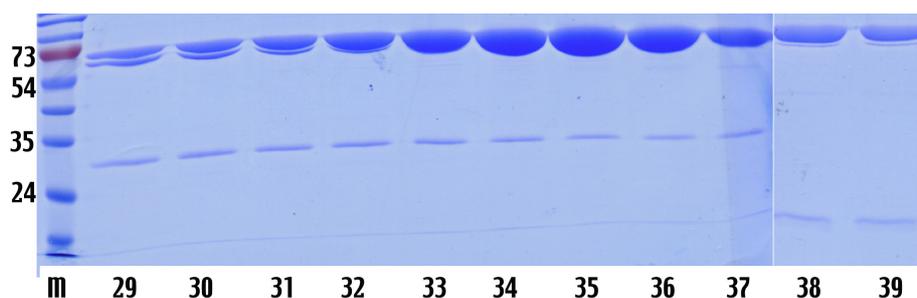


Figure 47 : Gel SDS-PAGE 12% des fractions éluées au cours du gradient linéaire de la colonne Mono Q. M est le marqueur de masses molaires, et les numéros représentent les fractions.

Une seconde espèce est co-éluee en même temps que p67, il pourrait s'agir de la GST. Les fractions contenant p67 sont ensuite concentrées sur membrane YM 30 (seuil de coupure 30 000 g/mol). A cette étape, le tampon de la protéine est remplacée par du tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5% glycérol car nous avons constaté que la présence de glycérol semble favoriser la solubilité de la protéine.

3.Analyses quantitatives et caractérisation

La quantité de p67 et la concentration sont estimées par mesure de la densité optique à 280 nm à chaque étape de purification. Le coefficient d'extinction molaire utilisé pour les calculs de concentration a été déterminé expérimentalement. Ceci nous permet de déterminer le rendement de purification de p67 (Tableau 6).

	Concentration (mg/mL)	Quantité (mg)	Rendement (%)	Rendement cumulé (%)
Glutathion Sephrose 4B	0.8	16.5		
Mono Q	0.7	2.8	17	17
Concentration	0.6	2.1	75	13

Tableau 6 : Bilan de purification pour un litre de culture de la construction GST-p67.

La purification de p67 n'est, comme la forme entière de p47, que très peu productive. Au niveau de l'étape de coupure de la séquence GST, c'est-à-dire entre la chromatographie d'affinité (glutathion Sepharose 4B) et d'échange d'anions (mono Q), la protéine p67 a

fortement tendance à s'agréger. De plus, l'échantillon de p67 est caractérisé par chromatographie d'exclusion de type Superdex 200 (Pharmacia) préalablement calibrée avec des protéines globulaires.

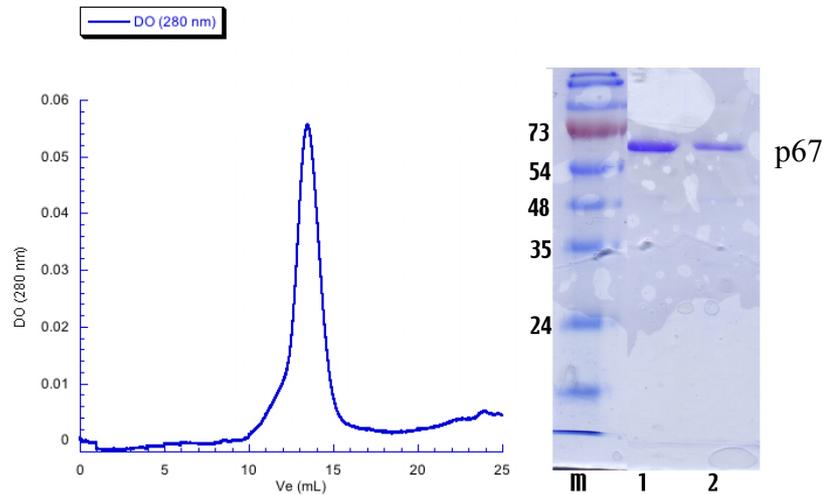


Figure 48 : Chromatogramme de la chromatographie d'exclusion de type Superdex 200 (Pharmacia). Gel SDS-PAGE 12% du pic obtenu lors de l'élution de la chromatographie d'exclusion. M est le marqueur de masses molaires (Fermentas), 1 et 2 sont les fractions du pic élué lors de deux injections différentes. Le protocole d'élution reste identique dans les deux cas.

Ces résultats seraient en accord avec les résultats précédents déterminés par des expériences de vitesse de sédimentation [Lapouge et al, 2002], qui présentaient que p67 était aussi une molécule non-globulaire (Figure 48). En effet, la masse molaire apparente est de 196 000 g/mol soit environ 3 fois la masse molaire attendue. Par contre, l'incertitude concernant son état d'oligomérisation n'est pas levée. Les expériences de diffusion neutronique et de chromatographie d'exclusion [Grizot et al, 2001] ont montré que p67 existait sous forme de dimère alors que l'ultracentrifugation analytique [Lapouge et al, 2002] indique que p67 serait sous forme monomérique. Dans les trois expériences rapportées ici, les tampons utilisés sont similaires, cependant, deux différences essentielles peuvent être mises en évidence. La protéine p67 utilisée au cours de la diffusion neutronique a été exprimée dans le système baculovirus contrairement aux deux autres expériences pour lesquelles elle a été exprimée dans *E.coli*. Cette différence ne peut expliquer le fait d'avoir un monomère ou un dimère selon le cas, puisque l'expression dans *E.coli* conduit aux deux cas de figure. La seconde différence importante est la concentration des échantillons de protéines : pour la

centrifugation analytique, p67 était à des concentrations allant de 0.3 à 0.8 mg/mL alors que pour les expériences de diffusion neutronique et rayons X, sa concentration était de l'ordre de 1.2 mg/mL. L'oligomérisation de p67 semble donc être influencée par la forte concentration en sel et avoir lieu sur des échantillons les plus concentrés.

V.p67 TPR et p67 Nter

1.Présentation

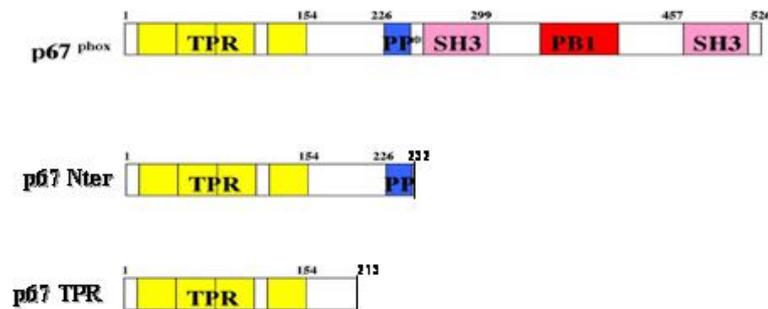


Figure 49 : représentations schématiques des constructions p67Nter et p67TPR. Les sites de phosphorylation sont indiqués par *.

La protéine p67 sous sa forme entière étant difficilement manipulable, nous avons également mené des études sur la partie N-terminale, intéressante car cette région contient le domaine d'interaction avec Rac et celui supposé interagir avec la partie membranaire du complexe. La construction p67 TPR est intéressante car elle constitue une des plus petites formes de p67 activable *in vivo*. Quant à p67Nter, elle contient le domaine de liaison avec la partie membranaire.

2.Expression et purification

L'ADNc de p67 TPR et p67Nter ont été préalablement clonés dans le vecteur d'expression pEt 15b pour p67 TPR N-His et p67 Nter N-His. La protéine recombinante est exprimée dans la souche BL21(DE3). Les deux constructions sont purifiées selon le même protocole, nous ne présenterons que la purification de p67Nter. À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et ultracentrifugation, la protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA (Qiagen).

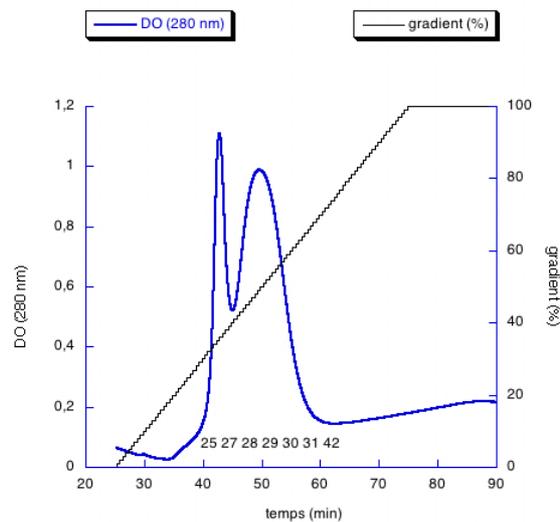


Figure 50 : Chromatogramme d'éluion de la colonne Ni-NTA (Qiagen) de p67Nter N-His par un gradient linéaire de 0 à 300 mM Imidazole.

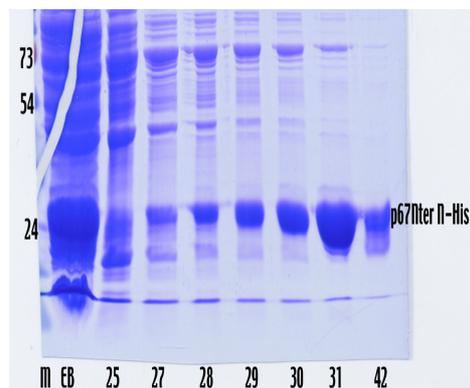


Figure 51 : Gel SDS-PAGE 12% des pics du gradient, M représente le marqueur de masses molaires (Fermentas), EB est l'échantillon après ultracentrifugation, les numéros correspondent aux fractions des pics.

Les fractions des deux pics sont déposées sur gel SDS-PAGE 12%. Dans le premier pic sont éluées les protéines interagissant aspécifiquement avec la matrice nickel. Quant au second pic, nous retrouvons p67Nter N-His (Figure 51). Les fractions contenant la protéine est déposée sur colonne échangeuse de cations (SP Sepharose) (Figure 52).

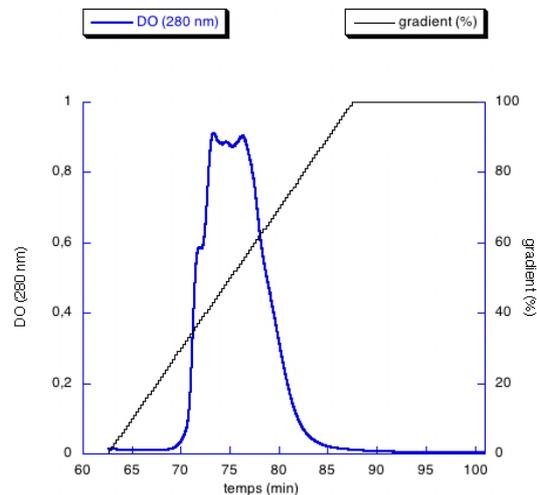


Figure 52: Chromatogramme de l'élué de la colonne SP Sepharose par un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl.

Les fractions du pic élué au cours du gradient de l'étape précédente sont concentrées sur membrane YM 10 puis déposées sur chromatographie d'exclusion (Superdex 75 16/60). Les formes p67 TPR et p67Nter sont obtenues par clivage de la séquence polyhistidine de p67 TPR N-His et p 67 Ner N-His par la thrombine. Les résultats de chromatographie d'exclusion seront présentés dans le paragraphe suivant.

3.Caractérisation des différentes formes

Les différentes formes p67Nter, p67Nter N-His, p67TPR sont caractérisées par chromatographie d'exclusion.

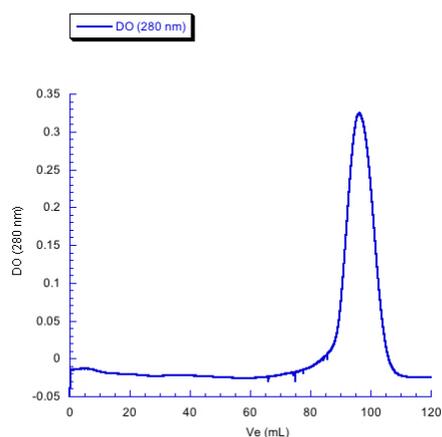


Figure 53 : Chromatographie d'exclusion (Superdex 200, Pharmacia) de p67TPR après coupure à la thrombine. V_e représente le volume d'élution.

En ce qui concerne p67TPR (Figure 53), elle a été caractérisée sur Superdex 200 (Pharmacia) le volume d'élution est de 93 mL, la masse apparente d'après la calibration de la chromatographie d'exclusion par des protéines globulaires est 17 000 g/mol alors que la masse molaire attendue est de 24 765 g/mol. L'obtention d'une masse molaire plus petite est dans ce cas certaine due à un dysfonctionnement de l'appareil.

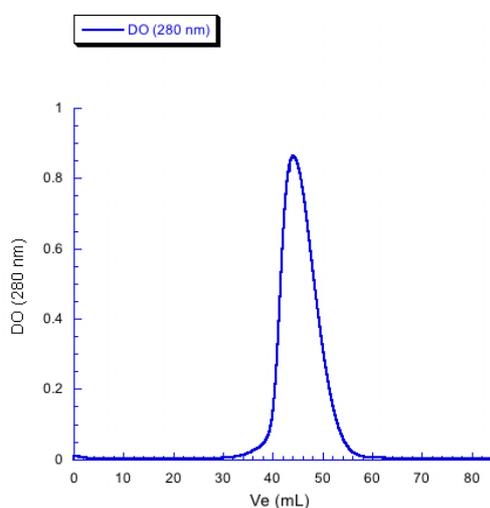


Figure 54: Chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 (Pharmacia) de p67Nter après coupure à la thrombine. V_e représente le volume d'élution.

D'après la chromatographie d'exclusion (Superdex 75, Pharmacia) (Figure 54) le volume d'élution de p67Nter est de 66 mL ce qui correspond à une masse molaire apparente de 39 000 g/mol alors que la masse attendue est de 27 710 g/mol. D'après les volumes d'élution, il

apparaît que p67TPR a une forme globulaire, tandis que p67Nter possède non seulement la partie globulaire plus une partie qui est non structurée ou bien dans plusieurs conformations différentes. La dernière hypothèse est que p67Nter est sous forme oligomérique et que la zone d'interaction se situe dans la zone se situe après le domaine TPR.

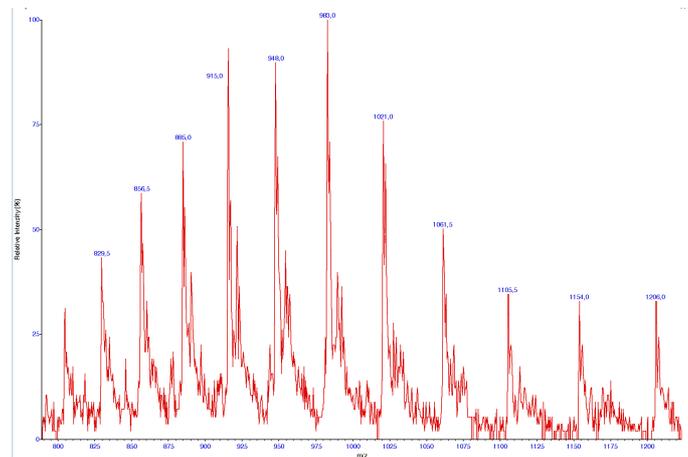


Figure 55: Spectre de masse de p67TPR N-His réalisé par électrospray après dessalage sur colonne C4.

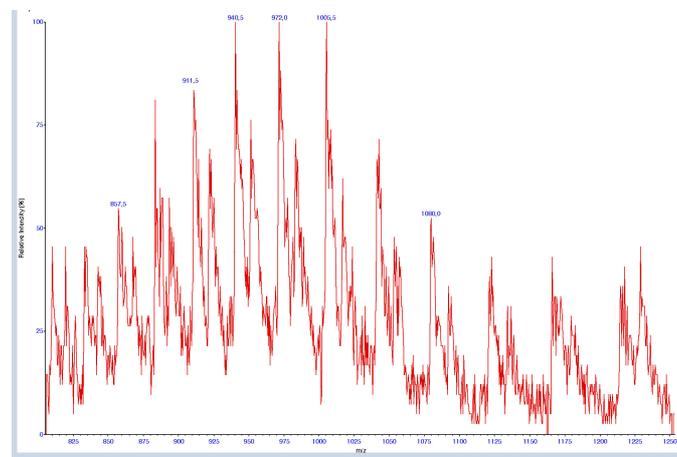


Figure 56: Spectre de masse de p67Nter N-His obtenu par électrospray après dessalage sur colonne C4.

Des analyses en spectrométrie de masse et en séquençage N-terminal ont confirmé l'homogénéité de nos échantillons, sauf en ce qui concerne p67Nter dont nous allons discuter dans le paragraphe suivant. Ici, nous présentons les résultats pour p67 TPR N-His (Figure 55), et p67Nter N-His (Figure 56). Dans le cas de p67TPR N-His, nous trouvons une masse molaire de 26 516 g/mol, en adéquation à la masse attendue de 26 647 g/mol moins la méthionine N-terminale. Pour p67Nter N-His, deux espèces sont présentes, la première correspondant à la masse molaire de p67Nter N-His moins la méthionine N-terminale (29 464

g/mol au lieu de 29 592 g/mol) et une seconde à une masse molaire de 29 124 g/mol. Après analyse, cette dernière est le produit d'une protéolyse du côté C-terminal. Le spectre de masse pour p67Nter va être présenté au paragraphe suivant.

4.Stabilité de p67Nter

Au cours des différentes purifications de p67Nter et grâce aux analyses en spectrométrie de masse, nous avons pu constater une protéolyse de l'échantillon plus ou moins importante selon les lots (Figure 57).

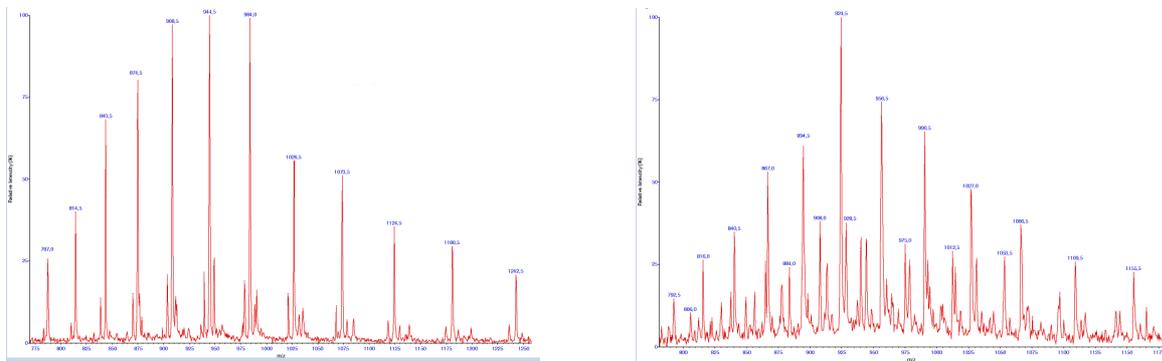


Figure 57 : Spectres de masse de p67Nter obtenus par électrospray après dessalage sur colonne C4. Le premier spectre correspond à un échantillon conservé congelé, le second a été conservé à 4°C.

D'après le séquençage en N-terminal, cette protéolyse ne pouvait avoir lieu que du côté C-terminal puisque la séquence trouvée correspondait à celle attendue en N-terminale. L'analyse de séquences résultantes des masses obtenues a montré que la protéolyse se faisait jusqu'au domaine TPR. En effet, la forme p67TPR avait été montrée comme étant plus stable. Si l'échantillon est conservé peu de temps à l'état congelé, nous retrouvons environ cinq espèces issues de la protéolyse C-terminale. Par contre, à plus long terme, il ne reste plus que deux espèces qui correspondent à la forme p67 TPR. Enfin, en absence de congélation, il n'y a que très peu de dégradation, mais nous retrouvons une masse molaire correspondante à celle attendue de 27 710 g/mol.

	Masses molaires déterminées par spectrométrie de masse (g/mol)
Lot n°1	29464, 29124
Lot n°2	22763, 24036
Lot n°3	23591, 23463, 23706
Lot n°4	22446, 22758, 23292, 23962, 24033
Lot n°5*	27710, 27367, 26300
Lot n°6*	27710

Tableau 7 : Récapitulatif des masses molaires déterminées par spectrométrie de masse pour différentes productions de p67Nter. Le lot n°1 est un échantillon de p67Nter N-His, les autres sont des échantillons sans séquence polyhistidine. Les lots indiqués par une * ont été conservés à 4°C.

Le Tableau 7 montre les masses molaires obtenues pour différents lots de p67Nter. Suivant les échantillons, une dégradation plus ou moins importante a été observée. La seule différence étant la congélation ou non de l'échantillon. La protéolyse la plus importante a été constatée pour les échantillons congelés. Nous avons donc conservé nos échantillons à 4°C en suivant leur évolution sur gel SDS-PAGE 15% (Figure 58).

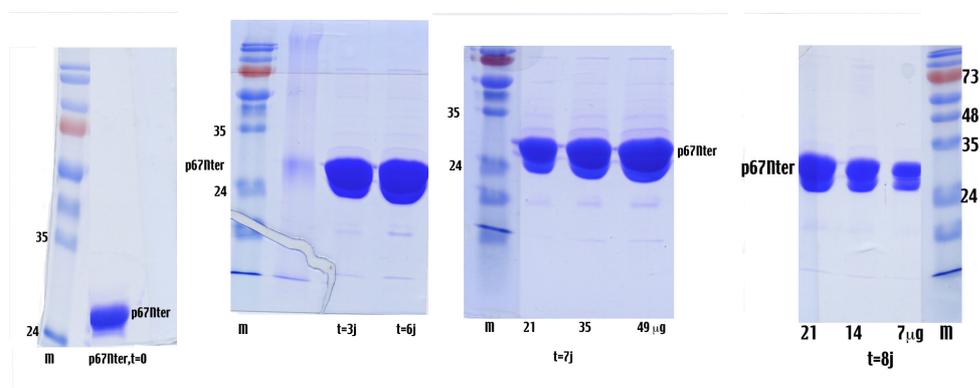


Figure 58 : Gels SDS-PAGE 15% de l'échantillon de p67Nter conservé à 4°C afin de suivre son évolution au cours du temps t, j étant l'abréviation de jours.

Le suivi de dégradation de p67Nter par gel SDS-PAGE 15% indique que la protéine se dégrade également à 4°C (Figure 58). En effet, au cours du temps, la masse globale a tendance à diminuer : la bande correspondante à la protéine s'étale vers les petites masses molaires. Cependant, la protéine p67Nter est plus stable à 4°C. La congélation de p67Nter va

entraîner une protéolyse du côté C-terminal, elle est donc conservée à 4°C et utilisée rapidement.

VI.p40 Cter

1.Présentation.

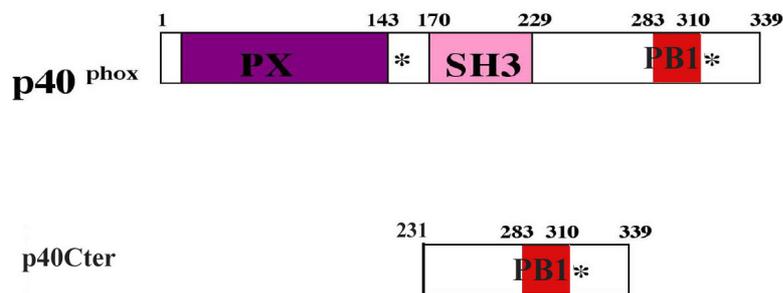


Figure 59 : Représentations schématiques de p40 et de p40Cter. * représentent les sites de phosphorylation.

La fonction exacte de p40 n'est à l'heure actuelle pas très bien connue, néanmoins, il a été démontré qu'il interagissait par son domaine C-terminal avec le domaine de p67 situé entre les deux domaines SH3. Il s'agit donc d'une interaction caractérisée comme étant de type PB1-PB1. Au début de mon travail de thèse, la seule structure de domaine PB1 connue avait été résolue par RMN chez les homologues de la levure [Inagaki et al, 2001]. Il était donc intéressant de se consacrer à l'étude structurale de ce domaine de p40 (Figure 59) seul dans un premier temps mais aussi en complexe avec son partenaire le domaine PB1 de p67Nter. Ce dernier constitue le sujet de thèse de S. Chenavas.

2.Expression et purification

L'ADNc de p40 Cter a été préalablement cloné dans le vecteur d'expression pIVEX 2.4 pour la construction p40 Cter N-His. La protéine recombinante est exprimée dans la souche C41(DE3). À partir de l'extrait brut obtenu après lyse des cellules et

ultracentrifugation, la protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA (Qiagen).

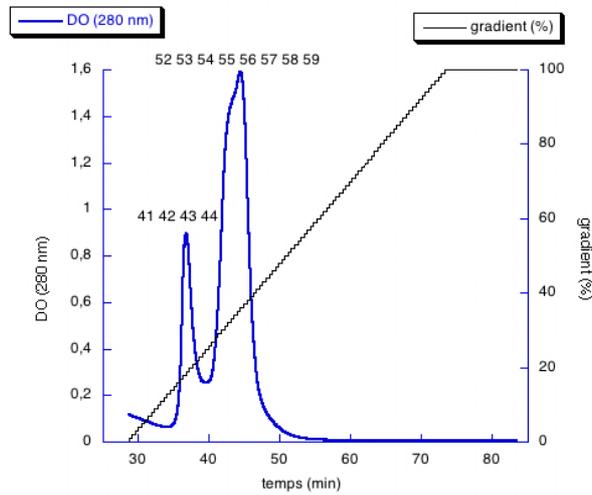


Figure 60: Chromatogramme d'éluion de la colonne Ni-NTA. L'éluion est faite par un gradient linéaire de 0 à 500 mM Imidazole. Les numéros indiquent les fractions.

Les fractions des pics élués au cours du gradient sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% (Figure 61).

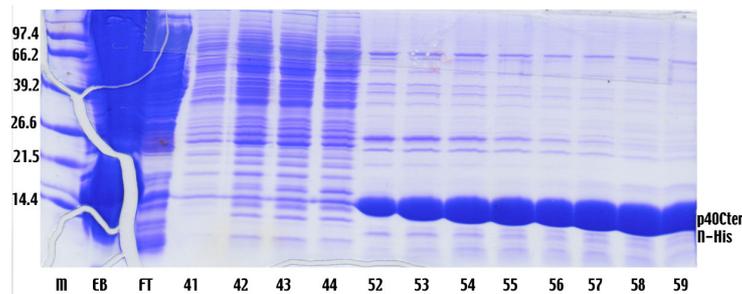


Figure 61: Gel SDS-PAGE 15% des fractions des pics élués au cours du gradient. M est le marqueur de masses molaires (Boehringer), EB l'extrait brut, et FT représente la fraction non fixée sur la colonne.

La protéine p40Cter N-His n'est présente que dans le deuxième pic, le premier pic correspond à des protéines ayant une faible affinité pour les ions Nickel et qui par conséquent vont se décrocher à une concentration plus faible en Imidazole que p40Cter N-His. Les fractions contenant p40Cter N-His sont concentrées sur membrane YM 10 (seuil de coupure 10 000 g/mol) puis déposées sur chromatographie d'exclusion (Superdex 200 16/60). La forme p40

Cter est obtenue par clivage de la séquence polyhistidine de p40 Cter N-His par le facteur Xa (Novagen) et purifié sur chromatographie d'exclusion (Superdex 75, 16/60, Pharmacia). Les chromatographies d'exclusion seront présentées au paragraphe suivant.

3. Analyses quantitatives et caractérisation.

Comme pour les protéines précédentes, la quantité de protéine et sa concentration ont été estimées à chaque étape de purification par mesure de la densité optique à 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire utilisé est la valeur théorique calculée sur le site Expasy^d d'après la séquence en acides aminés.

	Concentration en mg/mL	Quantité de protéines en mg	Rendement en %	Rendement cumulé en %
Colonne Ni-NTA	2.5	31		
Concentration	10.6	11	36	36
Chromatographie d'exclusion p40Cter N-His	0.5	3	28	10
Concentration	5.0	1	40	4

Tableau 8: Bilan de purification de p40Cter N-His pour un litre de culture.

Le rendement de purification de p40Cter N-His est relativement faible (Tableau 8). Beaucoup de protéine est perdue notamment au cours des étapes de concentration. Différents tests ont été réalisés pour tenter d'améliorer la purification de p40Cter N-His. Dans un premier temps, de l'arginine a été ajoutée au tampon de chromatographie d'exclusion. Les essais à des concentrations croissantes de 1 à 10 mM n'ont pas amélioré les conditions de concentration. Ces résultats ne sont pas montrés ici. Dans un deuxième temps, nous avons clivé la séquence polyhistidine par le facteur Xa. Les résultats de la purification dans ces conditions sont montrés dans le Tableau 9.

^d www.expasy.org/tools/protparam.html

	Concentration en mg/mL	Quantité de protéines en mg	Rendement en %	Rendement cumulé en %
Colonne Ni-NTA	3.0	30		
Concentration	7.0	29	96	96
Chromatographie d'exclusion p40Cter	0.7	13	46	43
Concentration	5.0	12.5	95	42

Tableau 9: bilan de purification de p40Cter après coupure de la séquence polyhistidine pour un litre de culture.

La suppression de la séquence polyhistidine entraîne une amélioration du rendement de purification. (Tableau 8, Tableau 9) La perte de protéine est moins importante notamment au cours de l'étape de concentration. Cependant, la protéine conserve encore une aptitude à s'agréger surtout à des concentrations élevées (supérieures à 5 mg/mL). Ceci explique la forte perte de protéine sous forme d'agrégats au niveau de l'étape de chromatographie d'exclusion. Les formes p40Cter N-His et p40Cter ont été analysées par séquençage N-terminal et spectrométrie de masse. Pour p40Cter N-His (Figure 62), la masse trouvée correspond à celle attendue soit 15 817 g/mol moins la méthionine N-terminale, confirmé par le séquençage N-terminal. Pour p40Cter (Figure 63), deux masses sont trouvées (14 076 et 13 863 g/mol), et d'après le séquençage N-terminal, nous avons deux débuts de séquence qui correspondent à deux sites de coupure du facteur Xa séparés de deux résidus.

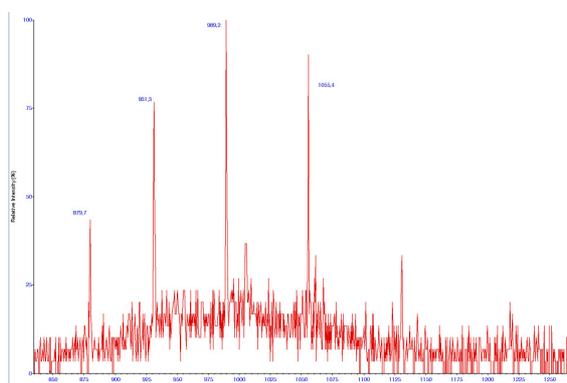


Figure 62 : Spectre de masse de p40Cter N-His par électrospray après dessalage sur colonne C4.

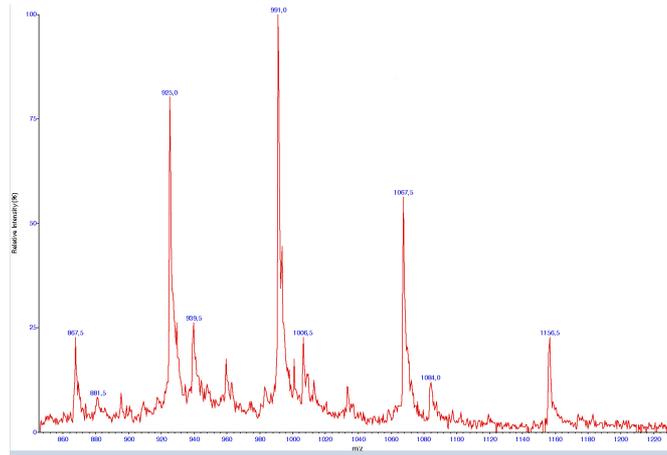


Figure 63 : Spectre de masse électrospray après dessalage sur colonne C4 de p40Cter.

L'état d'oligomérisation des deux formes p40Cter N-His et p40Cter a été analysé par chromatographie d'exclusion de type Superdex 200 pour p40Cter N-His et Superdex 75 pour p40Cter. Les colonnes ont été préalablement calibrées par des protéines globulaires sur l'ensemble de la gamme de séparation. Les deux protéines sont élués dans un tampon 50 mM HEPES.Na pH 7.5, 50 mM NaCl.

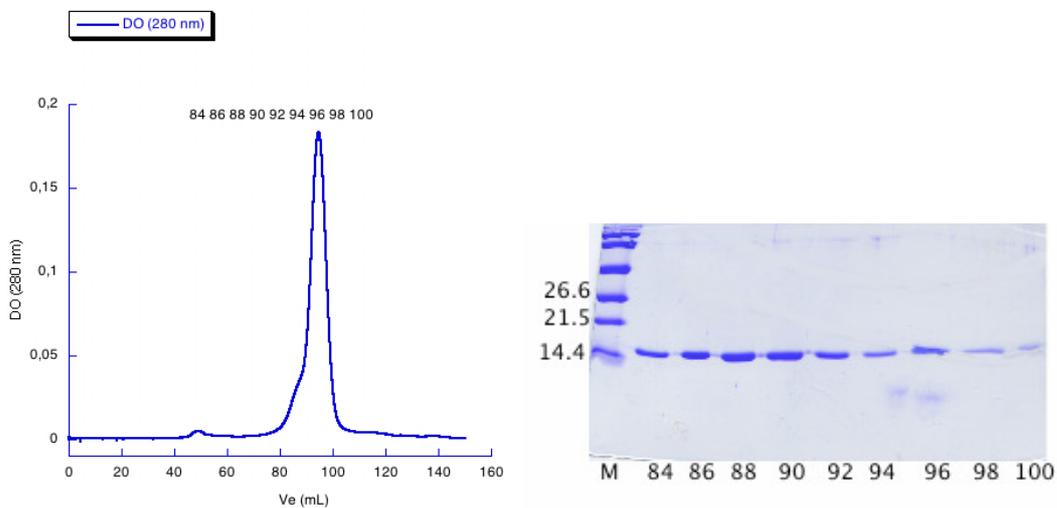


Figure 64 : Chromatogramme d'éluion de la chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 de p40Cter N-His. Le volume d'éluion V_e est de 94.6 mL. A droite, est représenté le gel SDS-PAGE 15% des fractions du pic d'éluion. M est le marqueur de masses molaires (Boehringer) et les numéros correspondent aux fractions.

Le profil d'éluion de p40Cter N-His présente un épaulement, il existe donc des agrégats dans l'échantillon. En effet, sur le gel SDS-PAGE 15%, la protéine est pure (Figure 64). La forme

p40Cter N-his est élué à un volume de 94.6 mL, ce qui correspond à une masse molaire apparente de 15 000 g/mol. La masse molaire calculée à partir de la séquence étant de 15 817 g/mol, p40Cter N-His est un monomère et nous pouvons supposer qu'elle présente une forme globulaire.

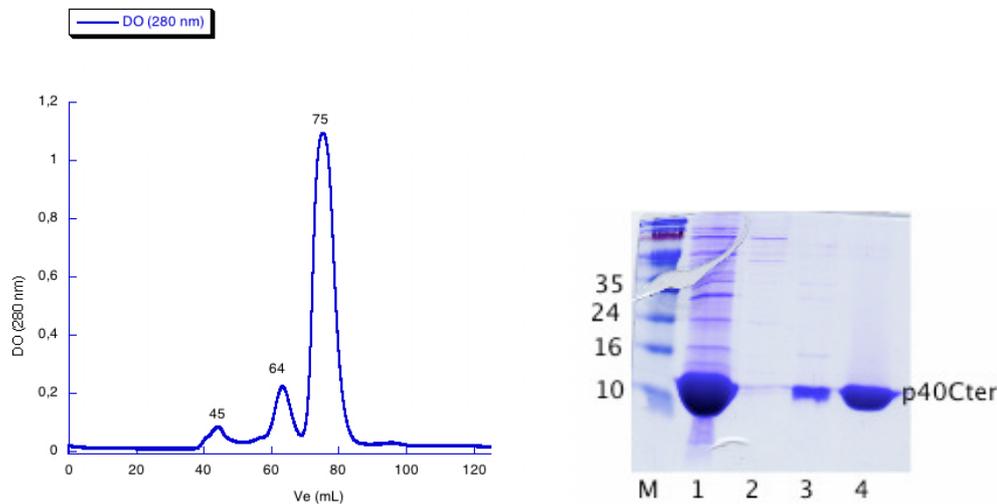


Figure 65 : Chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 de p40Cter (la séquence polyhistidine a été coupée auparavant par le facteur XA. Le volume d'éluéon V_e est de 75.1 mL. Gel SDS-PAGE 15% de l'échantillon avant dépôt sur la colonne (1), des trois pics élués dans les fractions 45 (2), 64 (3) et 75 (4). M est le marqueur de masses molaires (Fermentas).

Contrairement à la forme p40Cter N-His, le profil d'éluéon ne présente pas ici d'épaulement. La forme p40Cter est donc plus soluble. Elle est éluée à un volume de 75.1 mL ce qui correspond à une masse apparente de 22 000 g/mol. Par conséquent, p40Cter semble être dans ces conditions sous forme dimérique puisque la masse molaire attendue est de 14 076 g/mol. La seconde hypothèse qu'il est possible d'émettre est que cette forme ne soit pas globulaire et présente une plus grande flexibilité que p40Cter N-His. La séquence polyhistidine semble donc jouer un rôle dual : d'un côté elle favorise l'agrégation de la protéine mais nous pouvons supposer qu'elle la rend moins flexible.

Malgré les améliorations apportées notamment au niveau de la concentration, la forme p40Cter conserve une aptitude à s'agréger, pour pallier à ce problème, nous pourrions réduire la construction de façon à la délimiter au domaine PB1 en supprimant toute la partie en amont.

**Étude par cristallographie des rayons X
des facteurs cytosoliques du complexe de
la NADPH oxydase**

I.Introduction générale

La diffusion par une macromolécule biologique en solution placée dans un faisceau de rayons X est très faible et ne peut donc pas être mesurée avec les sources de rayons X actuelles. Il est donc nécessaire d'utiliser un grand nombre de molécules par exemple en formant un cristal. Un cristal est une répétition régulière dans l'espace d'une unité, la maille, constituée par des macromolécules et le solvant. Ainsi, les ondes diffusées par chaque maille vont s'ajouter de manière cohérente, c'est le phénomène de diffraction. Il permet d'amplifier considérablement le signal. C'est donc une méthode de choix pour l'étude structurale car elle permet d'obtenir des structures à des résolutions de l'ordre de 1Å. Depuis quelques années, les études structurales des facteurs cytosoliques ont été axées sur des domaines et non sur les protéines entières suite aux problèmes d'homogénéité et de quantité rencontrés. Nous avons donc utilisé la cristallographie tridimensionnelle pour obtenir des informations atomiques sur deux domaines alors peu connus PB1 de p40Cter et le domaine d'activation situé sur p67Nter. Dans un premier temps, nous expliciterons le cheminement conduisant à la résolution d'une structure 3D d'une macromolécule biologique par cristallographie de rayons X. Ensuite, nous présenterons les études réalisées pour les protéines p40Cter et p67Nter.

II.Principe général

La résolution de la structure d'une macromolécule biologique passe par trois étapes distinctes : la cristallisation, l'enregistrement des données de diffraction et enfin leur analyse pour déterminer la structure. Nous allons expliciter le principe de ces différentes étapes.

1. La cristallisation^e.

a) Le principe.

La détermination d'une structure tridimensionnelle d'une protéine par cristallographie des rayons X nécessite l'obtention de cristaux. La cohésion du cristal est assurée par quelques interactions intermoléculaires faibles de type van der Waals, électrostatiques et des liaisons hydrogène. La cristallisation peut se définir en trois étapes : la nucléation, la croissance cristalline et enfin, l'arrêt de la croissance. Pour permettre la nucléation, la protéine doit être amenée dans un état de sursaturation c'est-à-dire à une concentration supérieure à sa solubilité. La solubilité d'une protéine est influencée par différents facteurs comme le pH, la température, mais aussi certains composés : les agents précipitant qui peuvent être des sels, des alcools ou des polymères. Pour un paramètre donné (par exemple un agent cristallisant), il est possible de définir un diagramme de phase d'une protéine faisant apparaître sa courbe de solubilité. Elle divise le diagramme de phase en deux régions (Figure 66). Sous la courbe de solubilité, la protéine est sous forme soluble, c'est la zone de sous-saturation. Au-dessus, elle est dans la zone de sursaturation. Cette dernière se divise en trois parties (Figure 66):

- la zone métastable : la protéine reste soluble mais une faible variation d'un paramètre la rendra insoluble,
- la zone de nucléation où les cristaux vont se former,
- la zone de précipitation : la protéine va former des agrégats mais leur organisation ne sera pas périodique.

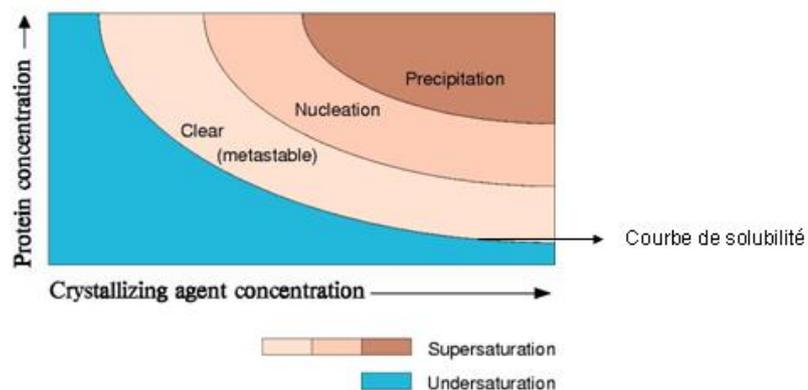


Figure 66 : Diagramme de phase d'une protéine montrant les zones de nucléation des cristaux de croissance et de précipitation en fonction de la concentration en agent cristallisant.

^e Les figures de ce paragraphe proviennent du site www-structmed.cimr.cam.ac.uk/course.html

En influençant la solubilité de la protéine, la variation de ces paramètres vont permettre ainsi le passage de la zone de sous-saturation à celle de sursaturation. L'influence des sels sur la formation des cristaux se traduit par le phénomène de « salting-in » ou de salting-out » [Ries-Kautt et al, 1992]. En effet, à faible force ionique, si la concentration en sel diminue alors la solubilité des protéines diminue également (pour des raisons de clarté, cette zone n'est pas montrée sur la Figure 66). Ce phénomène est connu sous le nom de « salting-in » et s'explique par des interactions électrostatiques entre les protéines au niveau de zones chargées. Ces interactions peuvent être masquées par la présence de sels. A forte force ionique, la solubilité des protéines diminue avec l'augmentation de la concentration en sel, c'est le « salting-out ». Dans ce cas, la protéine se comporte comme un dipôle neutre et sa solubilité est alors gouvernée par des effets hydrophobes. Les sels sont classés selon leur efficacité à faire précipiter les protéines : c'est la série de Hofmeister connue depuis 1888. Des travaux plus récents ont montré que le classement des anions dépend de la charge nette de la protéine au pH de cristallisation. Pour les protéines ayant une charge nette négative au pH de cristallisation, les anions suivent la série de Hofmeister. Quant aux protéines dont la charge nette est positive au pH de cristallisation, les anions suivent la série de Hofmeister en sens inverse.

Les solvants organiques tel que le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD) sont connus pour leur capacité à diminuer la constante diélectrique du milieu. Par conséquent, cette diminution va entraîner une baisse de la solubilité de la protéine par augmentation des forces électrostatiques. D'autres agents précipitants sont aussi utilisés : ce sont les polymères solubles ; il s'agit principalement de polyéthylène glycol (PEG) à différentes masses molaires (400 à 20 000 g/mol). Le PEG possède la capacité à précipiter les macromolécules, notamment par des propriétés de déshydratation et de compétition pour les molécules d'eau. Enfin, il est possible de contrôler les interactions protéines-protéines par ajout à la solution de cristallisation d'un additif en faible quantité par rapport à l'agent précipitant. Ces additifs qui peuvent être des solvants organiques, des sels, des détergents vont contrebalancer l'effet de l'agent précipitant et donc éviter une précipitation forte en faveur d'une cristallisation.

b) Les techniques de cristallisation :

Il existe trois méthodes principales pour amener les protéines à sursaturation en présence d'agents précipitants.

(i) La cristallisation en batch

La première méthode de cristallisation est la cristallisation dite en « batch » où la macromolécule est mélangée directement avec l'agent précipitant.

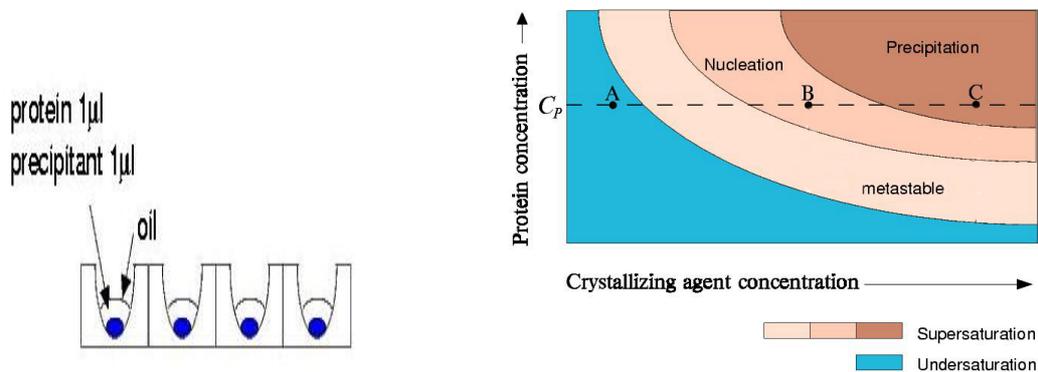


Figure 67 : Représentation schématique du principe de cristallisation en « batch ». Le diagramme de phase représentant l'évolution de la concentration en protéine en fonction de la concentration en agent cristallisant.

Dans ce cas-là, la concentration en protéine et en agent précipitant reste la même. Sous l'effet de l'agent précipitant, trois cas peuvent se présenter (Figure 67) :

- la protéine reste à l'état de sous saturation (A),
- la protéine cristallise et elle est au dessus de sa concentration de saturation (B),
- la protéine précipite à cause d'une sursaturation trop forte (C).

(ii) La cristallisation par dialyse

La seconde méthode consiste en une dialyse, c'est-à-dire en une séparation des substances en fonction de leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane. Ceci va permettre de contrôler les concentrations finales des espèces présentes dans le milieu de cristallisation.

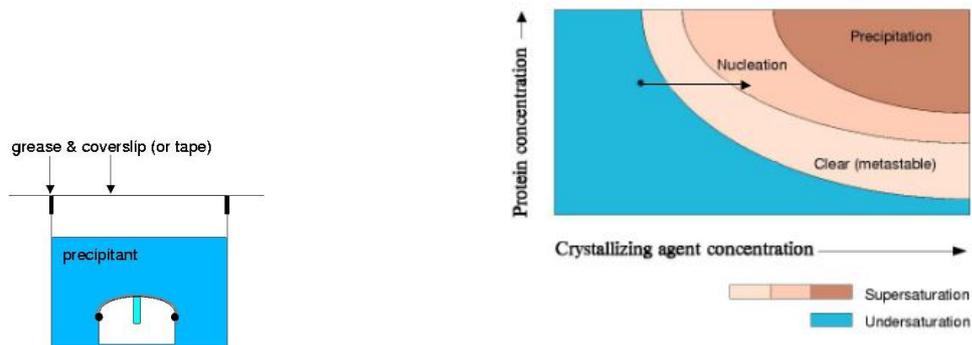


Figure 68 : Représentations schématiques du principe de cristallisation par dialyse et du diagramme de phase avec le chemin suivi lors de la cristallisation.

Pratiquement, la solution de macromolécules est séparée du réservoir par une membrane semi-perméable laissant passer les petites molécules tels que les ions, les sels. Ainsi, la concentration en protéines va rester constante alors qu'en même temps la concentration en agent précipitant va augmenter. La sursaturation est ainsi atteinte (Figure 68). L'avantage de cette méthode est la possibilité de modifier de façon facilement réversible la concentration en agent précipitant tout en contrôlant la concentration en protéine et le pH durant le processus de cristallisation.

(iii) La cristallisation par diffusion de vapeur

La troisième méthode qui est de loin la plus utilisée est la cristallisation par diffusion de vapeur. L'obtention de la sursaturation passe par l'évaporation de solvants volatils. Dans une enceinte fermée et où aucun contact n'est possible entre les solutions liquides, nous déposons une solution contenant l'agent précipitant et éventuellement des sels et des additifs, ceci va constituer le réservoir, et une solution de faible volume composée en proportion égale de protéines et de réservoir, c'est la goutte. Le processus de cristallisation passe par une diminution de la pression de vapeur d'eau au-dessus du réservoir et les espèces volatiles (eau, alcool,...) vont diffuser jusqu'à atteindre l'équilibre de la goutte vers le réservoir. L'équilibre consiste à égaliser les potentiels chimiques de la goutte et du réservoir sachant que l'agent précipitant en est le terme prépondérant. Par conséquent, la concentration de l'agent précipitant va augmenter dans la goutte pour tendre vers la concentration du réservoir entraînant ainsi l'augmentation de la concentration en protéine. De plus, l'obtention de la sursaturation et la formation des cristaux dépendent aussi de la cinétique de transfert des

échanges de vapeur. Elle est fonction de la nature et des concentrations initiales des constituants, de la température, de la taille et de la forme de la goutte et de la distance entre la goutte et le réservoir. Il existe deux dispositifs expérimentaux : la goutte suspendue et la goutte assise (Figure 69).

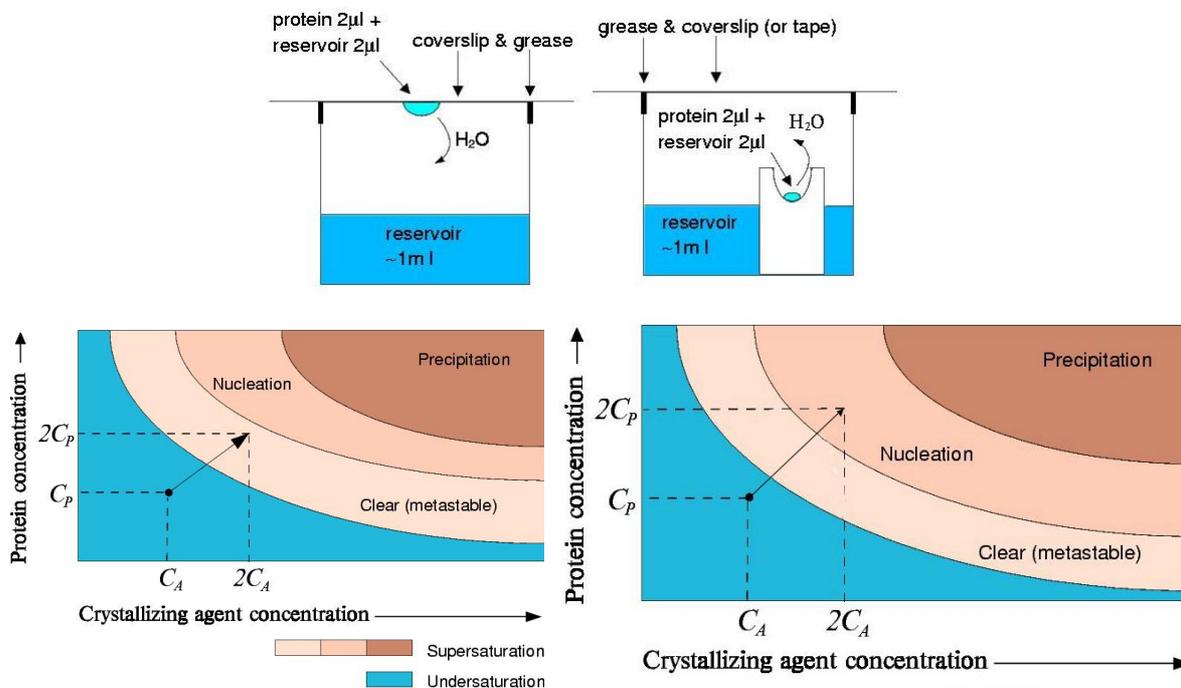


Figure 69: Représentations schématiques du principe de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte assise et en goutte suspendue et des diagrammes de phase montrant le chemin suivi dans les cas sans cristallisation (diagramme de gauche) et avec cristallisation (diagramme de droite)

La cinétique et le chemin parcouru pour atteindre l'équilibre dépendent non seulement de la méthode utilisée, mais aussi du volume du réservoir, de la distance entre la goutte et le réservoir. Ce sont des paramètres à explorer lors de la cristallisation notamment en vue de l'amélioration des cristaux.

c) Détermination des conditions de cristallisation :

La détermination des conditions de cristallisation d'une protéine passe par deux étapes principales. Dans un premier temps, des criblages de larges conditions de cristallisation incluant différents pH, sels, agents précipitants sont réalisés. Ils sont généralement établis à partir de matrices d'échantillonnages regroupant les conditions standard ou à partir de

méthodes factorielles qui vont permettre d'échantillonner un espace à N dimensions. L'optimisation des conditions dites prometteuses c'est-à-dire celles qui laissent soupçonner une nucléation : présence de points de nucléation, de petits cristaux est l'étape suivante. Ces dernières sont optimisées en faisant varier les concentrations en agent précipitant, en protéines, par modification du tampon, du pH, de la température, de la méthode de cristallisation. L'optimisation peut aussi se faire par ajout d'additifs ou par ensemencement. La technique d'ensemencement consiste en l'introduction d'un germe cristallin dans une goutte préalablement équilibrée dans des conditions précises. En effet, il peut être plus facile de former un cristal à partir de germes cristallins qu'à partir de protéines en solution. Les gouttes sont observées à la loupe binoculaire à fort grossissement permettant de distinguer des objets tels que des cristaux et des points de nucléation possédant des tailles allant de quelques microns à quelques centaines de microns. Suite à l'obtention des cristaux pour une protéine donnée, l'étape suivante sera l'enregistrement des données de diffraction.

2.Enregistrements des données de diffraction

a) Manipulation des cristaux

Afin de placer le cristal dans le faisceau de rayons X, il est généralement monté dans une boucle en fibre recouverte de la solution de cristallisation. Placés dans la boucle, les cristaux sont congelés à 100K afin d'éviter la diffusion des radicaux libres formés par les rayons X. Pour ne pas abîmer les cristaux par la formation de glace lors de la congélation, il est ajouté des cryo-protectants soit au moment de la congélation, le plus souvent, soit au moment de la cristallisation. De cette façon, les molécules d'eau sont figées (glace amorphe) sans réarrangement ordonné. La condition cryo-protectante consiste en un additif, par exemple le glycérol, dans la solution de cristallisation. Le cristal est trempé dedans avant d'être congelé dans l'azote liquide.

b) Les sources de rayons X

Le rayonnement X est une onde électromagnétique dont la longueur d'onde se situe entre 0.1 et 100Å. Dans le cas de la diffraction de cristaux de macromolécules biologiques, les longueurs d'onde utilisées sont de l'ordre de 1Å, valeur intéressante pour sonder les distances interatomiques. Ils existent deux types de sources de rayons X, les sources de laboratoire et le rayonnement synchrotron. Nous allons rapidement décrire leurs caractéristiques.

(i) Les sources de laboratoire

Dans le cas des sources de laboratoire, les électrons extraits d'un filament et par l'effet d'un haut voltage viennent bombarder une cible en cuivre. Cette collision permet l'extraction des électrons des couches internes du cuivre. Le retour à l'état d'énergie fondamentale se fait par l'émission de raies spectrales ($K\alpha_1$, $K\alpha_2$, $K\beta$,...). La raie spectrale $K\alpha$ à 1.5418Å est sélectionnée par l'intermédiaire d'un monochromateur.

(ii) Le rayonnement synchrotron

Le rayonnement synchrotron est émis par des électrons relativistes circulant dans un anneau de stockage avec une trajectoire courbe par l'application d'un champ magnétique. Les électrons émettent alors dans un spectre continu. Le long du parcours des électrons, sont placés des aimants de courbure (« bending magnet ») ou des onduleurs appelés « insertion device ». Au final, différents instruments avec des caractéristiques distinctes peuvent ainsi être à notre disposition. Suivant les monochromateurs utilisés, la longueur d'onde peut être choisie. La qualité du rayonnement synchrotron est meilleure que celle des sources conventionnelles : très forte intensité, faible divergence... Cette qualité permet par exemple l'étude de micros cristaux ou des cristaux avec une grande maille.

3. Traitements des données de diffraction

Le traitement des données de diffraction passe par plusieurs étapes, détermination de la maille et du groupe d'espace, détermination des phases et affinement de la structure.

a) Diffraction des rayons X par un cristal

La diffraction des rayons X par un cristal est un phénomène de diffusion élastique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de perte d'énergie entre l'onde incidente et l'onde diffusée, et qui se fait de manière constructive dans des directions privilégiées. Ces directions sont décrites par les indices de Miller, h, k, et l, et l'onde résultante est caractérisée par une amplitude et une phase décrites par l'expression du facteur de structure.

$$\mathbf{F}(hkl) = N \sum_j f_j \exp[-2i\pi(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

où h,k,l sont les indices de Miller du réseau réciproque, f_j est le facteur de diffusion de l'atome j de coordonnées (x_j, y_j, z_j) dans la maille. f_j est fonction du nombre d'électrons de l'atome j. N est le nombre de mailles au sein du cristal. La somme se fait sur tous les atomes de la maille. La connaissance du facteur de structure va nous permettre d'avoir accès à la densité électronique qui est la transformée de Fourier inverse du facteur de structure, soit l'expression de la densité électronique suivante :

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} \mathbf{F}(hkl) \exp[2i\pi(hx + ky + lz)]$$

V étant le volume de la maille.

Sur les clichés de diffraction enregistrés, nous avons accès à l'intensité diffusée qui correspond au carré du module du facteur de structure. Par conséquent, nous avons donc accès au module du facteur de structure et pas à la phase. Il faudra donc introduire des expériences supplémentaires pour connaître les phases.

b) Détermination du groupe d'espace et de la maille

Le traitement des données de diffraction consiste en la conversion des données brutes en intensités intégrées associées à chaque triplet d'indice de Miller (h,k,l). Ceci se fait en trois étapes. Tout d'abord, l'orientation et les paramètres de maille du cristal sont déterminés. Il est possible de le faire avec une seule image à partir des taches les plus intenses, ces paramètres sont ensuite affinés sur l'ensemble des clichés de diffraction. Ceci est fait automatiquement avec des programmes du type Denzo [Otwinowski et al, 1997] ou autre. Ensuite, à partir des paramètres précédents, la position des réflexions est prédite et les intensités sont intégrées à partir de ces positions. Enfin, l'intensité d'une réflexion unique est calculée à partir de toutes les réflexions équivalentes enregistrées sur l'ensemble des clichés : des facteurs d'échelle des différents clichés sont ainsi calculés. La qualité des données de diffraction pourra être estimée par la dispersion des intensités des réflexions équivalentes. À partir de ces intensités, il est possible de calculer le module des facteurs de structure nécessaire au calcul de la carte de densité électronique. Par contre, nous n'avons pas accès directement aux phases. Cela constitue le but de l'étape suivante.

c) Détermination de la phase.

Au niveau du problème des phases, deux cas peuvent se présenter, soit il n'y a aucune structure de protéines proches de celle étudiée, nous parlons alors de résolution *ab initio* ; soit il existe des structures similaires : c'est le remplacement moléculaire. Nous allons expliciter rapidement le principe de ces deux approches.

(i) La résolution ab initio :

L'approche *ab initio* peut se faire de deux manières différentes. Tout d'abord, nous allons considérer la méthode de remplacement isomorphe multiple. Elle consiste en l'utilisation d'atomes lourds fixés sur la protéine. Des jeux de données de diffraction de cristaux de la protéine native et de la protéine dérivée sont enregistrés. Cette méthode nécessite l'isomorphisme du cristal de la protéine native et du cristal de la protéine dérivée,

c'est-à-dire la maille doit rester identique sauf les atomes lourds. Ceux-ci ont des sites de fixation spécifiques alors ils suivront l'ordre cristallin et le facteur de structure du dérivé (F_{PH}) est la somme des facteurs de structure de l'atome lourd (F_H) et de la protéine seule (F_P), soit $F_{PH} = F_H + F_P$. Si le nombre d'atomes lourds est limité, leurs sites peuvent être détectés par une fonction de différence de Patterson calculée à partir des modules de F_{PH} et de F_P et montrant les vecteurs interatomiques liés aux atomes lourds. Connaissant la position des atomes lourds, F_H peut être déterminé. À partir de F_H et des modules de F_{PH} et de F_P , les phases associées à F_P sont déterminées par triangulation (Figure 70).

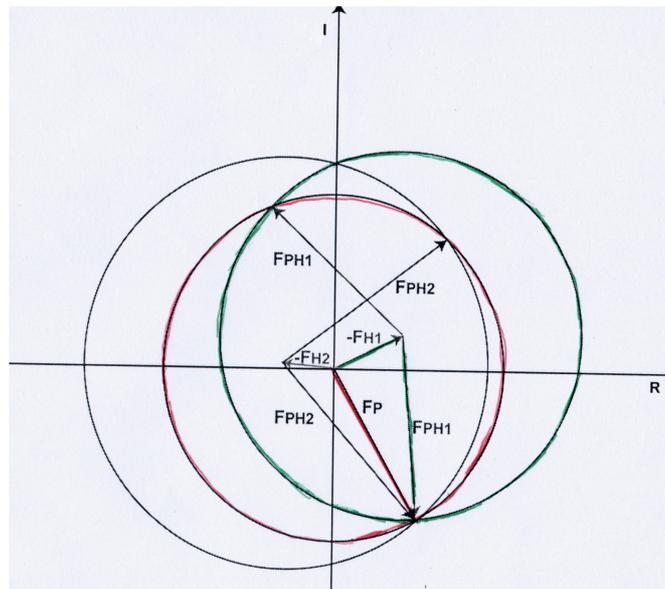


Figure 70: Représentation schématique du principe de triangulation par phasage MIR. F_P est le facteur de structure du cristal natif, F_H celui du dérivé lourd, F_{PH} celui du cristal dérivé. Dans ce cas, deux dérivés lourds différents notés 1 (vert) et 2 (rouge) ont été utilisés lors du phasage pour lever l'indétermination. Le point d'intersection des trois cercles correspond à la phase.

Avec un seul dérivé lourd, il reste une ambiguïté sur la phase : deux solutions restent possibles, pour la lever il faut utiliser un second dérivé lourd. En pratique, l'isomorphisme n'est que partiellement réalisée, ceci diminue la qualité du phasage en particulier à haute résolution.

La seconde approche consiste en l'utilisation de la diffusion anormale : la méthode MAD (Multiple-wavelength Anomalous Dispersion). Elle utilise la propriété de la variation du facteur de diffusion d'un atome au voisinage de son seuil d'absorption. Des jeux de données sont enregistrés sur un même cristal à différentes longueurs d'onde proche du seuil d'absorption du diffuseur anomal présent dans le cristal. La détermination des phases se fait

comme précédemment, l'avantage est l'utilisation d'un seul cristal donc il n'y a pas de problèmes d'isomorphisme. À l'heure actuelle, le principal diffuseur anomal utilisé est le sélénium dont le seuil d'absorption K est $\lambda=0.97974 \text{ \AA}$, il est possible de remplacer les résidus méthionines par des sélénométhionines.

(ii)Le remplacement moléculaire :

A l'heure actuelle plus de 25 000 structures ont été déposées dans la Protein Data Bank (PDB) dont la majorité a été résolue par cristallographie des rayons X. De plus, le nombre de structures nouvelles ne cesse d'augmenter. En conséquent, il est fréquent de retrouver la structure d'une protéine ayant un repliement supposé similaire à celle étudiée. Dans ce cas, il est possible d'utiliser cette structure pour déterminer les phases, c'est le remplacement moléculaire. Le principe de cette approche repose sur la détermination d'une fonction de rotation et d'une fonction de translation permettant de passer des coordonnées du modèle connu à celles de la protéine inconnue.

d) Affinement du modèle

Le modèle construit sur la base des cartes de densité électronique expérimentales va présenter des imperfections. Il doit donc être affiné afin de rapprocher au mieux les modules des facteurs de structure calculés à partir du modèle à ceux observés et aussi afin de respecter la stéréochimie. L'affinement d'une structure cristallographique repose sur une minimisation d'énergie ou sur des principes de dynamique moléculaire et se fait par exemple avec le programme CNS [Brunger et al, 1998].

III. Les facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase

1. Introduction

Trois structures ont été résolues au laboratoire au cours de ces dernières années, la structure du domaine TPR à 1.8Å [Grizot et al, 2001], ainsi que les structures du domaine SH3 de p40 seul et en complexe avec le motif PP de p47 [Massenet et al, 2002]. Nous avons donc choisi de nous intéresser dans un premier temps au domaine PB1 de p40 et par la suite à la partie N-terminale de p67. Il sera présenté ici le processus de cristallisation des deux constructions puis l'analyse des cristaux obtenus.

2. Étude structurale du domaine PB1 de p40

a) Le domaine PB1 de p40Cter

Le domaine PB1 de p40 n'a été que très récemment identifié sur l'homologue de la levure Cdc24p [Ito et al, 2001]. En effet, les 75 acides aminés Cterminaux peuvent interagir avec le domaine PB1 de Bem1p, homologue de p67 chez la levure. C'est la même région de p40 qui interagit avec p67. Les seules structures de domaines PB1 existantes ont été résolues par RMN [Terasawa et al, 2001]. Ceci explique l'intérêt de l'étude structurale par cristallographie de rayons X du domaine PB1 de p40. La construction de p40 utilisée pour les études de cristallographie de rayons X est nommée p40Cter. Le domaine PB1 de p40 est délimité aux résidus 283 à 310, mais nous avons choisi de conserver dans notre construction la région située entre le domaine SH3 et PB1, ainsi que la région C-terminale (Figure 71).



Figure 71: Représentation schématique de la construction p40Cter utilisée pour les études structurales du domaine PB1 de p40 par cristallographie de rayons X.

Les différentes étapes de production de p40Cter ont été décrites au chapitre 2. Nous rappellerons simplement que p40Cter est exprimée en fusion avec une séquence polyhistidine située du côté N-terminal.

b) Les essais de cristallisation

Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés sur la protéine avec la séquence polyhistidine. La stratégie a consisté à partir d'une seule concentration en p40Cter de 5mg/mL de tester un large échantillon de conditions à partir du screen I de Hampton Research. La technique de cristallisation utilisée est celle de diffusion de vapeur par goutte suspendue décrite plus haut. La température de cristallisation était de 20°C. Ces tests ont permis de mettre en avant les conditions en présence de sulfate d'ammonium. La condition composée par 2.0 M sulfate d'ammonium, 0.1M de Tris.HCl pH 8.5 a conduit à la formation de granules. L'étape suivante a consisté en l'optimisation de cette condition en faisant varier la concentration en sulfate d'ammonium, ainsi que le pH de la solution tampon Tris.HCl. Dans cette optique d'optimisation, l'addition du formate de sodium a également été testée. En effet, il a été plusieurs fois décrit des conditions de cristallisation ayant conduit à des cristaux et des structures composées de l'association du sulfate d'ammonium et du formate de sodium, 34 structures sont recensées dans la Protein Data Bank. Ces différents essais n'ont pas permis le passage des granules à des cristaux de p40Cter, mais seulement à un fort taux de précipitation des gouttes. Face au problème de concentration de la protéine p40Cter et à l'obtention de précipité, nous avons supprimé la séquence polyhistidine. Après cette étape supplémentaire, nous avons repris les criblages larges dans les mêmes conditions que la première fois. La majorité des conditions présentait soit des précipités soit des gouttes limpides. Ces mêmes essais ont été réalisés à une température de 8°C. A ce stade, la condition optimale semble être encore une fois le sulfate d'ammonium, nous avons donc cherché à l'optimiser notamment en faisant varier le pH, la concentration en sulfate d'ammonium, et en explorant l'addition d'additifs. Des aiguilles sont apparues dans les conditions suivantes 2.5M sulfate d'ammonium, 0.1M Tris.HCl pH8, 1.4% méthanol. La reproduction de ces cristaux et les tentatives d'optimisation ont échoué. L'alternative choisie face à l'échec de la cristallisation de p40Cter a été l'étude par RMN de la protéine seule et en complexe avec son partenaire le domaine PB1 de p67. Ce travail fait l'objet de la thèse de S. Chenavas.

3. Étude structurale de p67Nter

a) p67Nter

La construction p67Nter (Figure 72) contient à la fois le domaine TPR interagissant avec la petite protéine G Rac, et le domaine d'activation qui interagit avec la protéine membranaire gp91 lors de l'activation de ce complexe. La structure du domaine TPR a été résolue seul [Grizot et al, 2001] et en complexe avec Rac [Lapouge et al, 2000]. Au début de ce travail, il n'existait donc aucune donnée structurale concernant le domaine d'activation.



Figure 72 : Représentation schématique de la construction p67Nter (1-232). * représente un site de phosphorylation.

b) Cristallisation de p67Nter

Des premiers essais de cristallisation avaient été réalisés par S. Grizot au cours de sa thèse sur p67Nter en présence de la séquence polyhistidine du côté N-terminal. Ils avaient conduit à l'obtention de cristaux très fins et longs comme des « cheveux » par diffusion de vapeur en goutte suspendue à 20°C. La concentration en protéine utilisée était de 5-6 mg/mL et le réservoir contenait 200 mM citrate di-ammonium hydrogène, 20% PEG 3350. À partir de cette condition et après optimisation notamment en faisant varier le pH avec différentes solutions tampons, la concentration en PEG, des cristaux plus épais ont pu être observés. Leur amélioration a surtout été rendue possible par la coupure de la séquence polyhistidine au cours de la production. Les cristaux obtenus dans les conditions de PEG 3350, 100 mM acide citrique pH 5, 200 mM citrate d'ammonium sont de grandes baguettes, fines et parfois courbes. Afin d'essayer de faire grossir ces cristaux, des essais d'ensemencement ont été réalisés mais sans résultats, les cristaux ont même tendance à se dissoudre. A partir de cette condition de nouveaux cristaux ont été obtenus dans des conditions proches soit 21% PEG 3350, 100 mM acide citrique pH 5, 200 mM citrate d'ammonium, +/- 5% glycérol (Figure 73).

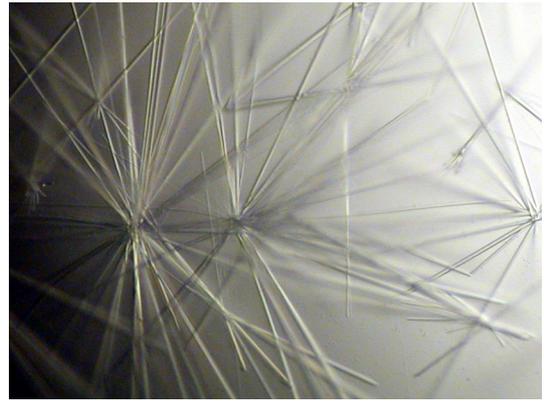


Figure 73 : Cristaux de p67Nter obtenus dans les conditions 21% PEG 3350, 100 mM acide citrique pH 5, 200 mM citrate d'ammonium. Ceux obtenus avec 5% de glycérrol sont de conformations semblables.

La dernière voie explorée ayant conduit à des changements significatifs au niveau de la cristallisation a été de modifier la solution tampon en restant à pH 5. Ces essais ont permis l'obtention de cristaux dans la condition suivante : 23% PEG 3350, 100 mM acétate de sodium pH 5, 50 mM citrate d'ammonium et congelés en présence de 20% glycérrol.

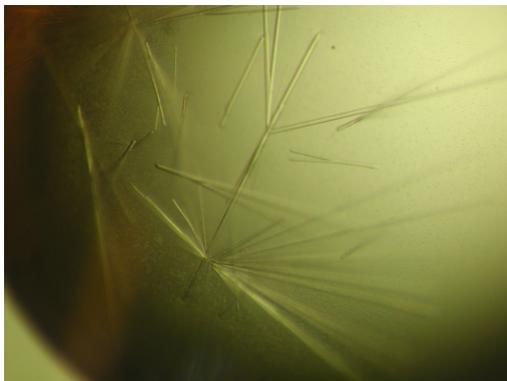


Figure 74 : Cristaux de p67Nter obtenus dans 23% PEG 3350, 100 mM acétate de sodium pH 5, 50 mM citrate d'ammonium.

Dans cette condition, la nucléation est moins importante que précédemment. Les cristaux sont moins nombreux dans la goutte et semblent plus épais que ceux obtenus auparavant.

c) Cristallographie de p67Nter

Les cristaux sont auparavant trempés dans une solution cryo-protectant de même composition que le réservoir plus 10% de glycérol et congelés. Les premiers tests de diffraction ont été réalisés au laboratoire sur des cristaux obtenus dans 15% PEG 3350, 200 mM citrate d'ammonium, 100 mM acide citrique pH 5. Aucune tâche de diffraction n'est observée, par contre la condition cryo-protectante semble convenir. Ces mêmes cristaux ont été testés sur BM30A à l'ESRF, ils diffractaient jusqu'à 7Å de résolution. Les cristaux obtenus dans les conditions de PEG 3350 21%, 100 mM acide citrique pH 5, 200 mM citrate d'ammonium, +/- 5% glycérol ont été testés sur la ligne microfocus ID13 de l'ESRF. Les cristaux étant de fines baguettes, cette ligne permet de cibler précisément sur le cristal, et du fait de l'intensité du faisceau, les tâches de diffraction seront plus intenses mais la dégradation du cristal plus rapide. Un jeu de données couvrant un domaine angulaire de 190° en translatant le point d'impact du faisceau régulièrement le long de la baguette a été enregistré. La résolution maximale obtenue est de 3Å.

Distance cristal détecteur	200 cm
Longueur d'onde	0.9755Å
φ	190 °
$\Delta\varphi$	1°
Temps d'exposition par $\Delta\varphi$	3*1s
Résolution maximale	3Å
Maille	a = 50 Å, b = c = 120Å, $\alpha = 60^\circ$, $\beta = \gamma = 90^\circ$

Tableau 10 : Récapitulatif des conditions de diffraction des cristaux de p67Nter sur la ligne ID13 (ESRF)

Le traitement des données de diffraction enregistrées sur la ligne ID13 par Denzo [Otwinowki et al, 1997] et ensuite Mosflm [Powell et al, 1999], deux programmes permettant l'intégration des données, ont permis de déterminer les paramètres de maille du cristal. Les paramètres de maille sont les suivants a = 50 Å, b = c = 120Å, $\alpha = 60^\circ$, $\beta = \gamma = 90^\circ$ et il appartient au groupe de Laue de type P3. Les essais de mise à l'échelle réalisés avec le programme Scala (suite CCP4 [CCP4 collaborative computational project, 1994]) ont échoué. D'autres essais ont été réalisés sur la ligne FIP de l'ESRF avec les cristaux obtenus dans 23% PEG 3350, 100 mM acétate de

sodium pH 5, 50 mM citrate d'ammonium et congelés en présence de 20% glycérol. Un jeu de diffraction sur 120° a alors été enregistré. Les clichés de diffraction obtenus sont de meilleurs de qualité que les précédents. Leur traitement par le programme xds [Kabsch et al, 1993] a permis l'indexation et par la suite la mise à l'échelle. Le groupe d'espace du cristal est le groupe $P3_1$.

Distance cristal détecteur	200 cm
Longueur d'onde	0.9795 Å
φ	120°
$\Delta\varphi$	1°
Temps d'exposition par $\Delta\varphi$	60 s
Résolution maximale	3 Å
Maille	$a = 50 \text{ \AA}, b = c = 120 \text{ \AA}, \alpha = 60^\circ, \beta = \gamma = 90^\circ$

Tableau 11 : Récapitulatif des données de diffraction des cristaux de p67Nter sur la ligne BM30A (ESRF).

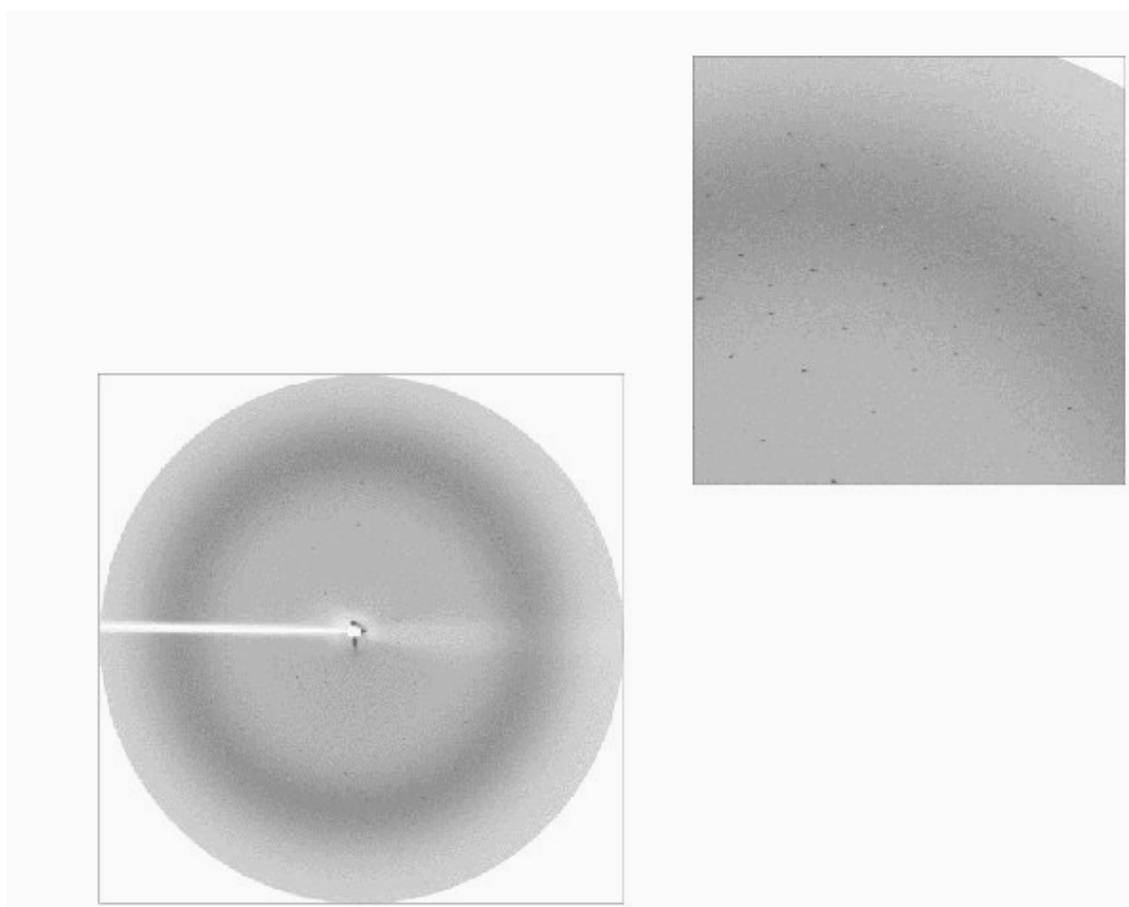


Figure 75 : Cliché de diffraction d'un cristal de p67Nter sur la ligne BM30A (ESRF). La résolution maximale de diffraction est de 2 Å.

Le remplacement moléculaire a pu être fait en utilisant comme modèle la structure de p67TPR (1HH8, référence PDB) et une carte de densité électronique a pu ainsi être calculée. La comparaison entre la carte de densité électronique calculée et le modèle ne montre pas de densité supplémentaire par rapport au modèle.

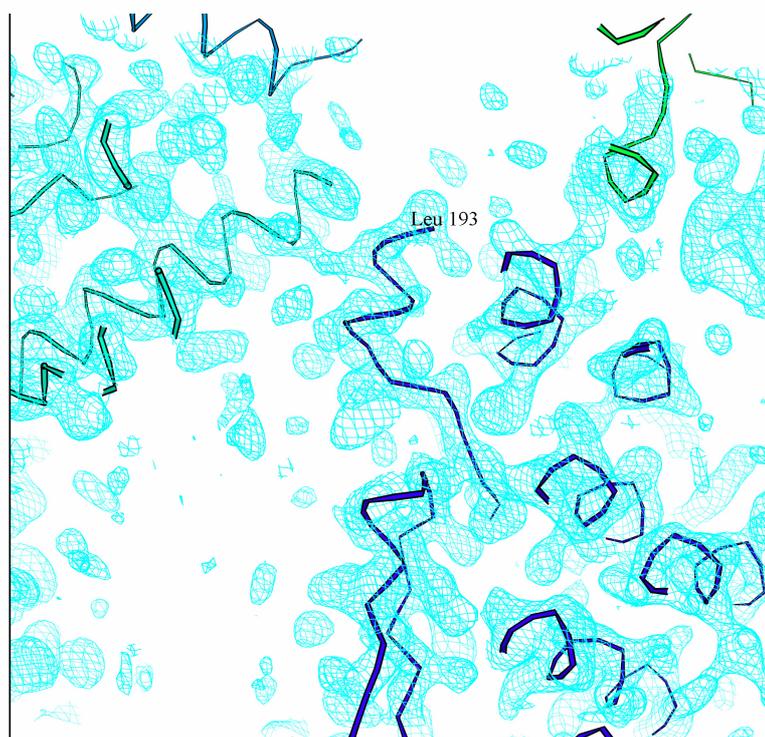


Figure 76 : Superposition de la carte de densité électronique calculée par remplacement moléculaire à partir des données enregistrées sur la ligne FIP de l'ESRF et du modèle (p67TPR, code PDB : 1HH8). Il n'est représenté que la partie C-terminale du modèle. Les chaînes représentées dans cette figure correspondent à quatre molécules reliées par symétrie cristallographique.

L'analyse en spectrométrie de masse de l'échantillon de protéine utilisée pour la cristallisation a montré que la protéine p67Nter a été protéolysée du côté C-terminal. En fait, nous retrouvons parmi toutes les espèces présentes la forme correspondante au domaine TPR. C'est cette forme qui a cristallisé. En corrélation avec ce résultat, nous nous sommes aperçus que la qualité de la diffraction dépendait de l'état de protéolyse de la protéine. En effet, en rapprochant les résultats de spectrométrie de masse et la résolution maximale obtenue nous avons constaté que lorsque la protéine p67Nter n'était peu ou pas dégradée la qualité de diffraction est moins bonne que lorsque la protéolyse était plus importante. Ceci laisse supposer que le domaine d'activation de p67Nter est une région flexible ce qui pose un

problème au processus de cristallisation. Nous pouvons ainsi expliquer le fait de ne pas pouvoir augmenter l'épaisseur des baguettes, et aussi la mauvaise qualité de diffraction.

**Étude des facteurs cytosoliques du
complexe de la NADPH oxydase à
l'interface air-eau.**

I.Introduction générale

Actuellement, la cristallographie des rayons X et la RMN sont des méthodes de choix pour la détermination de structure de protéines à l'échelle atomique. Une des limites à la cristallographie des rayons X est l'obtention de cristaux suffisamment ordonnés. Quant à la RMN, sa limite principale est la taille des protéines étudiées. Cette limite se situe, à l'heure actuelle, entre 20000 et 40000 g/mol. Une des alternatives à l'étude structurale des protéines est la cristallisation 2D et la microscopie électronique. Devant les difficultés rencontrées lors des études en cristallographie de rayons X des facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase et pour les essais réalisés sur des domaines isolés de ces facteurs, nous avons donc choisi la cristallisation bidimensionnelle sur monocouches de lipides et la microscopie électronique pour tenter d'obtenir des informations structurales les concernant. Parallèlement, les monocouches ont été caractérisées par les techniques d'ellipsométrie. Dans un premier temps, nous présenterons la technique de formation des monocouches, avant de discuter des études réalisées en microscopie électronique et de la caractérisation des monocouches.

II.Monocouches de protéines à l'interface air-eau.

1.Principe général de formation des monocouches.

La technique de formation des monocouches utilisée est basée sur celle de cristallisation bidimensionnelle (2D) décrite par Kornberg en 1983 [Uzgiris et al, 1983]. Elle utilise, en effet, le principe d'interaction d'une protéine en solution avec un ligand immobilisé à la surface de l'eau. La première technique pour former cette monocouche faisait intervenir des interactions mettant en jeu des lipides « haptènes » (interaction entre le lipide « haptène », le N-dinitrophényl phosphatidyl éthanolamine DNP-PE et l'anti-corps monoclonal IgG) ainsi que des lipides chargés en nucléotides. Par la suite, pour des raisons de limitations du nombre de protéines cristallisables via ces interactions, des lipides modifiés ou lipides ligands ont été

synthétisés comme par exemple les lipides biotinylés interagissant avec la streptavidine [Blankenburg et al, 1989]. Aujourd'hui, deux types principaux d'interactions sont utilisés :

-des interactions spécifiques via une reconnaissance moléculaire par exemple entre une séquence polyhistidine des protéines et des lipides ligands chélatant le Nickel [Kubalek et al, 1994] [Dietrich et al, 1995], (ils peuvent ainsi se lier aux protéines exprimées avec une séquence polyhistidine du côté N ou C terminal en vue de leur purification),

-des interactions ioniques avec des lipides chargés négativement ou positivement [Darst et al, 1988].

2.Les lipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles constitués de deux chaînes aliphatiques hydrophobes pouvant être saturées ou insaturées et une tête polaire hydrophile contenant un groupement phosphate. Les lipides peuvent être partagés en deux catégories :

-les lipides modifiés décrits précédemment, c'est-à-dire possédant au niveau de la tête polaire un groupement leur permettant d'interagir spécifiquement avec un partenaire tel que le groupement NTA chélatant le Nickel et pouvant ainsi interagir avec une séquence polyhistidine. Ce sont les lipides ligands,

-les lipides ne possédant pas de groupement supplémentaire, appelés lipides diluants. Ils ont pour fonction de fluidifier la monocouche de lipide et ils peuvent aussi être utilisés pour mettre en jeu des interactions ioniques.

Au cours de nos différentes expériences, nous avons utilisé différents lipides dont nous allons rapidement décrire la structure. Ce sont tous des phospholipides de synthèse provenant de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster USA). De plus, ils sont naturellement présents dans l'organisme dans les réserves lipides et les membranes. Une seule sorte de lipides ligands a été utilisée au cours de notre étude, le Ni-NTA-DOGS (Figure 77). Il s'agit d'un lipide composé de deux chaînes aliphatiques identiques composées de l'acide gras 9-cis-octadécenoic possédant 18 carbones et une insaturation cis. Il est modifié au niveau de sa tête polaire par un groupement nitrilotriacétate (NTA) qui va chélater un ion Nickel et donc pouvoir interagir avec la séquence polyhistidine des protéines étudiées.

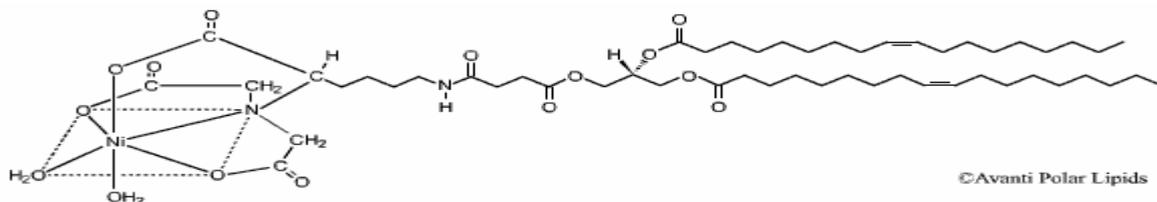
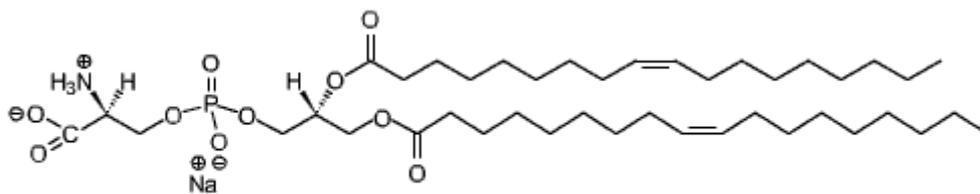


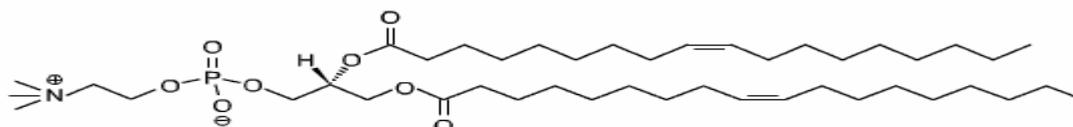
Figure 77 : Formule du lipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-[N-(5-amino 1carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] (Nickel salt) ou Ni-NTA-DOGS

Les lipides ligands sont dilués dans des lipides sans interactions spécifiques pour la protéine, ceci afin de donner une certaine fluidité à la monocouche et permettre la diffusion latérale des complexes lipides protéines au sein de la monocouche. La fluidité de la monocouche lipidique est un facteur important dans le processus de cristallisation 2D. Il existe une corrélation directe entre la fluidité du film de lipides et la formation de cristaux. Dès que les protéines sont adsorbées et concentrées à la monocouche, l'organisation des protéines dépend de la diffusion dans le plan des complexes lipide-protéine. Le processus de diffusion est contrôlé par des interactions lipides-lipides et protéines-protéines. Du fait de la forte interaction entre la séquence polyhistidine d'une protéine et le lipide chelaté par un ion Nickel, le complexe formé se déplace peu, donc il est nécessaire de former la monocouche lipides-protéines dans une phase fluide de lipides. Cette fluidité peut être assurée soit par des lipides branchés soit par des lipides insaturés comme ceux que nous avons utilisés [Courty et al, 2002], [Calvert al, 1997]. D'où l'intérêt d'utiliser des lipides diluants. L'importance de la proportion lipides ligands/diluants sera explicitée plus tard dans ce chapitre. Les lipides diluants utilisés sont le DOPC (Figure 79), le DOTAP (Figure 80), le DOPE (Figure 81) et le DOPS (Figure 78). Leurs chaînes aliphatiques sont composées de l'acide gras 9-*cis*-octadécanoïc possédant 18 carbones et une insaturation *cis*. La différence provient de la tête polaire. Un autre lipide diluant a été une fois utilisé, il s'agit d'un mélange de lipides provenant de la membrane d'*E.coli*.



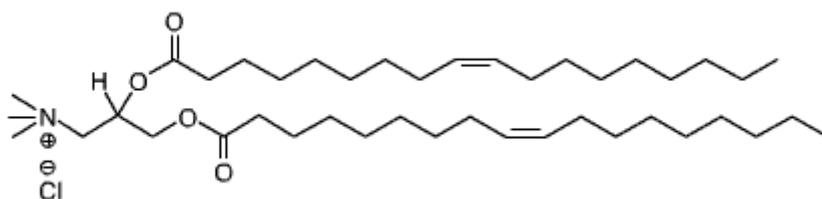
©Avanti Polar Lipids

Figure 78 : Formule du lipide 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine] (Sodium Salt) ou DOPS



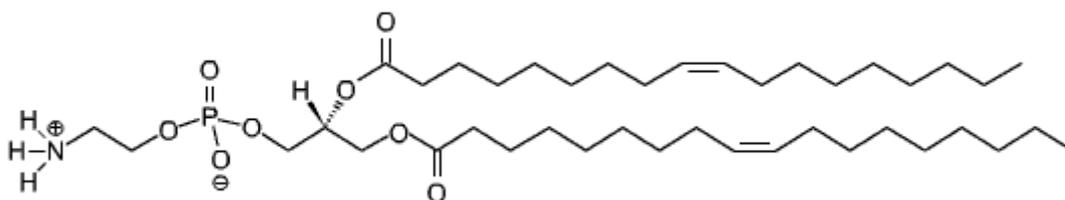
©Avanti Polar Lipids

Figure 79 : Formule du lipide 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine ou DOPC



©Avanti Polar Lipids

Figure 80 : Formule du lipide 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane (Chloride Salt) ou DOTAP



©Avanti Polar Lipids

Figure 81 : Formule du lipide 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine ou DOPE

Du fait de la présence de groupement NH_3^+ et HPO_4 sur certains lipides utilisés comme le DOPE et le DOPC et en plus d'un groupement COOH sur le DOPS, il est possible de calculer le pK_a pour chacun d'entre eux. Ainsi, en fonction du pH de la solution tampon, leur charge relative sera différente. Dans le cas du DOPS, pour un pH supérieur à 4, il sera chargé

négativement alors que le DOPC et le DOPE seront à partir de ce même pH neutre sur toute la gamme de pH sauf le DOPE qui aura une charge positive à partir de pH 8. Par contre, ils seront tous chargés positivement à un pH inférieur à 4.

3. Formation des monocouches

Le processus de formation des monocouches et de cristallisation se déroule en trois étapes [Brisson et al, 1994] (Figure 82). Dans une cuve en téflon remplie d'une solution tampon, nous déposons à la surface les lipides en solution dans du chloroforme. Après évaporation du solvant et formation de la monocouche de lipides à l'interface, les protéines sont injectées en sous-phase. Ces dernières vont s'adsorber aux lipides ligands et les complexes protéines lipides diffusent dans le plan grâce aux lipides diluants. Enfin, les protéines s'auto-organisent et éventuellement forment des cristaux 2D.

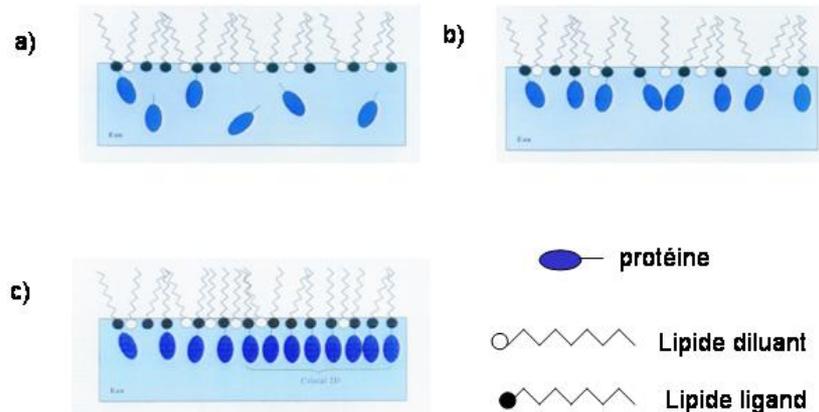


Figure 82 : Représentation schématique du processus de cristallisation 2D de protéines sur une monocouche de lipides à l'interface air-eau : a) adsorption des protéines à la monocouche lipidique, b) diffusion dans le plan des complexes lipides-protéines dans la monocouche, c) auto-organisation des protéines et formation des cristaux 2D.

La technique utilisée est la même pour la microscopie électronique et l'ellipsométrie. La seule différence est la cuve utilisée : pour la microscopie électronique, les monocouches sont faites dans des plaques à puits de volume de 50 μ L, l'ensemble solution et monocouche d'un puit

est appelé goutte. Pour l'ellipsométrie, la cuve est circulaire de diamètre de 30mm et de volume 3mL.

III. Microscopie électronique

1. Les différentes étapes de la microscopie électronique

Au cours de ce chapitre, il sera présenté les différentes étapes de l'étude d'une protéine par microscopie électronique.

a) La cristallisation 2D

La cristallisation 2D suit la méthode de formation de monocouches des protéines à l'interface air-eau décrite dans le paragraphe précédent. Nous préciserons simplement que les conditions requises pour la cristallisation 2D de protéines sont les suivantes [Brisson et al, 1994]:

-l'immobilisation dans un plan qui est réalisée grâce à des monocouches de lipides ligands présentant une interaction spécifique pour la protéine,

-la mobilité dans le plan pour permettre l'échantillonnage des différentes interactions possibles conduisant à la mise en ordre : les lipides insaturés permettent d'assurer cette mobilité car ils forment une monocouche de Langmuir en phase fluide,

-leur orientation doit être identique par rapport à la verticale : elle est facilitée par la spécificité d'interaction avec le ligand. La longueur du bras espaceur entre le nickel et la tête phospholipidique peut aussi influencer l'orientation des protéines.

b) Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission

Pour analyser la structure de l'échantillon, il existe deux techniques de préparation : la coloration négative et la cryo-microscopie.

(i) La coloration négative.

La présence ou l'absence de cristaux est révélée dans un premier temps par coloration négative. Cette technique facile à mettre en place consiste dans le transfert de la monocouche lipide protéine sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone [Baumeister et al, 1978] : les lipides vont interagir avec le film de carbone via des interactions hydrophobes. La couche est ensuite détachée de la surface de l'eau puis colorée par de l'acétate d'uranyl [Greener et al, 1959]. C'est la méthode de transfert de Langmuir-Schaefer [Brisson et al, 1999]. La coloration négative assure un fort contraste du fait de la présence d'atomes lourds autour des protéines et donne une information sur l'enveloppe de la protéine. C'est la première étape qui permet de déterminer les conditions de cristallisation et d'avoir des données structurales à basse résolution.

(ii) La cryo-microscopie électronique

Une fois les conditions de cristallisation trouvées, afin de pouvoir enregistrer des données sur tout l'échantillon, l'échantillon est congelé, c'est la cryo-microscopie développée par Dubochet [Dubochet et al, 1988]. L'échantillon (particules isolées ou cristaux 2D) est ainsi congelé au sein d'une couche de glace amorphe très mince. Le contraste de densité électronique est moins élevé mais l'échantillon est mieux préservé. La microscopie donne accès à la structure interne de l'échantillon.

c) Formation de l'image et enregistrement des données

La formation de l'image se fait de la même manière en microscopie électronique à transmission et en microscopie optique. Deux images de l'objet sont formées successivement, la première dans le plan focal de la lentille : c'est le cliché de diffraction ; la deuxième dans le plan image, nous avons alors la projection bidimensionnelle de l'objet. Mathématiquement, la formation de l'image se traduit par une transformée de Fourier de l'objet, suivie de la transformée de Fourier inverse du cliché de diffraction. L'enregistrement des images à faible dose d'électrons se déroule en plusieurs étapes : tout d'abord il consiste à rechercher à faible grossissement (3500x) des zones recouvertes de protéines en se déplaçant sur la grille, puis à plus fort grossissement, nous regardons s'il y a ordre ou pas. Pour enregistrer des images, sur une zone proche à photographier, il faut réaliser la mise au point, corriger l'astigmatisme et introduire une valeur précise de sous-focalisation. La prise de vue est ensuite réalisée avec une dose d'électrons permettant de photographier une même région avec des défocalisations différentes. Il faut ajouter à ceci que la qualité des prises de vue dépend de facteurs physiques comme la dérive du porte-objet, la planéité de la grille...

d) Analyse des images

Les clichés enregistrés sont sélectionnés grâce à un diffractomètre optique selon la qualité des données de diffraction, par exemple l'absence d'astigmatisme avant d'être digitalisés pour l'analyse. Elle a pour but le calcul de cartes de projection de l'objet étudié. Les images sont d'abord indexées une par une et les paramètres de maille sont alors déterminés. Afin de diminuer le bruit des images, elles sont filtrées : d'après les paramètres de maille, les positions théoriques des taches de diffraction sont calculées et elles sont entourées par des boîtes. Seules les taches situées au centre seront conservées. Plusieurs corrections sont ensuite apportées au niveau du réseau cristallin, de l'astigmatisme et de la fonction de transfert de contraste (fonction mathématique de modélisation des effets du microscope sur le contraste d'image : aberration de sphéricité de la lentille objectif, la longueur d'onde et défocalisation). Ce processus est réalisé sur chaque image. Pour obtenir un jeu de données complet, plusieurs images sont additionnées telles que les phases des réflexions aient la même origine. Nous pouvons ainsi calculer les cartes de projection. La reconstruction d'un objet

tridimensionnel repose sur le théorème de la section centrale : la transformée de Fourier de la projection 2D d'un objet 3D est une section centrale de la transformée de Fourier de cet objet. La reconstruction se fait à partir de cartes de projections 2D. La transformée de Fourier de chacune des projections représente différentes sections centrales de celle de l'objet. L'origine et l'orientation des images sont déterminées puis les transformées de Fourier des différentes cartes de projection sont combinées. En pratique, il faut incliner la grille à l'intérieur du microscope afin de voir l'objet sous différents angles. Une transformée de Fourier inverse va permettre de remonter à la structure 3D. La qualité de cette reconstruction dépend de la qualité des images utilisées, de leur nombre et de la diversité des orientations.

2. Les avantages de la microscopie électronique

Face à l'impossibilité de cristalliser en 3D une protéine, l'approche 2D et la microscopie électronique peut se révéler être une alternative intéressante. En effet, elle requiert de faibles quantités de protéines : une quantité de l'ordre de 1 μg est suffisante par essai. La qualité de l'échantillon ne doit pas être aussi drastique que pour la cristallisation 3D, puisque que le processus de cristallisation est basé sur des interactions spécifiques lipides protéines. La première étape limitante à l'approche 3D est l'obtention d'une solution de protéine pure en quantité suffisante. De plus, la présence de zones fortement hydrophobes en surface peut être la cause d'une solubilisation faible de la protéine. Ainsi, les quantités de protéines homogènes obtenues seront trop peu importantes pour pouvoir utiliser l'approche 3D. Les cristaux 2D poussent dans une large gamme de conditions de solutions incluant le pH et la force ionique. Ainsi, une grande variété de conditions en sels et en tampons peut être explorée facilement. En effet, il est possible de visualiser les monocouches de façon directe par la microscopie à angle de Brewster ou la microscopie optique et nous avons rapidement des informations concernant l'adsorption des protéines aux lipides, et la formation de cristaux grâce au microscope à angle de Brewster. Ainsi, une large distribution de conditions peut être testée et analysée rapidement.

Un des avantages non négligeables par rapport à la cristallographie de RX est le fait que nous observons l'objet directement : il n'y a donc pas de problème de détermination des phases associées aux rayons diffractés comme c'est le cas dans une expérience de diffraction

de rayons X. En effet, le module des facteurs de structure est contenu dans l'intensité des phases diffusées et l'information de phase dans l'image réelle donnée par l'objectif. Contrairement à l'approche 3D, les résolutions obtenues sont le plus souvent de 8Å. Ces résolutions ne peuvent être atteintes qu'en cryo-microscopie. Cette dernière en protégeant l'échantillon contre les effets du rayonnement va permettre de d'enregistrer plus de données et donc de pouvoir aller plus loin en résolution. Une limite importante de cette approche est que l'obtention des informations structurales nécessite l'utilisation d'un microscope électronique à transmission et par conséquent le transfert des monocouches sur des grilles. Ceci peut conduire à la détérioration des empilements cristallins et donc à une perte d'informations. Le cristal 2D expose une face permettant l'interaction avec d'autres protéines facilitant ainsi l'analyse de complexes multiprotéiques de taille importante et donc difficilement cristallisable en 3D. Après l'adsorption d'une première protéine sur la monocouche de lipides, un partenaire peut venir interagir avec elle sur la monocouche. Il est également possible de former le complexe en solution avant l'adsorption aux lipides.

Prenons par exemple le cas de la DNA Gyrase B d'*Escherichia coli* cristallisée sur une couche de phospholipides dérivés par la novobiocine [Célia et al, 1994]. Au cours de cette étude, les auteurs ont montré que par la technique de la coloration négative, il était possible d'obtenir une enveloppe de la molécule à une résolution de 25 à 30 Å. L'obtention de cette enveloppe a nécessité l'enregistrement des données à partir de plusieurs grilles. Ceci doit laisser supposer que les monocouches et les grilles sont identiques mais la difficulté à remplir cette condition explique cette basse résolution. Ce modèle permet de constater que la DNA Gyrase B a une structure en V, mais nous ne disposons que d'une information sur la projection de la structure de la protéine. L'utilisation de la cryo-microscopie a donné accès à une résolution supérieure de l'ordre de 8 Å, et donc à des informations structurales supplémentaires. En effet, la projection montre un gradient de densité de protéine le long de l'axe principal du monomère. Il est ainsi possible de délimiter les différents domaines de la protéine. Cela a permis de replacer à l'intérieur de cette enveloppe la structure résolue par cristallographie de rayons X de l'un de ces domaines. De plus, cette technique, dans les cas très favorables, peut permettre d'obtenir des structures à des résolutions proches de la résolution atomique. En effet, à partir des cristaux 2D de streptavidine, des clichés de diffraction ont été obtenus jusqu'à une résolution de 3Å [Avila-Sakar et al, 1996] en cryo-microscopie électronique. La comparaison au modèle obtenu par rayons X a montré la concordance entre les deux cartes. La résolution a pu être étendue à 2.5 Å par affinement du modèle atomique contre les amplitudes de diffraction de microscopie électronique. Cet

exemple est le seul cas d'obtention d'une carte à cette résolution en microscopie électronique. D'autres exemples, notamment l'étude concernant la toxine du choléra [Mosser et al, 1992], ont montré que l'on pouvait observer des pics de diffraction jusqu'à environ 4Å. Mais, la carte de projection obtenue après le traitement des données ne va qu'à une résolution de 9Å (résolution maximale pour laquelle les pics dans les transformées de Fourier des images sont visibles).

A partir de cristaux 2D et de la microscopie électronique, il est de plus en plus fréquent d'obtenir des informations structurales jusqu'à 8 Å de résolution cela permet d'avoir une enveloppe de la molécule et dans certains cas de pouvoir positionner les hélices α . Cependant, certains cristaux 2D sont très bien orientés et peuvent diffracter jusqu'à 3 Å. Dans tous les cas, cela nécessite l'utilisation de la cryo-microscopie. Cependant, la coloration négative est nécessaire dans un premier pour déterminer les conditions de cristallisation puisqu'elle est beaucoup plus simple à mettre en place. S'il existe des données structurales à haute résolution sur des domaines de la protéine étudiée déterminées auparavant par cristallographie des rayons X, par exemple, il est alors possible de les replacer dans l'enveloppe. Ceci permet donc, d'avoir un modèle structural pseudo-atomique de la protéine entière.

3.Stratégie pour l'étude des facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase

Les avantages de la microscopie électronique nous ont conduit à choisir, dans un premier temps, cette approche pour l'étude des facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase. En effet, du fait de la difficulté rencontrée pour obtenir ces protéines en quantité et qualité suffisantes pour la cristallographie RX et les conditions requises pour la microscopie électronique, il nous a donc semblé possible d'obtenir des informations structurales intéressantes concernant ces protéines. De plus, pour les trois facteurs cytosoliques, la structure atomique de différents domaines a été résolue, on peut donc espérer dans le cas d'obtention de données à une résolution suffisante pouvoir les replacer dans la molécule.

4. Les conditions expérimentales.

a) Les protéines étudiées.

Mis à part les deux facteurs cytosoliques p47 et p40, une protéine de fusion entre p67 et p47 a été mise à notre disposition pour cette étude [Ebisu et al, 2001] (Figure 83). Cette protéine de fusion comprend les domaines TPR et d'activation de la partie N-terminale de p67 soit les résidus 1 à 210 et la partie N-terminale des résidus 1 à 286 de p47. Elle sera désormais appelée chimère Tamura. Elle a la propriété d'être plus stable que les protéines isolées. Le clone nous a été fourni par M. Tamura de l'Université de Tokyo et la protéine a été purifiée par M.C. Dagher (BBSI-UMR 5092 /DRDC/CEA Grenoble).

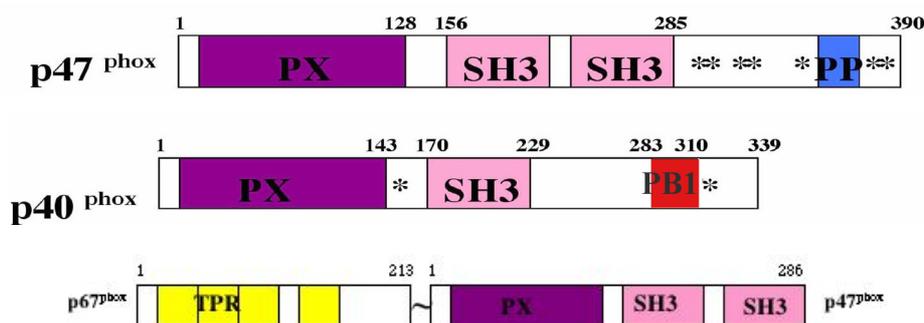


Figure 83: Représentation schématique des facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase et de la protéine de fusion p67-p47 ou chimère Tamura utilisés pour la cristallisation 2D sur monocouche de lipides à l'interface air/eau. Différentes constructions issues de ces protéines ont également été testées. ~ représente la séquence de liaison entre les deux protéines p67 (1-213) et p47 (1-286). La séquence entre les deux protéines est Ser-Glu-Phe.

Le Tableau 12 représente les différentes constructions étudiées en microscopie électronique. Leur production et leur caractérisation ont été décrites au chapitre 2.

construction	Séquence polyhistidine			Dénomination
	N-terminale	C-terminale	sans	
p40 (1-339)			+	p40 (a)
p40 (231-339)	+		+	p40Cter N-His (b) p40Cter (c)
p47 (1-390)	+	+	+	p47 (d) p47 N-His (e) p47 C-His (f)
p47 (156-390)	+	+		p47 Cter N-His (g) p47 Cter C-His (h)
p67 (1-213)	+		+	p67TPR (i) p67TPR N-His (j)
p67 (1-232)	+		+	p67 Nter (k) p67 Nter N-His (l)
p67 (1-210) ~ p47 (1-286)			+	Chimère Tamura (m)

Tableau 12 : Différentes constructions des facteurs cytosoliques étudiées en microscopie électronique. Les lettres entre parenthèses serviront à nommer les protéines dans la suite du chapitre.

b) Les conditions testées

Une condition standard d'obtention d'assemblages organisés en réseau bidimensionnel a été décrite par Kubalek [Kubalek et al, 1994]. Il s'agit d'une monocouche lipidique constituée d'un mélange d'un lipide ligand chargé en Nickel, le Ni-NTA DOGA, et d'un lipide diluant DOPC avec un ratio d'un lipide ligand pour trois lipides diluants. Dans la littérature, des conditions différentes ont été décrites pour d'autres protéines, ce qui laisse supposer une influence des paramètres sur l'obtention de cristaux. Au cours de sa thèse, S. Courty a étudié l'influence de la dilution et de la fluidité des lipides [Courty, 2001]. L'étude a été réalisée avec la protéine Hup R qui est une protéine de régulation de la transcription chez *Rhodobacter capsulatus*. En effet, il a caractérisé des monocouches lipides/protéines par mesure du module de cisaillement (évaluation de la rigidité de la surface) et par microscopie électronique en fonction du rapport lipides ligands sur lipides diluants et du type de lipides ligands. De cette façon, il a mis en évidence le rôle important que jouent les lipides diluants puisqu'en leur absence, il n'observe aucune formation de domaines cristallins. Ceci peut être expliqué par une densité trop importante de protéines à l'interface et par une diminution de

leur degré de liberté empêchant leur auto-organisation. A l'autre extrême, c'est-à-dire avec une trop forte proportion de lipides diluants, la densité de protéines est trop faible pour permettre les interactions protéine-protéine nécessaires à la cristallisation. De plus, il a montré la formation de domaines parfaitement ordonnés pour des rapports 1/1 et 1/3, mais avec une cinétique de formation des arrangements plus rapides pour le rapport 1/1 que pour le rapport 1/3. Dans plusieurs articles [Blokzijl et al, 1993], [Lebeau et al, 1999], [Nuss et al, 1999], il a été montré la présence de ramifications ou l'insertion d'insaturations au niveau des chaînes aliphatiques des lipides ligands pouvait augmenter la diffusion de ce lipide au sein de la monocouche. L'étude de S. Courty sur l'influence de la composition en lipides a permis de mettre en évidence que la présence de chaînes branchées sur les lipides ligands leur conférait une mobilité accrue et de ce fait favorisait les interactions conduisant à la formation de cristaux. En général, des cristaux 2D sont obtenus pour des rapports lipides ligands sur lipides diluants compris entre 1/3 et 1/16.

La plupart des expériences de cristallisation 2D rapportées utilisent des lipides chargés en ions Nickel. Dans celles-ci, les différences de cinétique d'adsorption des protéines aux lipides observées peuvent être expliquées par l'accessibilité de la séquence polyhistidine. Ces éléments impliquent donc la nécessité de tester différents temps d'incubation et de position de la séquence polyhistidine sur les protéines. La concentration en protéines est aussi un facteur agissant sur la cristallisation puisqu'il a été décrit que pour des concentrations en protéines inférieures à 100 nM (soit 10 µg/mL pour une protéine de 100 000 g/mol) il n'y a pas d'interactions observées entre les lipides nickels et la séquence polyhistidine des protéines [Levy et al, 2001]. Cette donnée est en accord avec les constantes de dissociation mesurées sur des surfaces immobilisées Ni²⁺-NTA qui sont de l'ordre de 100 nM [Kroger et al, 1999]. En vue de l'obtention de cristaux 2D, il est donc important de tester différentes conditions et constructions de protéines (position de la séquence polyhistidines soit en N-terminale (N-His) soit en C-terminale (C-His) ou en son absence). En restant proche du ratio optimum de lipides décrit plus haut [Kornberg et al, 1991], nous avons testés différents types de lipides à différents ratios ainsi que des temps d'incubation différents. Nous avons également joué sur la composition du tampon de cristallisation de la protéine avec différents sels et pH. Les conditions sont résumées dans le Tableau 13. Par contre, une seule température a été testée puisque toutes les incubations ont été faites 20°C. Plus généralement, lors des premières expériences de cristallisation décrite par Uzgiris [Uzgiris et al, 1983], il a déjà montré l'influence de la concentration en protéines et du temps d'incubation : pour une forte

concentration d'anticorps et une durée d'incubation de 1 à 3 heures, des arrangements linéaires sont observés ; alors que si la solution est plus diluée et le temps d'incubation augmenté à 8 à 18 heures, les arrangements sont linéaires ou hexagonaux. Ces derniers semblent alors présenter un degré d'organisation plus élevé que les arrangements linéaires et pourraient donc être cristallins. Dans notre cas, les monocouches sont formées dans des puits de 50 μL où est ajouté 0.5 μL d'un mélange de lipides dilués dans un mélange chloroforme-méthanol 9 :1 (v : v) à 0,5 mg/mL. La goutte est incubée pendant environ trente minutes afin de permettre l'évaporation du chloroforme et la stabilisation de la monocouche. La protéine est ensuite ajoutée en sous-phase. Les gouttes incubent pendant des temps variables de 4 heures à plusieurs jours sous une légère agitation.

c) Observation des gouttes

Les gouttes de cristallisation peuvent être observées directement par microscopie optique ou indirectement par microscopie à transmission. En effet, quand nous déposons les lipides seuls à la surface de l'eau, ils forment des vésicules qui sont très mobiles. L'adsorption des protéines sur les lipides se traduit par une immobilisation de ces vésicules donc une rigidification de la monocouche. Nous avons donc, ainsi, une idée du temps nécessaire aux protéines pour venir interagir avec les lipides, et pour former une couche dense et rigide. Cette technique d'observation ne permet pas de déterminer la présence ou non de cristaux, pour cela, nous utilisons une méthode indirecte, la microscopie à transmission puisqu'elle nécessite le transfert des monocouches sur des grilles. Elle ne permet pas seulement de voir des cristaux mais c'est elle que nous allons utiliser pour enregistrer des données de diffraction si cristal il y a. En fin d'incubation, la monocouche lipides-protéines est transférée sur des grilles de microscopie électronique selon la méthode de Langmuir-Schaefer décrite précédemment. Les grilles colorées à l'acétate d'uranyle 1% sont observées au microscope électronique à transmission de type CM12, Philips (Figure 84).



Figure 84 : Microscope électronique à transmission CM12, Philips utilisé pour l'observation des grilles. La source d'électrons est une cathode en hexaborure de lanthane (LaB₆). La tension de travail est 120 kV.

5.Résultats

Les différentes constructions présentées dans le Tableau 12 ont été testées dans plusieurs conditions de cristallisation. Toutes les monocouches ont été observées au microscope optique dans un premier temps. Cette observation montre, qu'en général, la monocouche est rigide au bout de trente minutes à une heure, ce qui permet de vérifier l'interaction des protéines aux lipides. Au cours des analyses par microscopie électronique, nous avons observé des structures organisées sur les monocouches formées en présence de sels. Afin de vérifier si ces structures étaient des protéines organisées, des incubations dans des conditions similaires mais sans protéines ont mis en évidence le même type de structure. Il ne s'agissait donc pas de cristaux de protéines. Ainsi, au cours de nos essais de cristallisation, nous avons pu observer que les sels pouvaient entraîner les lipides à former des liposomes qui sont des assemblages ressemblants à des plaques de protéines. Pour toutes les autres protéines et conditions, les monocouches formées sont homogènes et nous pouvons noter l'absence d'agrégats contrairement aux premiers essais.

a) p67Nter et p67TPR

Les résultats sont présentés au Tableau 13. On observe une bonne fixation des protéines aux lipides, la couche commence à se rigidifier en moyenne en une heure sauf pour p67TPR (i) où aucune rigidification n'est observée en présence des lipides DOTAP : il n'y a pas de fixation des p67TPR aux DOTAP, ce qui est confirmé par l'observation des grilles au

microscope électronique. Il y a des plaques recouvrant la surface mais pas d'ordre. Les plaques ne sont pas dues à la présence de sels ($MgCl_2$, $CaCl_2$,...) puisqu'elles se retrouvent en leur absence. Mais leur présence semble ralentir la fixation des protéines aux lipides, la rigidification de la monocouche est moins rapide.

lipides	Ratio	Sels				
		0	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$ZnCl_2$	NaCl
Ni-DOGS/DOPC	1 :1	j,l	j,l	j,l	j,l	j,l
	1 :3					
	1 :4		j,l	j,l		j,l
Ni-DOGS/coli	1 :1	j,l	j,l	j,l	j,l	
	1 :4					
Ni-DOGS/DOPS	1 :3	l	l	l		
Ni-DOGS/DOTAP	1 :3	l	l			
Ni-DOGS/DOPE	1 :3	l	l			
DOTAP			j,l	j,l		j,l
DOPG						

Tableau 13 : Récapitulatif des essais de cristallisation 2D pour p67 TPR N-His (j) et p67 Nter N-His (l).

b) p47

Lors des premiers essais, p47 N-His semblait être la protéine qui avait tendance à mieux former des monocouches organisées. Dans le cas de p47 (Tableau 14), les sels n'agissent pas seulement sur la vitesse d'interaction entre les lipides et les protéines mais aussi sur la qualité des empilements observés. Les monocouches sont beaucoup plus homogènes en présence de $MgCl_2$ qu'en présence de $CaCl_2$ (Figure 85).

Lipides	Ratio	Sels				
			MgCl ₂	CaCl ₂	ZnCl ₂	NaCl
Ni-DOGS/DOPC	1 :1	e	e	e	e	
	1 :3	e,f	e,f	e,f		
	1 :4					
Ni-DOGS/DOPS	1 :3	e	e			
Ni-DOGS/DOTAP	1 :3	e	e			
Ni-DOGS/DOPE	1 :3	e	e			
DOTAP		d	d	d		

Tableau 14 : Récapitulatif des essais de cristallisation 2D pour p47 (d), p47 N-His(e) et p47 C-His (f)

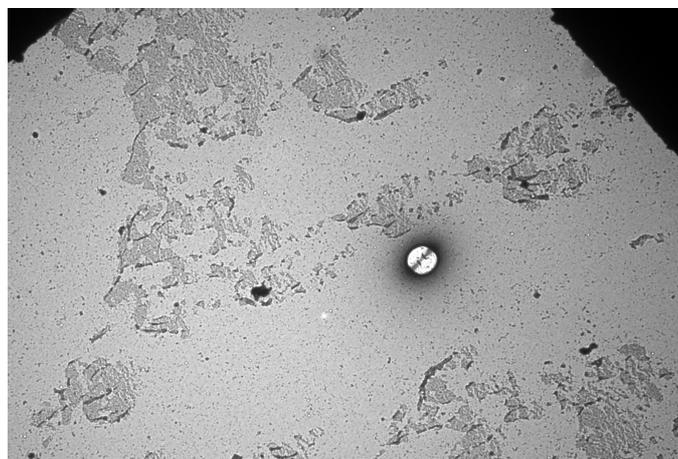


Figure 85 : Cliché de microscopie électronique d'une monocouche de p47 N-His fixée sur des lipides Ni-DOGS/DOPC (1/3) en présence de 20 mM de MgCl₂. Le grossissement est de 1560 x.

c) p47Cter

Des plaques sont observées mais sans organisation des protéines entre elles (Tableau 15). Des tests aux pH 6.7 et 8.7 et le passage d'une concentration en protéine de 0.5 à 1 mg/mL ne permettent que la formation d'agrégats. Face à ce constat, la seconde forme n'a pas été testée.

Lipides	Ratio	Sels				
			MgCl ₂	CaCl ₂	ZnCl ₂	NaCl
Ni-DOGS/DOPC	1 :1	g	g	g		
	1 :3					
	1 :4					

Tableau 15 : Récapitulatif des essais de cristallisation 2D pour p47 Cter N-His (g)

d) p40Cter

lipides	Ratio	Sels				
			MgCl ₂	CaCl ₂	ZnCl ₂	NaCl
Ni-DOGS/DOPC	1 :1	b	b	b		b
	1 :3					
	1 :4		b	b		b
DOTAP			b	b		b
DOPG						

Tableau 16 : récapitulatif des essais de cristallisation 2D pour p40 Cter N-His (b)

Pour p40Cter (Tableau 16), il y a existence de plaques et d'empilements notamment en présence de 20mM CaCl₂ et des lipides Ni-DOGS/DOPS à un rapport 1 :1. Ces empilements semblant prometteurs des essais à plus fortes concentrations en CaCl₂ et avec un ratio en lipides de 1 :4 ont été réalisés. Ils n'ont pas permis de favoriser la formation de réseaux cristallins. Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés à une concentration de 0.5 mg/mL, et, afin d'essayer de favoriser les contacts intermoléculaires, nous avons augmenté la concentration à 1 mg/mL. Le passage d'une concentration en protéines de 0.1 à 0.5 mg/mL voir 1 mg/mL pour p40 Cter ne semble pas favoriser dans notre cas les interactions protéine-protéine.

d) p40 et chimère Tamura

lipides	Ratio	Sels				
			MgCl ₂	CaCl ₂	ZnCl ₂	NaCl
DOTAP		a,m	a,m	a,m		

Tableau 17 : Récapitulatif des essais testés pour p40 (a) et la chimère Tamura (m)

Les essais réalisés sur ces deux protéines montrent leur capacité à interagir avec des lipides chargés (Tableau 17). La surface est recouverte de façon homogène, mais sans organisation apparente (Figure 86). La présence de sels ou la durée d'incubation de quelques heures à plusieurs jours ne semblent jouer aucun rôle puisque la variation de ces deux paramètres ne modifie pas le comportement de la monocouche.

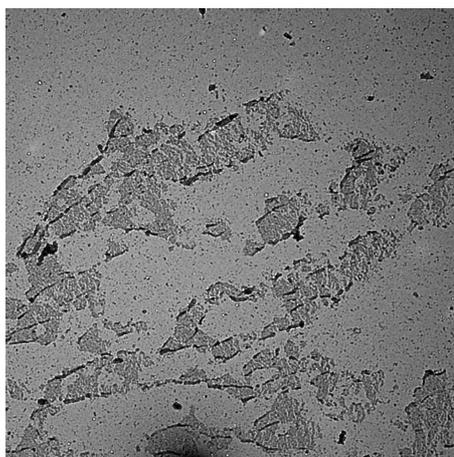


Figure 86 : Cliché de microscopie électronique d'une monocouche de p40 fixée sur des lipides DOTAP. Le grossissement est de 2600 x.

Pour tous les facteurs cytosoliques étudiés, la microscopie électronique nous montre un fond recouvert de protéines mais pas d'arrangements cristallins. Les monocouches sont homogènes après quatre heures d'incubation et aucune évolution n'est observée si les couches sont incubées plus longtemps par exemple jusqu'à 72 heures. Dans beaucoup de monocouches observées au microscope électronique, des objets sont visibles mais ce sont des liposomes ce qui est confirmé par l'incubation des lipides seuls en présence des différents tampons. En général, ce qui est observé c'est une fixation rapide des protéines sur les lipides mais que cette

vitesse est ralentie par la présence d'ions tels que le calcium ou le magnésium. Enfin, les monocouches formées sont homogènes mais il n'y a aucun signe d'organisation.

6. Vers la cristallisation des complexes

Les protéines seules ne présentant aucune tendance à cristalliser, des essais de cristallisation des protéines en complexe ont été réalisés. Les différents complexes testés en cristallisation 2D sont présentés dans le Tableau 18. Il est précisé la masse molaire théorique des complexes formés ainsi que le rapport stoechiométrique entre les différents constituants.

Complexes	masses molaires (g/mol)	rapport
P47N-His/p40	92897	1 :1
P47C-His/p40	94839	1 :1
P47/p40	90071	1 :1
Chimère Tamura/p40	102883	1 :1

Tableau 18 : Caractéristiques des différents complexes testés en cristallisation 2D

Suivant que les deux protéines possèdent une séquence polyhistidine ou non, des lipides chargés tels que le DOTAP ou des lipides Nickel tels que Ni-DOGS/DOPC 1 :3 sont utilisés. Par ailleurs, l'effet de la présence ou non et de la nature des sels ($MgCl_2$ et $CaCl_2$) est testé au cours de ces essais de cristallisation. Pour les quatre complexes, on observe au microscope photonique une rigidification de la mono couche après environ 6 heures d'incubation. Les grilles prélevées, colorées à l'acétate d'uranyl 1% et observées au microscope électronique à transmission ne montrent pas d'organisation au sein de la monocouche.

7. Conclusions et perspectives

Au cours des différents essais de cristallisation des facteurs cytosoliques à l'interface réalisés, nous n'avons pu observer aucune organisation 2D des protéines malgré la formation de monocouches homogènes sur toute la surface. Ceci pourrait s'expliquer éventuellement

par une trop grande densité de protéines fixées au lipide. Mais la diminution de la quantité de protéines ne semble pas modifier l'apparence des monocouches. De plus, la quantité de protéines fixées et le réarrangement des molécules dans le plan ne sont pas influencés par la durée d'incubation puisque l'aspect de la monocouche n'est pas modifié au cours du temps. Il pourrait être intéressant d'utiliser la propriété de p47 à interagir avec le phosphatidyl inositol comme cela a été décrit par Kanai [Kanai et al, 2001] et ensuite de d'injecter les deux autres facteurs cytosoliques p40 et p67.

IV. Caractérisation des monocouches

Devant les difficultés rencontrées à cristalliser à 2D les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase, il semblait intéressant de comprendre le processus de fixation des protéines aux lipides. Nous nous sommes donc attachés à caractériser l'adsorption aux lipides de la protéine p47 seule et en complexe avec p67 par ellipsométrie.

1. Introduction

La formation de complexes protéiques sur une monocouche de lipides en vue de la cristallisation bidimensionnelle peut se faire de deux façons. Le complexe peut être préalablement formé en solution avant d'être adsorbé aux lipides ou une protéine du complexe est d'abord adsorbée sur la monocouche, puis les autres partenaires sont ensuite ajoutés. Afin de mettre en évidence des différences d'adsorption d'un complexe sur une monocouche de lipides suivant la méthode utilisée, nous avons analysé par ellipsométrie l'adsorption du complexe p47/p67 sur une monocouche de lipides. Cette approche a été utilisée pour caractériser l'adsorption de deux protéines aux lipides à l'interface air-eau en vue de caractériser la croissance de cristaux 2D [Vénien-Bryan et al, 1998]. La protéine p47 possède une séquence polyhistidine mais pas p67 pour pouvoir adsorber le complexe via une interaction spécifique à des lipides chargés en nickel.

2.Principe général de l'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une méthode optique qui permet de caractériser les surfaces et les interfaces par l'analyse des changements de polarisation de la lumière réfléchi sur une surface. La grandeur suivie expérimentalement est l'état de polarisation de la lumière avant et après la réflexion sur l'interface à étudier. En effet, la lumière peut être caractérisée par deux directions de polarisation : parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence auxquelles correspondent deux coefficients complexes de réflexion r_p et r_s . Pour les deux composantes du champ électrique E_p et E_s , les coefficients de réflexion dépendent de l'angle d'incidence θ du faisceau lumineux avec la normale à la surface. Le rapport des coefficients r_p et r_s définit une quantité complexe : l'ellipticité, ρ , donnée par l'équation suivante : $\rho = \frac{r_p(\theta)}{r_s(\theta)} = \tan \psi e^{i\Delta}$.

L'angle Δ est défini comme étant le déphasage induit par la réflexion entre les composantes p et s. L'angle ψ déterminé à partir de $\tan \psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}$ représente le taux de réflexion de la

composante p par rapport à la composante s. Par conséquent, l'ellipticité décrit la façon dont est transformée la polarisation d'une onde après réflexion sur une surface et ceci en amplitude et en déphasage. Si l'onde est réfléchi sur une interface dite idéale entre deux milieux homogènes et isotropes d'indice n_1 et n_2 , alors la composante r_p s'annule pour une incidence égale à l'angle de Brewster, θ_B . Pour cet angle d'incidence, ψ s'annule et Δ passe brusquement de 180° à 0° . L'angle θ_B est défini par $\tan(\theta_B) = n_2/n_1$. Dans le cas d'une couche mince sur un substrat, une réflexion résiduelle de la composante p à l'angle de Brewster est observée. Les variations de ψ et Δ en fonction de θ sont alors modifiées : ψ ne s'annule plus complètement à l'angle de Brewster et le déphasage Δ ne passe plus abruptement de π à 0 lorsque l'angle d'incidence augmente. Ces variations sont dépendantes de l'épaisseur de la couche et de son indice. Sur la Figure 87 et la Figure 88 sont représentées respectivement les variations des angles ψ et Δ en fonction de l'épaisseur de la surface et de l'indice n.

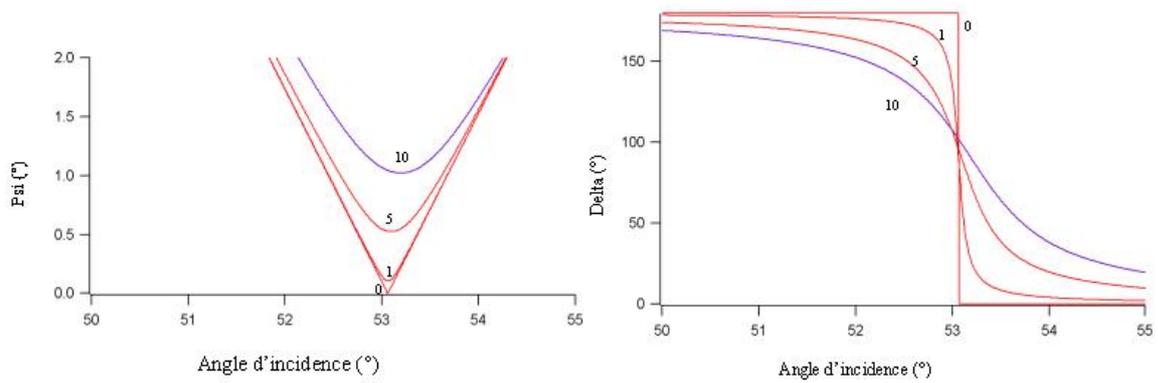


Figure 87 : Variation des angles ellipsométriques psi (ψ) et delta (Δ) en fonction d'une couche mince (indice moyen de $n=1.42$) posée sur l'eau ($n=1.33$). Différentes épaisseurs de couches sont représentées : 0 (courbe modèle), 1, 5 et 10 nm à une longueur d'onde de 459 nm.

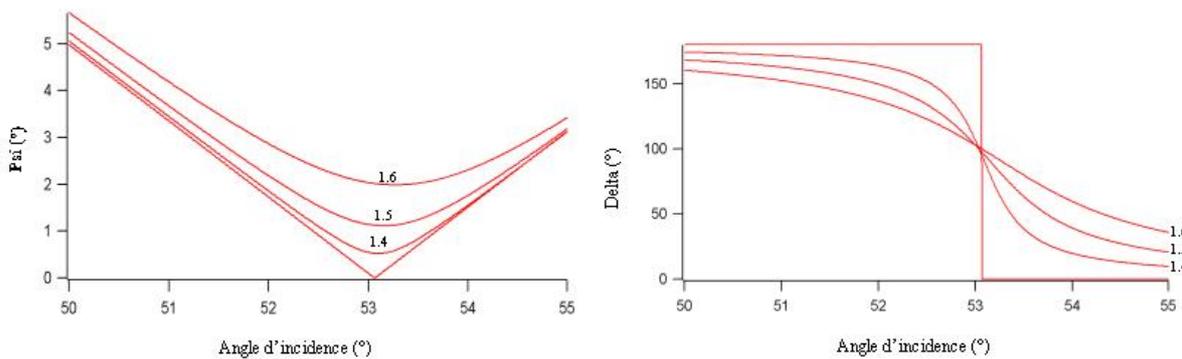


Figure 88 : Variations des angles ellipsométriques psi et delta en fonction de l'angle d'incidence sur une couche de 5 nm sur l'eau ($n=1.33$) pour des milieux d'indice différents 1.4, 1.5, 1.6.

Comme le montre la Figure 87, l'augmentation de l'épaisseur de la couche entraîne une augmentation de l'angle psi au minimum ainsi que le déplacement de l'angle de Brewster vers les grands angles. L'angle psi est peu sensible aux petites variations d'épaisseur alors que delta l'est davantage. La variation de l'indice de la couche mince (Figure 88) entraîne également une hausse du minimum à l'angle de Brewster, par contre son déplacement vers les grands angles est beaucoup moins sensible. Le décalage observé n'apparaît en effet que pour des indices supérieurs à ceux de notre système lipides-protéines d'environ $n=1.42$.

3. Montage expérimental

L'ellipsomètre utilisé est un ellipsomètre spectroscopique à modulation de phase UVISEL de Jobin-Yvon (Instruments SA) (Figure 89). Le procédé utilisé est celui décrit par L. Martel au cours de sa thèse [Martel, 2002]. Dans une cuve en Téflon de volume environ 3mL, la monocouche est formée selon le principe décrit plus haut. Le rayonnement incident est produit par une lampe à arc Xénon et analysé à une longueur d'onde de 459 nm soit 2.7 eV. Avant d'être réfléchi sur la surface, un polariseur polarise la lumière linéairement à 45° par rapport au modulateur. Le modulateur dépolarise ensuite légèrement l'onde en ajoutant une composante perpendiculaire. Par conséquent, la polarisation de l'onde incidente sur l'échantillon varie de linéaire à elliptique à la fréquence du modulateur. Après réflexion sur la surface, l'onde change de polarisation puisque les deux composantes p et s ne sont pas réfléchies de la même manière par l'échantillon. Le faisceau passe par un deuxième polariseur, l'analyseur, croisé avec le premier avant de passer par un monochromateur qui permet de sélectionner la longueur d'onde voulue.

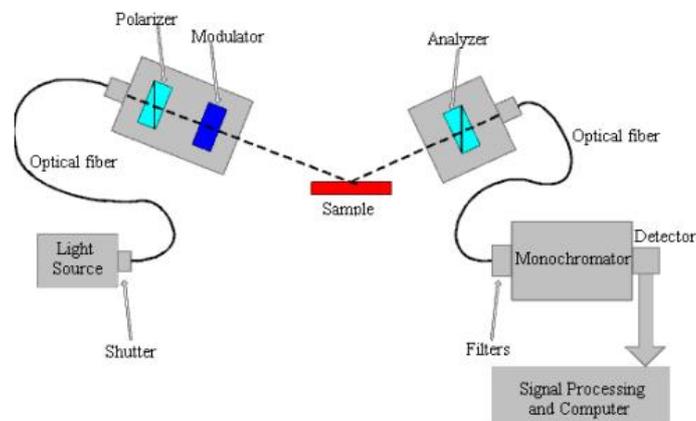


Figure 89 : Représentation schématique de l'ellipsomètre utilisé pour nos expériences.

La mesure de l'intensité à la fréquence de modulation ω et à la fréquence double 2ω permet le calcul des angles ψ et Δ . L'ellipsomètre est monté sur un goniomètre ce qui permet de faire varier l'angle d'incidence θ du faisceau. L'enregistrement des courbes $\psi(\theta)$ et $\Delta(\theta)$ va permettre la modélisation de l'épaisseur de la monocouche pour un n donné ou la modélisation de n pour une épaisseur donnée. De plus, la mesure à angle fixe ($\theta = \theta_B - 1^\circ$) de l'angle Δ permet de suivre la cinétique d'adsorption. Cependant, il faut tenir compte du fait

que pour des épaisseurs importantes supérieures à 2nm, la variation de l'angle Δ n'est plus tout à fait linéaire avec l'épaisseur de la couche [Martel, 2002].

4. Les conditions testées

La caractérisation des monocouches a été principalement axée sur l'étude du complexe p47-p67. Pour se faire, nous avons utilisé les concentrations en lipides décrites comme optimales pour la cristallisation 2D soit un lipide ligand (Ni-NTA-DOGS) pour trois lipides diluants (DOPC). La monocouche de lipides est formée à la surface de la solution tampon (50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 5% glycérol) dans une cuve en téflon de volume de 3 mL et de diamètre de 30 mm. La monocouche est laissée au repos pendant environ trente minutes avant d'injecter la protéine en sous-phase. Tout au long de l'expérience, nous observons la cinétique d'adsorption ce qui en ellipsométrie correspond à une mesure en fonction du temps de l'angle Δ à un angle d'incidence θ fixé tel que $\theta = \theta_B - 1^\circ$. Pratiquement, l'angle Δ est mesuré pendant trente minutes sur le tampon, après le dépôt des lipides, et celui de la protéine. Entre chaque cinétique, les angles ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence θ sont mesurés afin de mieux caractériser l'évolution de la monocouche. Parmi p47 et p67, seule p47 possède une séquence polyhistidine en position N-terminale permettant son interaction avec le lipide Ni-NTA-DOGS. Elle a été produite à partir de la construction MBP-(His)₆-p47. Nous la nommerons (His)₆-p47. Nous avons donc suivi l'adsorption de p67 seul sur les lipides DOGS/DOPC (1 :3) afin d'estimer l'adsorption non spécifique aux lipides puis celle de p47 seule avant d'injecter p67. Ensuite, nous l'avons comparé à l'adsorption du complexe (1 :1) de p47-p67 formé en solution. Tout au long de ces expériences, la concentration en protéines est de 100 mM.

5. Résultats

L'adsorption non spécifique de p67 à la monocouche formée par un mélange de lipides DOGS/DOPC avec un rapport lipides ligands sur lipides diluants de 1/3 a été mesurée par l'intermédiaire de l'angle ellipsométrique Δ en fonction du temps. L'angle d'incidence $\theta = \theta_B -$

1°, dans l'expérience, est égal à 52°. La cinétique d'adsorption de p67 à la monocouche de lipides est représentée à la Figure 90.

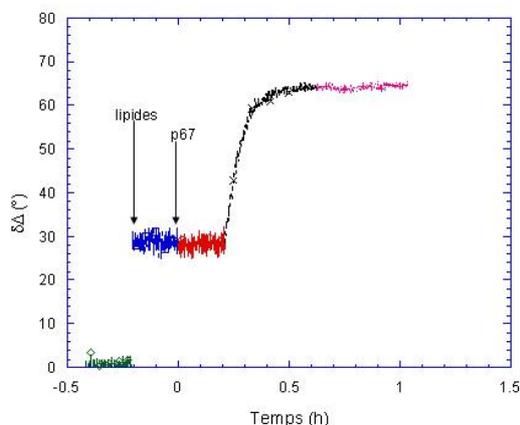


Figure 90 : Cinétique d'adsorption de p67 sur une monocouche de lipides DOGS/DOPC 1 :3. L'angle d'incidence est de 52°. Le temps $t = 0$ correspond à l'injection de la protéine en sous-phase. La valeur $\delta\Delta$ correspond à la variation de l'angle ellipsométrique Δ par rapport à celui mesuré pour le tampon.

Le dépôt des lipides à la surface du tampon entraîne une variation de l'angle Δ ce qui laisse supposer la formation d'une monocouche de lipidique. Suite au dépôt de p67, l'angle Δ augmente de nouveau mais après un temps de latence d'environ 25 minutes. La protéine p67 s'adsorbe donc sous la monocouche de lipides. Cependant, du fait du temps de latence observé, il est probable qu'elle soit non spécifique car p67 ne possède pas de séquence polyhistidine. Le suivi de l'adsorption de p47 N-His à cette même monocouche a été réalisé dans des conditions identiques à celles de p67 (Figure 91).

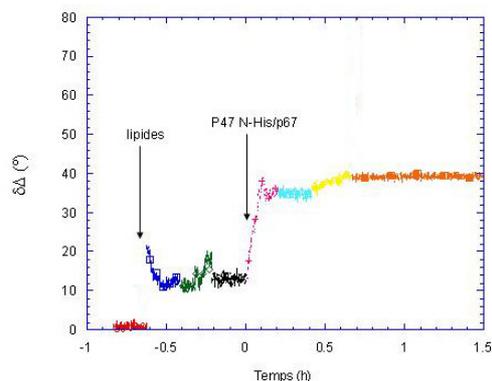


Figure 91 : Cinétique d'adsorption de p47 N-His sur une monocouche de lipides DOGS/DOPC 1 :3. L'angle d'incidence est de 52°. Le temps égal à 0 correspond à l'injection de p47 N-His en sous-phase. La valeur $\delta\Delta$ correspond à la variation de l'angle ellipsométrique Δ par rapport à celui mesuré pour le tampon.

Nous noterons tout d'abord que comme pour p67, la formation de la monocouche lipidique entraîne une augmentation de l'angle Δ . L'adsorption de p47 N-His à la monocouche commence dès l'injection pour se stabiliser après un peu plus de trente minutes, nous sommes à saturation, c'est-à-dire que le maximum de p47 N-His a été adsorbé à la surface. Ceci se traduit sur la courbe par une brusque élévation de l'angle ellipsométrique jusqu'à atteindre un plateau. Contrairement à l'adsorption de p67, celle de p47 N-His est certes plus rapide mais elle est moins importante. Une fois qu'une molécule de p47 N-His est fixée à un lipide ligand, nous pouvons supposer qu'il est difficile pour une deuxième molécule de venir interagir avec un autre lipide ligand proche du premier. Une fois que la saturation de p47 N-His est atteinte, nous injectons p67 en sous-phase. Le profil d'adsorption est présenté à la Figure 92.

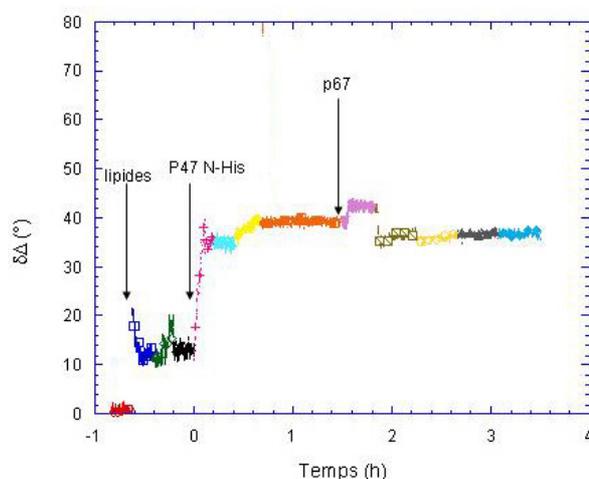


Figure 92 : Cinétique d'adsorption de p47 N-His et de p67 sur une monocouche de DOGS/DOPC 1 :3. L'angle d'incidence est de 52°. Le temps égal à 0 correspond à l'injection de p47 N-His. La valeur $\delta\Delta$ correspond à la normalisation de l'angle ellipsométrique Δ par rapport à celui mesuré pour le tampon.

L'injection de p67 en sous-phase ne provoque qu'une légère variation de delta par rapport à celui observé avec p47 N-His. Il semblerait donc que p67 ne vienne pas interagir avec p47 N-His. Nous pouvons supposer que la zone d'interaction de p47 N-His à p67 est masquée soit par l'interaction entre la séquence polyhistidine et le lipide ligand soit parce que les molécules de p47 forment une monocouche trop dense. La même expérience a été réalisée en formant au préalable le complexe p47 N-His/p67 en solution. L'angle d'incidence est toujours de 52° (Figure 93).

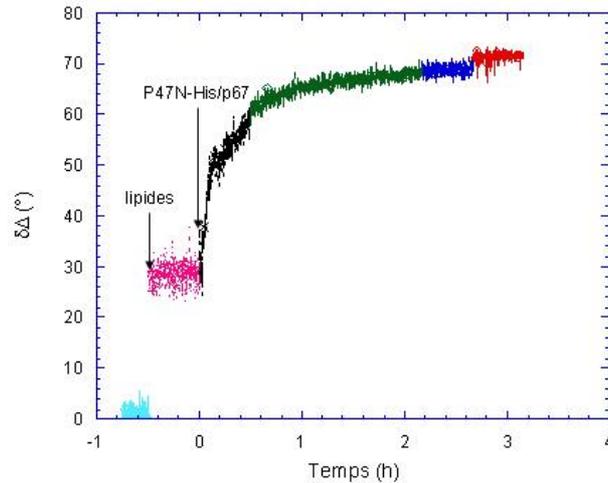


Figure 93 : Cinétique d'adsorption du complexe p47 N-His /p67 formé en solution sur une monocouche de lipides DOGS/DOPC 1 :3. Le temps $t=0$ correspond à l'injection du complexe en sous-phase. La valeur $\delta\Delta$ correspond à la normalisation de l'angle ellipsométrique Δ par rapport à celui mesuré pour le tampon.

L'adsorption du complexe formé en solution commence dès son injection en sous-phase (la variation de l'angle Δ est positive), elle est rapide puisque la saturation est atteinte environ après trente minutes. La cinétique d'adsorption est dans ce cas similaire à celle de p47 N-His (Figure 91) et non à celle de p67 (Figure 90) où nous avons observé un temps de latence entre l'injection et le début de l'adsorption. Par conséquent, nous pouvons supposer que l'adsorption se fait par des interactions spécifiques des lipides ligands avec p47-N-His seul ou encore en complexe avec p67. L'adsorption de p47N-His est plus rapide, donc l'adsorption non spécifique de p67 libre ne peut avoir lieu. La surface des lipides est recouverte de p47 N-His et p67 ne peut donc pas s'adsorber. La variation de l'angle delta dans le cas du complexe formé en solution est d'environ 40° alors que lorsqu'il est formé sur la monocouche, elle est de 20° . Nous n'avons aucun moyen de vérifier ce que nous avons fixé à la surface des lipides, mais s'il s'agit du complexe alors il est donc plus facile de le fixer aux lipides après l'avoir formé en solution que de le former sur la monocouche de lipides en injectant les protéines l'une après l'autre. Le complexe formé en solution a été analysé par chromatographie d'exclusion afin de vérifier que nous sommes bien en présence du complexe (données non montrées ici).

6. Conclusions et perspectives

Au cours de l'analyse de l'adsorption de p47 N-His seule et en complexe avec p67, nous avons pu constater que p47 N-His seul venait rapidement s'adsorber à la monocouche. Ce résultat est en accord avec ceux observés en microscopie électronique où nous avons confirmé la capacité de p47 N-His à former des couches homogènes. De plus, la vitesse d'adsorption est similaire aux observations de microscopie optique sur les « gouttes » de p47. Nous avons également montré au cours de la caractérisation des monocouches lipides-protéines par ellipsométrie que le complexe p47 N-His/p67 ne pouvait pas se former en injectant les protéines les unes après les autres. En effet, il semblerait que la zone d'interaction de p47 pour p67 soit masquée quand p47 forme une monocouche dense. Ce phénomène peut s'expliquer par une densité trop importante de protéines due à une forte densité de lipides ligands à la surface, il serait donc intéressant de tester des rapports lipidiques avec plus de lipides diluants pour un lipide ligand. De plus, nous observons qu'il est possible d'adsorber le complexe formé en solution à une monocouche constituée d'un mélange d'un lipide ligand pour trois lipides diluants. L'ellipsométrie permet donc de confirmer l'adsorption de p47 N-His à une monocouche de lipides via des interactions nickel-histidine. Cependant, dans les conditions testées, l'ellipsométrie montre également que le complexe p47 N-His/p67 n'est adsorbé aux lipides qu'après avoir été préalablement formé en solution.

Dans le cadre de notre étude, l'ellipsométrie est donc une méthode de caractérisation intéressante des monocouches lipides protéines. En effet, elle permet de savoir s'il est possible de former un complexe directement sur la monocouche ou si il faut d'abord le former en solution suivant le rapport lipide ligand sur lipide diluant utilisé.

**Étude des facteurs cytosoliques du
complexe de la NADPH oxydase en
solution**

I.Principe de la diffusion des rayons X par la matière

L'interaction d'un rayonnement avec la matière produit trois phénomènes physiques distincts : l'absorption, l'émission et la diffusion de rayonnement. Nous considérerons dans notre cas uniquement la diffusion élastique des rayons X par la matière : il n'y a pas de transfert d'énergie entre les photons et les électrons. Un échantillon est placé dans un faisceau de rayons X (RX) de longueur d'onde λ . Nous introduisons les vecteurs suivants :

\mathbf{Q}_0 le vecteur d'onde de l'onde plane incidente et $|\mathbf{Q}_0| = \frac{2\pi}{\lambda}$

\mathbf{Q}_1 le vecteur d'onde caractéristique de l'onde diffusée, sa direction indique la direction d'observation et pour une diffusion élastique $|\mathbf{Q}_1| = |\mathbf{Q}_0|$.

\mathbf{Q} le vecteur de diffusion $\mathbf{Q} = \mathbf{Q}_1 - \mathbf{Q}_0$ et son module est $|\mathbf{Q}| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$

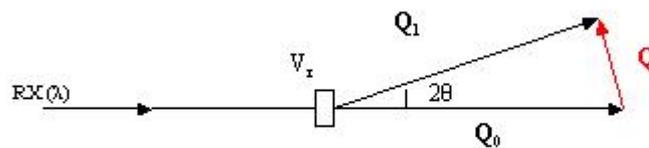


Figure 94 : Représentation de la diffusion par un objet de volume V_r .

L'amplitude de l'onde diffusée par cet objet dans la direction d'observation définie par le vecteur \mathbf{Q} , est nommée $F(\mathbf{Q})$. Elle est donnée par la transformée de Fourier de la densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ de l'objet diffusant :

$$F(\mathbf{Q}) = \int_{V_r} \rho(\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{r} \cdot \mathbf{Q}} d\mathbf{r}$$

La densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ décrit la distribution des électrons en chaque point de l'échantillon. L'intensité diffusée par cet objet sera donnée par la relation suivante :

$$I(\mathbf{Q}) = F(\mathbf{Q}) \cdot F^*(\mathbf{Q}) = \iint \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}') e^{i(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \cdot \mathbf{Q}} d\mathbf{r} d\mathbf{r}'$$

où $F^*(Q)$ est le complexe conjugué de $F(Q)$.

II. Diffusion aux petits angles de protéines en solution

1. Théorie

Dans le cas d'une particule en suspension dans un solvant, la diffusion aux petits angles dépend de la différence entre la densité électronique de la particule $\rho(\mathbf{r})$ et celle du solvant ρ_0 . Cette différence est appelée contraste et est donnée par la relation suivante :

$$\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho_0$$

L'expression de l'amplitude de l'onde diffusée $F(Q)$ par une particule dans un solvant devient :

$$F(\mathbf{Q}) = \int_{V_r} \Delta\rho(\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{r}\cdot\mathbf{Q}} d\mathbf{r}$$

De plus, des particules en suspension dans un solvant sont en perpétuel mouvement. Dans le cas d'une solution isotrope, toutes les orientations sont possibles. Ainsi, l'intensité diffusée par une solution de N particules identiques sans interactions (dite solution idéale) devient une fonction de $Q = |\mathbf{Q}|$ et égale à $I(Q) = N \langle i(Q) \rangle_\Omega$ où $\langle i(Q) \rangle_\Omega$ est la moyenne sphérique de l'intensité $i(Q) = F(Q) \cdot F^*(Q)$ diffusée par une seule particule.

Les solutions de macromolécules sont rarement idéales : des interactions attractives ou répulsives peuvent modifier l'intensité de diffusion $I(Q)_{\text{idéale}}$ donnée ci-dessus. Dans ce cas, l'intensité diffusée par une solution de concentration c est donnée par la relation suivante : $I(Q,c) = I(Q)_{\text{idéale}} \cdot F(Q,c)$ où le terme $F(Q,c)$ est le facteur de structure de la solution. Si les interactions ne sont pas trop importantes, $F(Q,c)$ n'est différent de 1 que dans la région des petits Q . En $Q=0$, on a la relation:

$$F(Q=0, c) = \frac{1}{1 + 2A_2Mc}$$

où A_2 est le second coefficient du Viriel, qui est une grandeur reliée au potentiel d'interaction entre deux protéines. En pratique, on cherche à obtenir l'intensité $I(Q)_{\text{idéale}}$ en extrapolant les données aux petits Q à concentration nulle. La relation utilisée pour l'extrapolation est: $I(Q, c) = I(Q, c=0) / (1 + \alpha(Q)c)$. L'extrapolation permet alors d'obtenir la courbe $I(Q)_{\text{idéale}}$ en fonction de Q , correspondant à une solution de molécules sans interaction.

2. Paramètres structuraux

La diffusion des rayons X par des particules en solution permet d'obtenir des informations structurales à basse résolution. En première analyse, elle permet de déterminer la masse molaire et le rayon de giration des molécules en solution. Une analyse plus détaillée à l'aide d'un modèle peut permettre de calculer une enveloppe de la molécule.

a) La masse molaire

L'intensité $I(0)$ diffusée à $Q=0$, normalisée par la concentration c de la solution est proportionnelle à la masse molaire M de la particule étudiée :

$$I(0)/c = \frac{N_A M}{\mu^2} (1 - \rho_0 \psi)^2$$

N_A est le nombre d'Avogadro, ρ_0 est la densité électronique du solvant et $\psi = \frac{1}{\rho(r)}$ est le volume électronique spécifique moyen. Le paramètre μ est le ratio entre la masse molaire M et le nombre d'électrons m , il dépend donc de la composition chimique de la particule. Pour une protéine, une bonne approximation du ratio $\mu = M/m$ est 1.87 g/mol/e⁻. En pratique, l'expérience est calibrée avec une protéine connue ; dans notre cas, il s'agit du lysozyme. Si nous tenons compte du fait que μ et ψ sont à peu près les mêmes pour toutes les protéines, nous pouvons considérer en première approximation que $k = \frac{N_A}{\mu^2} (1 - \rho_0 \psi)^2$ est une constante

de l'expérience. Nous évaluons k à partir des données sur le lysozyme. Nous pouvons alors déterminer la masse molaire de la protéine étudiée suivant la relation : $I(0) = kcM$.

b) Rayon de giration et relation de Guinier.

Aux très petits angles c'est-à-dire près de l'origine, le développement en série de l'intensité diffusée $I(Q)$ peut être restreinte au terme en Q^2 :

$$I(Q) \cong I(0) \left(1 - \frac{1}{3} R_g^2 Q^2\right)$$

où R_g est le rayon de giration des particules diffusantes, donné par la relation:

$$R_g^2 = \frac{\int_{V_r} r^2 (\rho(\mathbf{r}) - \rho_0) d\mathbf{r}}{\int_{V_r} (\rho(\mathbf{r}) - \rho_0) d\mathbf{r}}$$

L'intensité $I(Q)$ peut aussi être écrite sous la forme d'une gaussienne :

$$I(Q) \cong I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 Q^2\right)$$

La largeur de la gaussienne est proportionnelle à l'inverse du carré du rayon de giration, c'est la relation de Guinier [Guinier, 1955]. En pratique, une représentation linéaire de $\ln I(Q)$ en fonction de Q^2 est utilisée. La pente de la droite obtenue nous donne le rayon de giration. Il s'agit de la représentation de Guinier. Soulignons que l'approximation de Guinier n'est valable que dans un domaine restreint en Q : typiquement, on considère que Q doit être inférieur à $1.3/R_g$. Prenons deux particules de même masse moléculaire mais de forme différente, l'intensité à l'origine $I(0)/c$ sera identique pour les deux molécules mais le rayon de giration pourra être différent. Le rayon de giration nous donne ainsi une première indication de la forme de la molécule.

c) Fonction de distribution des distances $p(r)$.

La fonction $p(r)$ représente l'histogramme de distribution des distances inter atomiques dans la molécule étudiée. Elle est reliée à l'intensité et peut être déduite des données expérimentales par la relation suivante :

$$p(r) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} r \frac{Q}{2\pi} I(Q) \sin rQ dQ$$

La fonction $p(r)$ est égale à zéro pour les distances supérieures à l'extension maximale de la particule D_{\max} .

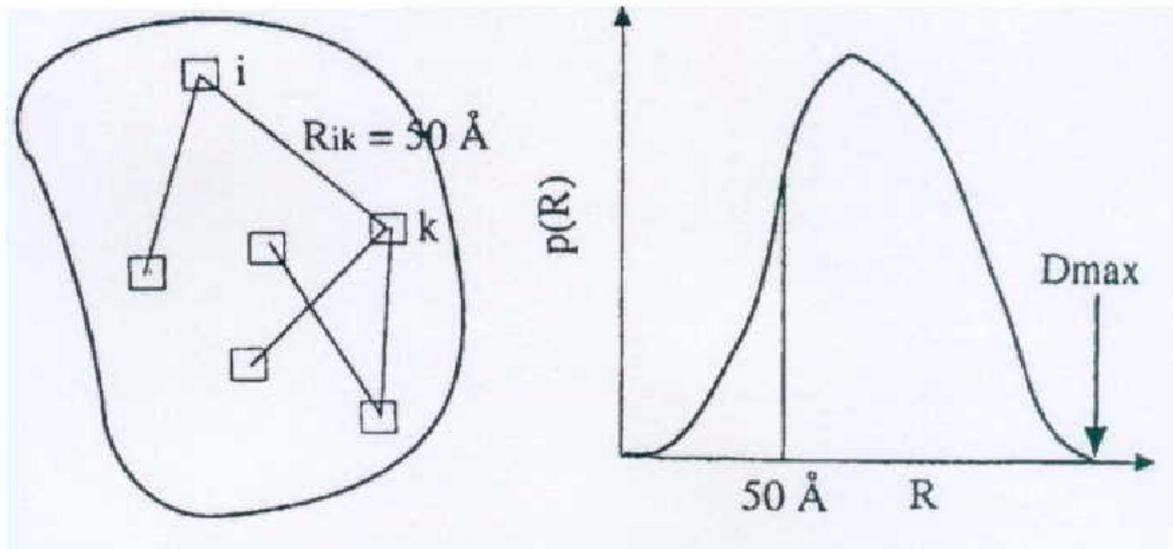


Figure 95 : Représentation de la fonction de distribution des distances $p(r)$.

Pour calculer la fonction $p(r)$ à partir de l'intensité diffusée, mesurée expérimentalement, on peut utiliser différentes méthodes dites de "transformée indirecte". Dans ce travail, nous avons utilisé le programme GNOM développé par D. Svergun [Svergun et al, 1992]. À partir de la fonction de distribution des distances, il est possible d'obtenir le rayon de giration et l'intensité à l'origine par les relations suivantes :

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \quad \text{et} \quad R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} r^2 p(r) dr}{2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr} .$$

La détermination du rayon de giration de la molécule par cette approche possède l'avantage d'être moins sensible que l'approximation de Guinier aux interactions entre les molécules et à la présence d'oligomères en solution. En effet, cette approche ne se limite pas à l'utilisation des données de diffusion aux très petits angles et tient compte de l'ensemble de la courbe de

diffusion. L'allure de la courbe $p(r)$ caractérise la forme de la molécule : la fonction $p(r)$ d'une protéine globulaire sera une courbe en cloche. Plus la molécule sera allongée, plus la courbe sera étendue. La Figure 96 montre l'exemple de la Bruton tyrosine kinase étudiée par diffusion aux petits angles de rayons X [Marquez et al, 2003] et des différents domaines (kinase K, SH3-SH2) qui la composent. Les courbes des domaines kinases et SH3-SH2 sont en forme de cloche spécifique des protéines globulaires. Nous pouvons cependant noter sur la courbe de SH3-SH2 la présence d'une bosse autour de $r = 4$ nm caractéristique de la présence de deux domaines. Les courbes de la construction comprenant les domaines PH-SH3-SH2 et de la protéine entière sont beaucoup plus étendues aux grandes distances. Ceci indique que les protéines ont une forme allongée, les différents domaines formant un collier de perles.

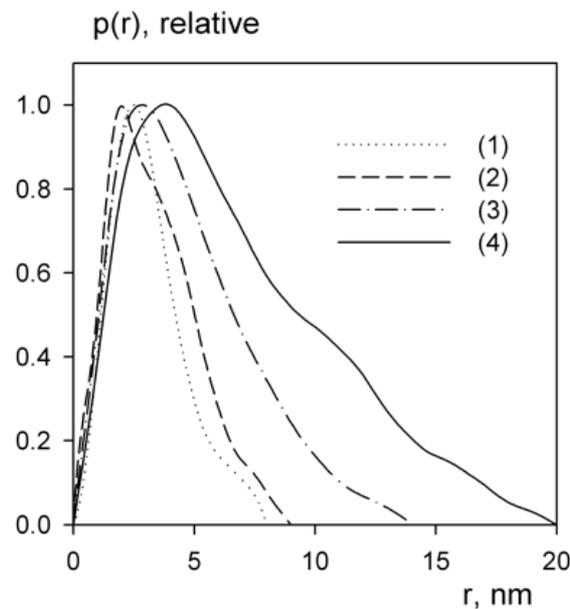


Figure 96 : Fonction de distribution des distances calculée à partir des données de diffusion aux petits angles de différentes constructions de la Bruton tyrosine kinase (Btk), 1 représente le domaine kinase de la Btk, 2 et 3 respectivement les domaines SH3-SH2 et PH-SH3-SH2 et 4 la protéine entière. (d'après Marquez et al, 2003).

d) Représentation de Kratky.

Les expériences de diffusion aux petits angles de rayon X peuvent renseigner sur l'état de compaction de la molécule. La représentation de $Q^2I(Q)$ en fonction de Q donne un aperçu

de ce paramètre, c'est la représentation de Kratky. L'exemple du dépliement de la néocarzinostatine [Perez et al, 2001] en fonction de la température, qui se traduit par une perte de la compacité est donné à la Figure 97. Jusqu'à 61°C, la courbe de la protéine est celle d'une protéine globulaire : c'est une courbe en cloche. Plus la température augmente, plus l'amplitude du pic diminue jusqu'à obtenir un plateau pour $Q > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$, caractéristique d'une protéine complètement dépliée.

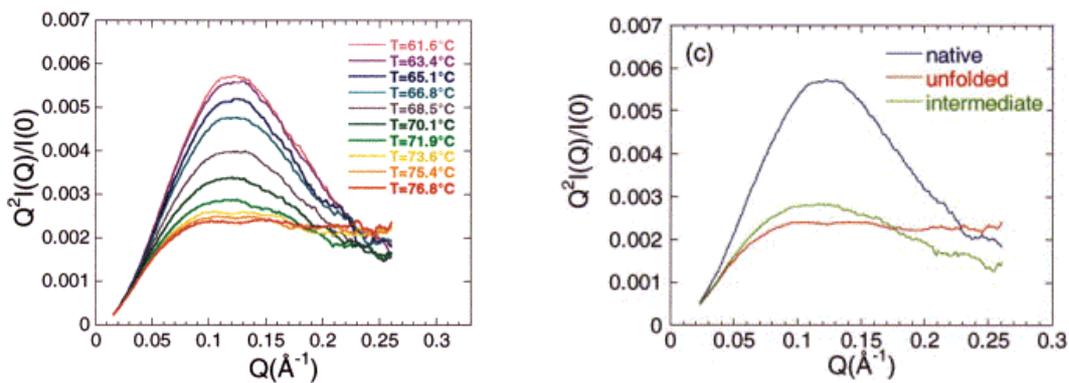


Figure 97 : Représentation de Kratky de la néocarzinostatine à différentes températures et de ses trois états caractéristiques : native, dénaturée et intermédiaire.

e) Détermination de la forme d'une macromolécule.

Les données de diffusion aux petits angles ne permettent pas d'avoir accès à la structure interne de la protéine étudiée. Le calcul de la courbe de diffusion théorique à partir du modèle atomique de vingt-cinq protéines nous montre les informations qu'il est possible d'obtenir en fonction de Q (Figure 98).

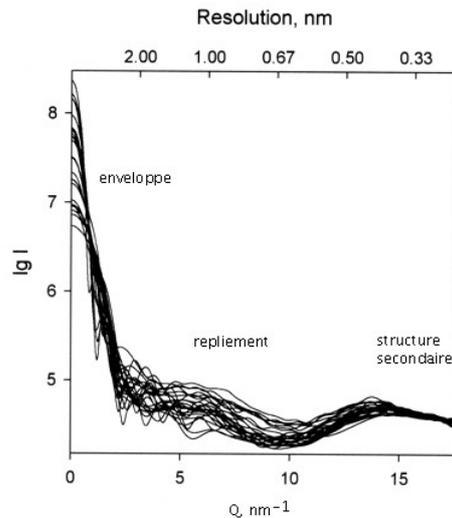


Figure 98 : Courbes théoriques de diffusion des rayons X calculées pour 25 protéines différentes à partir de leur modèle atomique. L'axe supérieur indique la résolution. Sur les courbes de diffusion, est indiqué le type d'information accessible en solution en fonction de la résolution [Svergun et al, 2001].

A basse résolution (>2 nm), les courbes sont très différentes les unes des autres et décroissent rapidement en fonction de Q . Dans cette région, la diffusion est principalement déterminée par les dimensions et la forme de la macromolécule. A moyenne résolution (2-0.5 nm), les différences sont prononcées et au-dessus de 0.5 nm, les courbes sont très similaires. Les données à moyenne résolution apportent des informations sur le repliement de la protéine et à partir de 0.5 nm sur la structure secondaire. Pratiquement, les données que nous avons enregistrées sont dans le domaine de la basse résolution. Nous pouvons toutefois avoir accès aux détails de la forme de la protéine, en calculant son enveloppe à partir de la courbe de diffusion. Ce calcul se fait par une approche *ab initio* selon deux méthodes :

-Calcul d'une fonction angulaire d'enveloppe $F(\omega)$ [Svergun et al, 1996].

La fonction $F(\omega)$ est définie de la façon suivante :

$$\rho(r) = \begin{cases} 1, & 0 \leq r < F(\omega) - \Delta \\ |F(\omega) - r| / \Delta, & F(\omega) - \Delta < r \leq F(\omega) \\ 0, & r > F(\omega) \end{cases}$$

$\rho(r)$ est la densité prise égale à 1 à l'intérieur de la particule et à 0 partout ailleurs ; r et ω (ω représente l'angle solide formé par φ et θ) sont les coordonnées sphériques. Δ est le poids de l'interface particule-solvant. La détermination de $F(\omega)$ se fait en minimisant la somme des carrés des différences entre les intensités diffusées expérimentales et calculées. Le point de départ est une forme sphérique. Les coefficients donnant le meilleur ajustement entre la courbe expérimentale et la courbe théorique sont obtenus suivant une procédure d'optimisation itérative non-linéaire. L'algorithme de ce calcul est implanté dans le programme SASHA^f développé par Svergun et al. Cette approche possède l'avantage de ne donner qu'une seule solution. Cependant elle est rapidement limitée quand des formes plus complexes doivent être ajustées.

-Par un ensemble de boules proches les unes des autres [Svergun et al, 1999].

Dans cette méthode, une sphère de diamètre D_{max} (où D_{max} est l'extension maximale de la protéine, obtenue à partir de la fonction $p(r)$ décrite précédemment), est remplie avec N pseudo atomes de rayon $r_0 \ll R$ empilés de manière dense. A chaque *pseudo* atome j , est assigné un indice X_j , égal à 1 si le $j^{\text{ième}}$ pseudo atome appartient à la protéine, et égal à 0 dans le cas contraire. La structure de la protéine est décrite par le vecteur de configuration \mathbf{X} à $N \approx (R/r_0)^3$ composantes X_j . La méthode consiste à trouver une configuration \mathbf{X} qui s'ajuste sur les données de diffusion expérimentales, c'est-à-dire telle que la fonction $f(\mathbf{X}) = \chi^2 [I_{exp}(Q), I(Q, \mathbf{X})] + \alpha P(\mathbf{X})$ soit minimale. La fonction $P(\mathbf{X})$ est la pénalité qui permet d'assurer la compacité et la connectivité de la protéine. Le coefficient α représente le poids donné à la pénalité et il est supérieur à 0. La minimisation se fait suivant des cycles de recuit simulé : des changements aléatoires des X_j sont réalisés jusqu'à atteindre la conformation où la fonction $f(\mathbf{X})$ est minimale. L'algorithme de cette méthode se trouve dans le programme DAMMIN^g. Il possède l'avantage de pouvoir calculer des enveloppes de particules complexes contrairement à SASHA. Cependant, il ne donne pas une solution unique. La comparaison d'un ensemble de solutions sert d'indicateur de la validité du modèle obtenu.

^f SASHA est disponible sur le site www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax.

^g DAMMIN est accessible sur le site www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax

Enfin, si l'on possède des courbes de diffusion sur un domaine étendu en Q ($Q \gg 0.5 \text{ \AA}^{-1}$), il est possible de construire un modèle structural de la protéine en terme de chaîne de *pseudo* résidus centrés sur la position des $C\alpha$ [Svergun et al, 2001]. Cette approche repose sur le même principe que la précédente. Le volume de départ a un diamètre égal à D_{\max} et le nombre de boules correspond au nombre de résidus présents dans la séquence de la protéine. Le diamètre des *pseudo* résidus est en première approximation le diamètre moyen d'un acide aminé soit 3.8 \AA . Les coordonnées des *pseudo* résidus r_i sont obtenus par minimisation d'une fonction semblable à la précédente. Le processus de minimisation est le même que dans le programme DAMMIN. Cette procédure se retrouve dans le programme GASBOR^h développé par Svergun et al.

III. Diffusion aux petits angles des facteurs cytosoliques p47 et p67 du complexe NADPH oxydase

1. Le dispositif expérimental.

Les expériences de diffusion aux petits angles ont été réalisées sur la ligne D24 du LURE, (Orsay). Un schéma de la ligne est représenté sur la Figure 99. Le rayonnement utilisé est monochromatique et il est sélectionné par un monochromateur courbé de Germanium (111). Ce dernier a pour avantage de focaliser le rayonnement et donc de concentrer toute l'intensité incidente sur l'échantillon. Plusieurs séries de fentes permettent de limiter les dimensions du faisceau et de supprimer les diffusions parasites. L'échantillon est placé dans une cellule sous-vide ce qui permet d'améliorer considérablement le rapport signal sur bruit [Dubuisson et al, 1997]. La température à l'intérieur de la cellule peut être régulée. L'enregistrement des données a été faite à 4°C . La cellule est un capillaire en quartz de 1.5 mm de diamètre. Un pousse-seringue permet de déplacer l'échantillon dans le faisceau. Ceci

^h GASBOR est accessible sur le site www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax

permet de renouveler l'échantillon en cours d'expérience et de limiter les conséquences de la formation de radicaux libres (en particulier d'empêcher la formation d'agrégats).

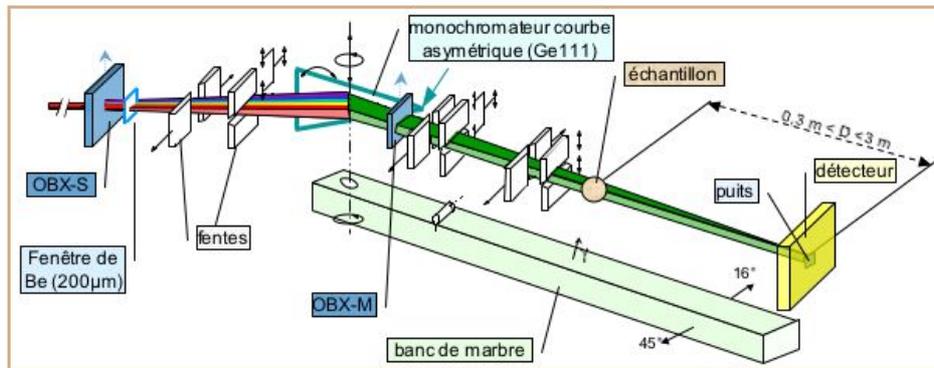


Figure 99 : Représentation schématique de la ligne D24, LURE, Orsay.

Le détecteur est placé à une distance de 1.38 m de l'échantillon. Le domaine des Q accessibles à la longueur d'onde utilisée $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$ est compris entre 0.015 et 0.34 \AA^{-1} . Le flux, la résolution et le très faible niveau de diffusion parasite faisaient de la ligne D24 du LURE une ligne particulièrement optimisée pour la diffusion aux petits angles des protéines.

2. Les conditions expérimentales

Notre objectif est d'obtenir des informations structurales sur les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase seuls dans un premier temps et par la suite sous forme complexée. Les premières études de diffusion aux petits angles de rayons X ont été concentrées sur deux des trois facteurs cytosoliques, à savoir p47 et p67.

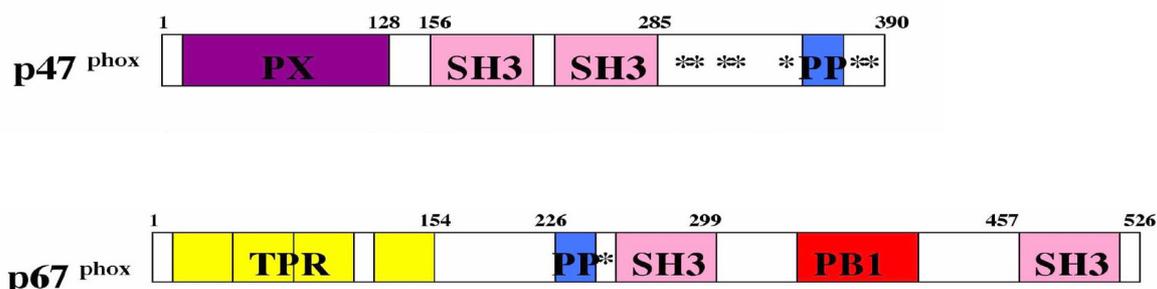


Figure 100 : Représentation schématique des protéines p47 et p67 étudiées par diffusion aux petits angles de rayons X. Les * indiquent les sites de phosphorylation.

Les conditions d'expression et de purification ont été décrites au chapitre 2. En fin de purification, les protéines sont dans le tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5% glycérol. Pour chaque protéine, les mesures de diffusion sont faites à différentes concentrations afin de s'affranchir de l'effet des interactions en extrapolant l'intensité diffusée à concentration nulle.

Pour p47, les concentrations utilisées sont les suivantes :

-6.4 mg/mL 3.7 mg/mL 1.8 mg/mL 1.0 mg/mL

Les concentrations sont déterminées par mesure de la densité optique à 280 nm. Pour analyser correctement les données de diffusion, il est important que les mesures des concentrations soient précises. Dans ce but, la valeur du coefficient d'extinction molaire de la protéine a été préalablement déterminée expérimentalement par analyse de la composition en acides aminés de la protéine. De plus, pour chaque échantillon, la concentration est mesurée plusieurs fois.

Pour P67, les concentrations mesurées avant et après l'expérience de diffusion aux petits angles diffèrent d'un facteur 2 environ. Elles sont respectivement égales à ~7, 3, 1.5, 0.75 mg/ml et 3.8, 1.5, 0.7, 0.3 mg/ml. Des analyses précises sont actuellement en cours pour tenter de comprendre ces différences. Dans ce qui suit, l'analyse des données a été faite en utilisant le deuxième jeu de valeurs de concentrations. Nous pensons en effet que ces mesures étaient les plus proches de la réalité puisqu'elles avaient été faites immédiatement après l'expérience. Ce point sera rediscuté tout au long de ce chapitre.

Le signal mesuré lors d'une expérience de diffusion sur une solution de protéines correspond à la somme du signal des protéines et du signal du tampon. Seul le signal diffusé par les protéines est intéressant dans nos analyses. Pour l'obtenir, l'intensité diffusée par le tampon

seul est systématiquement mesuré, puis soustraite de l'intensité diffusée par la solution de protéines. Le tampon utilisé pour ces mesures est le filtrat de concentration des protéines.

3. Diffusion aux petits angles de p47.

Les données de diffusion de p47 ont été enregistrées dans les conditions décrites précédemment sur quatre échantillons de concentrations différentes : 1, 1.8, 3.75 et 6.4 mg/mL. La Figure 101 montre les logarithmes des intensités diffusées pour chaque concentration. Aux très petits Q , aucune diffusion n'est observée à cause du puits qui masque le faisceau direct. Plus, nous allons vers les grands Q , l'intensité diffusée va présenter les fluctuations dues à la soustraction du bruit de fond. À partir de ce moment, les données ne sont plus utilisables.

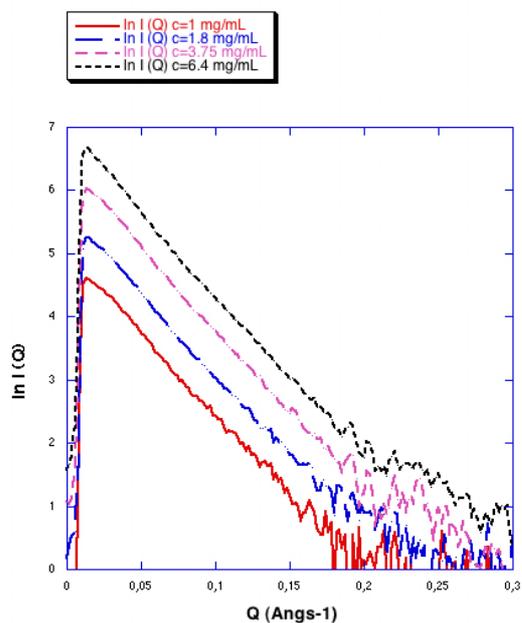


Figure 101 : Représentation logarithmique de l'intensité diffusée de p47 à différentes concentrations.

Les intensités de diffusion de p47 aux différentes concentrations, normalisées par la valeur de la concentration sont présentées sur la Figure 102. Nous pouvons ainsi constater qu'aux petits angles, l'intensité diffusée $I(Q,c)/c$ augmente avec la concentration, ce qui traduit l'existence d'interactions attractives entre les molécules p47 en solution. Pour s'affranchir de cet effet,

une extrapolation à concentration nulle est faite aux petits Q en utilisant la relation $I(Q,c)=I(Q,c=0)/(1+\alpha c)$. Le résultat de l'extrapolation est également représenté sur la Figure 102.

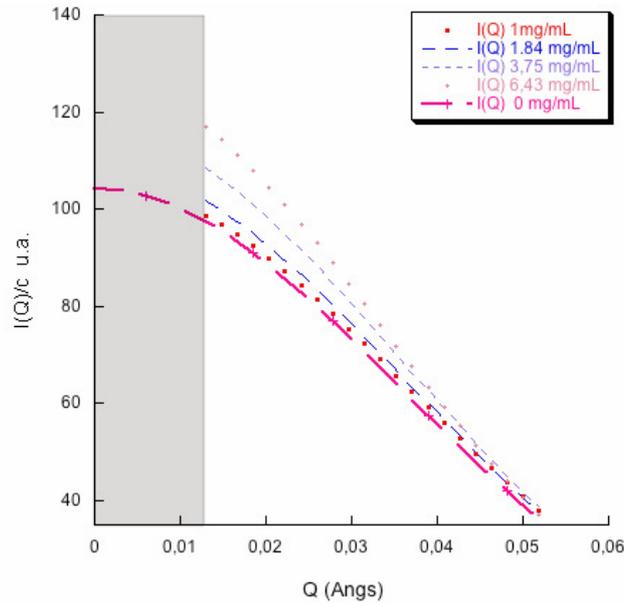


Figure 102: Représentation de l'intensité diffusée par p47 pour les concentrations utilisées : 1, 1.8, 3.75, 6.4 mg/mL et après extrapolation à concentration nulle (en rose). La zone grisée représente le puits qui masque le faisceau direct.

La courbe de diffusion analysée dans la suite du travail est une courbe de diffusion "reconstruite" de la façon suivante: à petits Q, on utilise le résultat de l'extrapolation à concentration nulle; pour les Q supérieures à 0.07 \AA^{-1} , pour lesquels les effets d'interactions sont négligeables, on utilise la courbe de diffusion obtenue pour la concentration la plus élevée, qui possède la meilleure statistique. La courbe reconstruite est présentée sur la Figure 103.

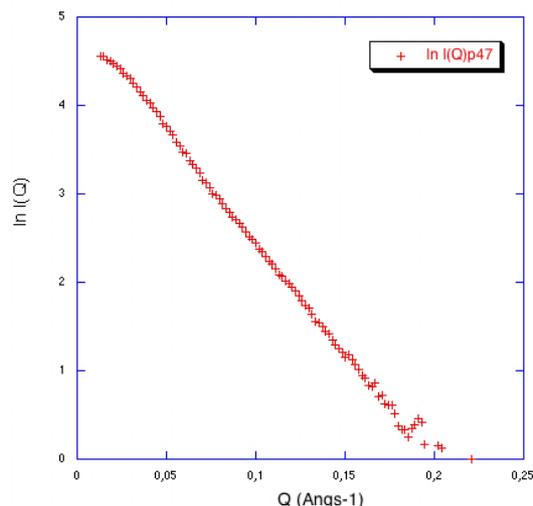


Figure 103 : Courbe de diffusion de p47 reconstruite.

Une première détermination du rayon de giration et de l'intensité à l'origine est obtenue en utilisant la relation de Guinier dans l'intervalle de Q allant de 0.013 à 0.033 Å⁻¹.

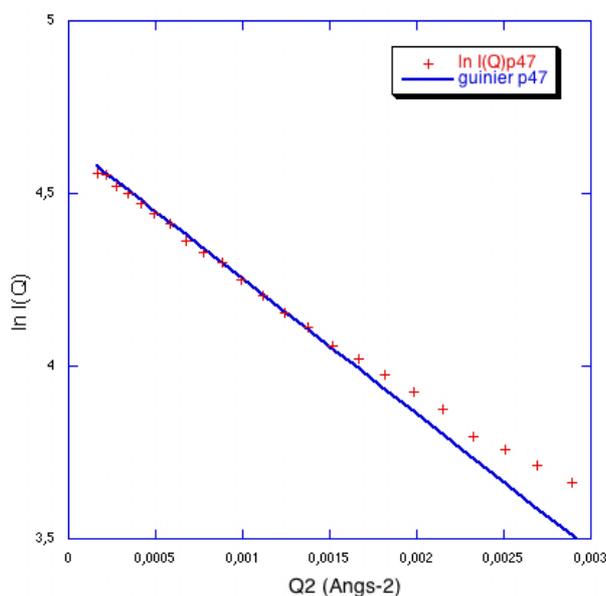


Figure 104 : Représentation de Guinier de la courbe de diffusion de p47.

La normalisation de l'intensité à l'origine $I(0)$, par celle obtenue sur le lysozyme, permet de donner une estimation de la masse des objets diffusants dans la solution de p47. Cette masse est de 45 600 g/mol. La masse molaire attendue pour p47 étant de 45 620 g/mol, la protéine est donc sous forme monomérique en solution. Ce résultat est en accord avec les données publiées antérieurement [Grizot et al, 2001b], [Lapouge et al, 2002]. Le rayon de giration est trouvé égal à 34.3 ± 0.4 Å. On constate immédiatement que ce rayon est grand par

rapport à celui que l'on devrait obtenir pour une protéine structurée à 3 dimensions, de masse ≈ 45000 g/mol: $R_g \sim 22-23$ Å (valeur estimée à partir du rayon de giration de protéines connues de masse équivalente).

Un second aperçu du type de structure de p47 est donné par la représentation de Kratky, présentée sur la Figure 105. Afin de nous affranchir des effets de la dimension et de la masse de la protéine, nous avons reporté, non pas $Q^2I(Q)$ en fonction de Q^2 comme c'est habituellement le cas, mais $(QR_g)^2I(Q)/I(0)$ en fonction de QR_g . La comparaison avec une protéine typique globulaire ayant une structure tridimensionnelle bien définie (néocarzinostatine, NCS, à température ambiante) montre que p47, bien que présentant une courbe en cloche, n'est pas une protéine globulaire bien structurée. Elle n'est pas non plus déstructurée comme le prouve la comparaison avec la NCS complètement dépliée sous l'effet de la température. Les courbes de la Figure 105 donnent une première indication que p47 possède des domaines structurés (à cause de la forme en cloche), mais que ces domaines ne s'associent pas pour donner une structure tridimensionnelle bien définie (à cause de l'écart par rapport à la courbe de la NCS à 23°C).

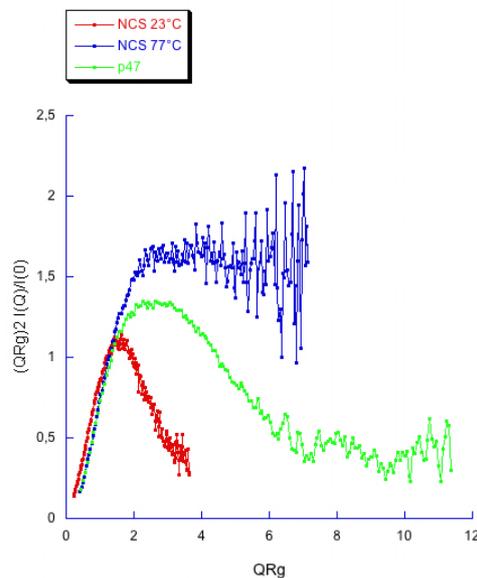


Figure 105 : Représentation de Kratky de p47. En comparaison, sont données les courbes de la NCS native (T=23°C) et complètement dépliée sous l'effet de la température (T=77°C).

Un autre aperçu de la forme de la molécule est donné grâce à la fonction de distribution des distances $p(r)$ (Figure 106) calculée à partir de la courbe de diffusion "reconstruite" de la Figure 103.

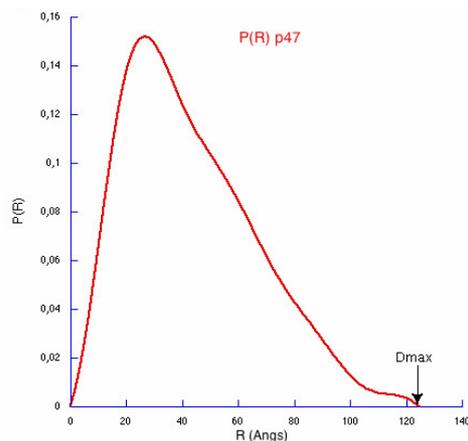


Figure 106 : Fonction de distribution des distances de p47 calculée à partir de la courbe de diffusion de p47 en utilisant le programme GNOM.

La fonction de distribution de p47 possède une extension aux grandes distances, caractéristique des particules allongées. Ce résultat est en adéquation non seulement avec les résultats de diffusion de neutrons aux petits angles [Grizot et al, 2001b] et d'ultracentrifugation analytique [Lapouge et al, 2002] mais aussi avec ceux de chromatographie d'exclusion (résultat présenté dans le chapitre 2). La protéine p47 est sous forme de monomère et il s'agit d'une protéine allongée. La dimension maximale de p47 est d'environ 125 Å. La fonction $p(r)$ permet également de calculer le rayon de giration en tenant compte de toute la courbe de diffusion. La valeur obtenue, 34.7 ± 0.2 Å, est en accord avec celle obtenue par la relation de Guinier. La fonction de distribution des distances est ensuite intégrée dans le programme DAMMIN afin de calculer une enveloppe de p47. Le volume de départ est une sphère de diamètre $D_{max} = 125$ Å dans le cas présent. Il est rempli de 1926 *pseudo* atomes de rayon égal à 4.5 Å. Cinq à dix calculs sont effectués donnant chacun une enveloppe de p47. Les différentes enveloppes sont superposées pour former une enveloppe moyenne qui servira de volume de départ pour un nouveau cycle du programme DAMMIN. Les enveloppes A à D sont obtenues après cinq cycles de calcul, E après dix cycles (Figure 107). L'intérêt de répéter ce processus vient du fait que DAMMIN ne donne pas de solution unique. La comparaison des enveloppes obtenues permet d'estimer la stabilité de la solution. Pour p47, les cinq conformations issues des calculs par DAMMIN sont toutes similaires et montrent toutes une molécule de forme allongée.

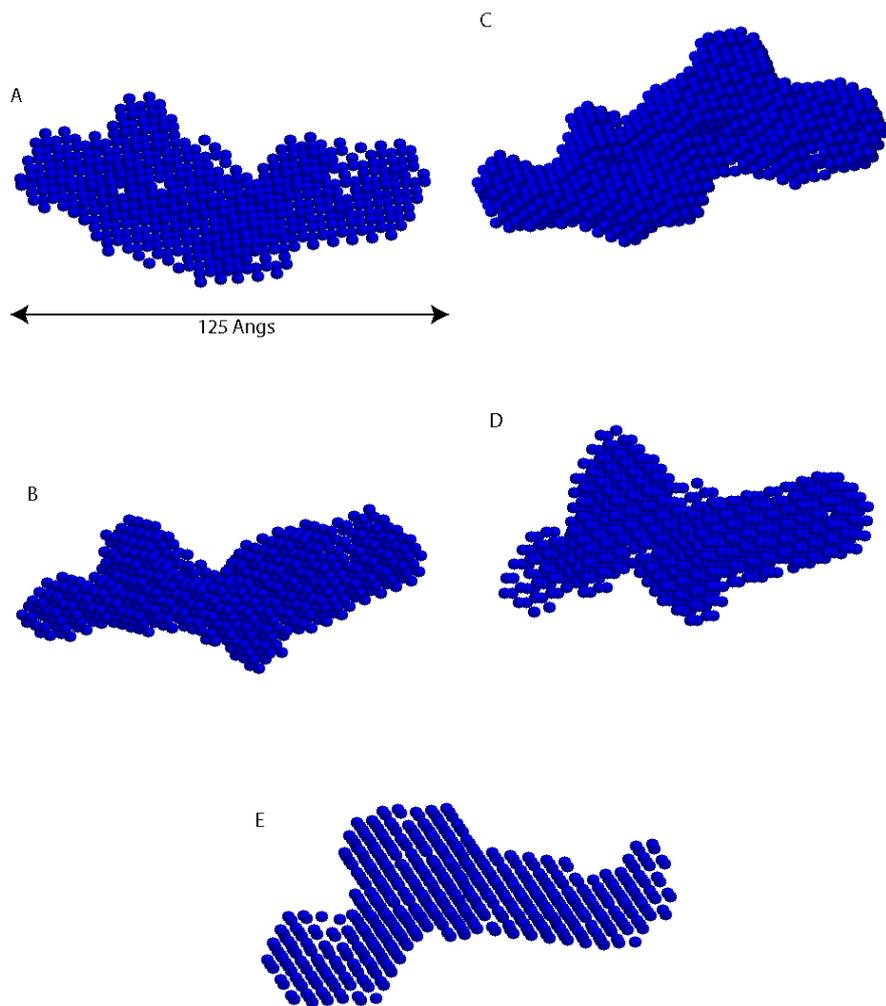


Figure 107 : Enveloppes de p47 obtenues par la DAMMIN. L'enveloppe a été calculée en partant d'un volume de diamètre D_{max} soit 125Å.

4. Diffusion aux petits angles de p67.

Les données de diffusion aux petits angles du facteur cytosolique p67 ont été enregistrées dans les mêmes conditions que p47. Les courbes sont présentées à la Figure 108.

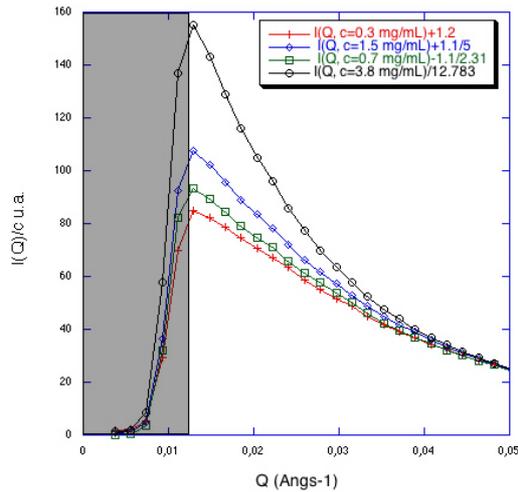


Figure 108 : Diffusion de p67 à différentes concentrations 0.30, 0.7, 1.5 et 3.8 mg/mL. La zone grisée indique le puits masquant le faisceau direct.

On constate que l'intensité diffusée $I(Q,c)/c$ croît très fortement avec la concentration dans le domaine des petits Q , plus fortement que pour p47, ce qui traduit des interactions encore plus attractives, dans les conditions salines de l'expérience. Ceci rend l'extrapolation à concentration nulle plus difficile, car la relation utilisée $I(Q,c)=I(Q,c=0)/(1+\alpha c)$ n'est valable que pour des interactions modérées. La courbe "reconstruite" suivant la même procédure que pour la protéine p47, et présentée sur la Figure 109, possède donc un certain degré d'imprécision dans la région des petits Q .

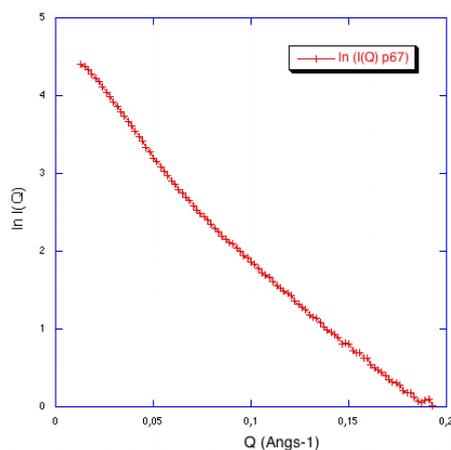


Figure 109 : Courbe de diffusion de p67 reconstruite en utilisant à petit Q les données extrapolées à concentration nulle, et à grands Q les données mesurées à la concentration de 3.8 mg/mL.

Cette courbe de diffusion reconstruite permet de déterminer grâce à la relation de Guinier le rayon de giration de p67, $R_g = 46.0 \pm 0.6 \text{ \AA}$, et l'intensité à l'origine $I(0)$ (Figure 110).

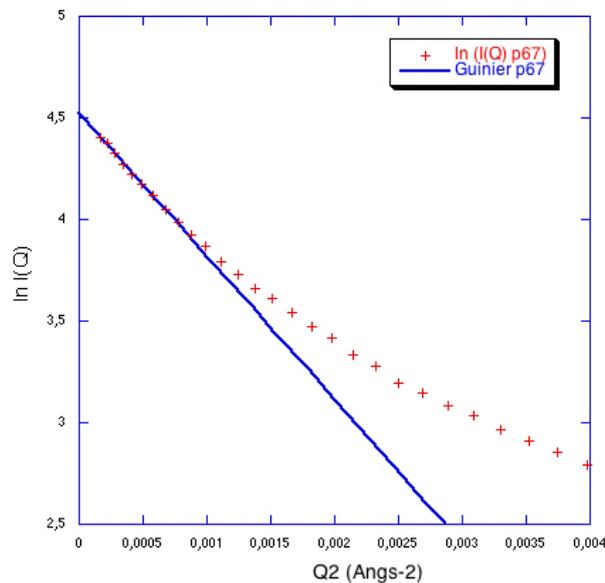


Figure 110 : Ajustement à la relation de Guinier utilisé pour déterminer les paramètres structuraux de p67.

Comme précédemment pour P47, la valeur de $I(0)$ est utilisée pour déterminer la masse molaire, en comparant avec la valeur de $I(0)$ obtenue sur le lysozyme. Toutefois, de par l'incertitude sur les valeurs des concentrations de p67, il subsiste une incertitude sur la valeur de la masse molaire des objets diffusants: on obtient une masse molaire de l'ordre de 65 000 g/mol ou de l'ordre de 130 000 g/mol suivant que l'on utilise le premier jeu (déterminé avant l'expérience) ou le deuxième jeu (déterminé après celle-ci) de concentrations. Il est donc difficile à ce niveau de trancher entre monomère (masse théorique 59 730 g/mol) ou dimère; Nous reviendrons sur ce point à la fin de ce paragraphe.

La représentation de Kratky de p67, renormalisée à R_g et $I(0)$, a été calculée avec les paramètres déterminés à partir de la relation de Guinier, soit $R_g = 46 \text{ \AA}$ et $I(0) = 92.1$ (u.a.). Elle nous indique que la protéine n'est pas complètement déstructurée, puisque la courbe a une forme en cloche. Cependant, l'écart avec la courbe de la NCS native montre qu'il ne s'agit pas non plus d'une protéine globulaire bien structurée (Figure 111).

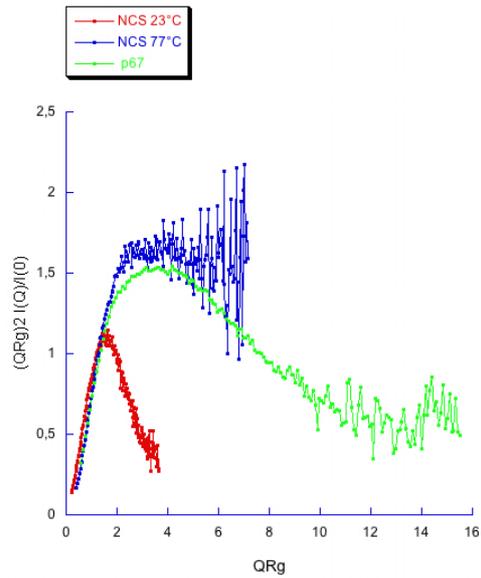


Figure 111 Représentation de Kratky de p67, avec en comparaison les courbes de la NCS native (22.8°C) et complètement dénaturée (76.8°C).

La détermination de la fonction de distribution des distances $p(r)$ de P67 en faisant tourner le programme GNOM sur la courbe extrapolée à concentration nulle n'est pas très aisée, car elle est légèrement dépendante de la valeur minimale de Q que l'on utilise pour faire cette détermination. Ceci n'est pas surprenant, étant données les difficultés mentionnées ci-dessus pour l'extrapolation à concentration nulle dans la région des petites valeurs de Q . La dimension maximale D_{max} obtenue varie entre 150 et 180 Å, le rayon de giration variant conjointement entre 43 et 48 Å. Deux exemples de fonction $p(r)$ sont présentés sur la Figure 112.

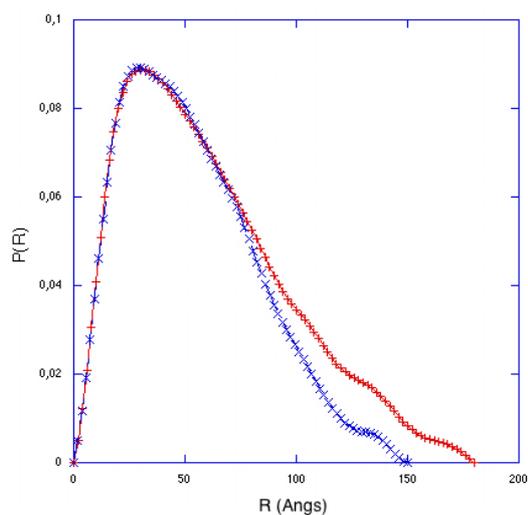


Figure 112 : Fonction de distribution des distances $p(R)$ de p67 en utilisant le programme GNOM.

Malgré les difficultés, la fonction de distribution des distances a permis de calculer un modèle en utilisant la procédure DAMMIN selon la même procédure que celle décrite pour p47. Les seules grandeurs qui diffèrent sont le diamètre de la sphère de départ, à noter que le résultat dépend assez peu de la fonction $p(r)$ utilisée ($D_{\max} = 150$ ou 180 \AA), le nombre de pseudo atomes qui est de 2093 et leur rayon de 6.6 \AA . Les solutions obtenues sont présentées sur la Figure 113. Les enveloppes de p67 sont similaires et confirment la forme allongée et flexible de p67.

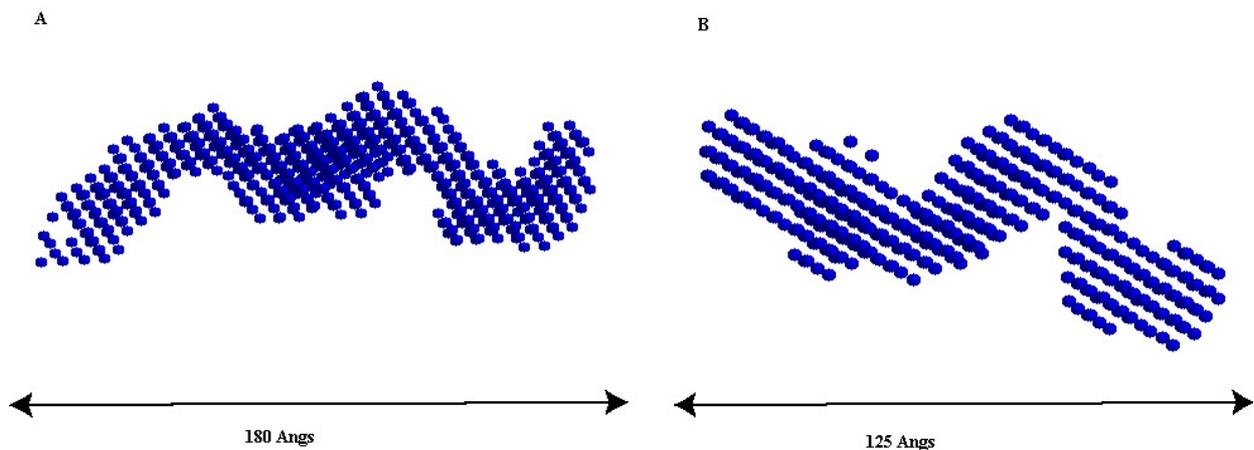


Figure 113 : Enveloppes de p67 calculées avec DAMMIN. A et B correspondent respectivement à un D_{\max} de 180 et 125 \AA .

Le problème qui subsiste est de savoir si ces enveloppes représentent un monomère ou un dimère de P67. Une information intéressante est le volume exclus total correspondant à l'ensemble des pseudo-atomes. Quelle que soit la fonction de distribution des distances utilisée, on obtient toujours à partir de DAMMIN un volume de l'ordre de $120\,000 \text{ \AA}^3$. Or le volume auquel on peut s'attendre pour un monomère de P67 est le suivant: $V_{\text{mono}} = Mv_p(1+\alpha)/\mathcal{N}$ où M est la masse molaire du monomère, \mathcal{N} le nombre d'Avogadro, v_p le volume spécifique partiel et α un coefficient qui tient compte de la première couche d'hydratation de la protéine (puisque celle-ci est "visible" par diffusion aux petits angles) [Svergun et al, 1998]. Si on prend $v_p \approx 0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$, $\alpha \sim 0.3\text{-}0.4 \text{ g d'eau par g de protéine}$, on obtient $V_{\text{mono}} \sim 100\,000 \text{ \AA}^3$, valeur peu inférieure à la valeur correspondant aux enveloppes issues de DAMMIN présentées sur la figure 111. Il faut noter ici que pour une protéine possédant des

parties flexibles, susceptibles de se mouvoir à l'intérieur d'un certain domaine, le volume obtenu par DAMMIN est toujours supérieur au volume calculé à partir de la masse molaire, le calcul prévalant surtout pour une protéine globulaire. Ceci peut se voir immédiatement sur la P47, pour laquelle le programme DAMMIN conduit à un volume de $\sim 95\ 000\ \text{\AA}^3$, alors que le volume calculé à partir de la formule ci-dessus est de l'ordre de $74\ 000\ \text{\AA}^3$. De toutes ces considérations, nous déduisons que le volume obtenu pour P67 à partir des données de diffusion aux petits angles extrapolées à $C=0$, est plutôt celui d'un monomère. Ceci nous inclinerait à penser que le jeu correct de concentrations est celui déterminé avant l'expérience de diffusion. Ce point reste évidemment à éclaircir.

L'intérêt de cette déduction est qu'elle permet de réconcilier les contradictions apparentes au sujet de p67 (monomère ou dimère) provenant des différentes expériences: centrifugation analytique, SANS et SAXS. Les données concernant ces différentes expériences sont récapitulées au Tableau 19. On serait en fait en présence d'un équilibre monomère-dimère, la proportion de chaque espèce dépendant des conditions de l'expérience. Les courbes de la Figure 108 traduiraient l'évolution de cet équilibre: la courbe à la plus basse concentration correspondrait à une majorité de monomères, et celle à la plus haute concentration à une majorité de dimères.

	AUC	SANS	SAXS
Tampon	50 mM HEPES.Na pH 7.5 ; 100 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 2 mM β mercaptoéthanol	50 mM HEPES.Na pH 7.5 ; 400 mM NaCl ; 17% glycérol ; 100 mM Imidazole	50 mM HEPES.Na pH 7.5 ; 100 mM NaCl ; 1 mM EDTA, 2 mM DTT ; 5% glycérol
Concentration (mg/mL)	0.3 0.5 0.8	1.2	0.3 (0.75)* 0.7 (1.5)* 1.4 (3)* 3.8 (7)*
Température	15°C	4°C	4°C
Etat d'oligomérisation	Monomère	Dimère	Équilibre monomère- dimère ?
Chromatographie d'exclusion	Monomère	Dimère	Équilibre monomère- dimère ?

Tableau 19 : Récapitulatif des conditions expérimentales des différentes études du facteur cytosolique p67 en solution (UCA : analytical ultracentrifugation ; SANS :small angle neutron scattering ; SAXS : small angle X-ray scattering). Les concentrations mesurées avant les expériences de SAXS sont indiquées par *.

IV. Détermination de distances intramoléculaires dans p47.

La détermination de l'enveloppe d'une macromolécule biologique est une première étape dans l'obtention de données structurales par diffusion aux petits angles. Si la structure de domaines distincts de la molécule a été résolue, il est alors possible de construire un modèle de référence en les replaçant dans l'enveloppe. Afin de limiter le nombre de solutions, il est nécessaire de chercher des contraintes du système, par exemple des distances intramoléculaires. Une des techniques utilisées dans ce but est la réticulation intramoléculaire combinée à la spectrométrie de masse [Young et al, 2000]. Les expériences de réticulation intramoléculaire ont été réalisées dans un premier temps uniquement sur p47. Elles ont été faites en collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de masse des protéines de l'Institut de Biologie Structurale (Grenoble) qui développe actuellement cette méthodologie. Celle-ci a notamment été utilisée pour caractériser les domaines d'interface de l'EPO [Haniu et al, 1993]. L'agent réticulant utilisé est le BS3, Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (Figure 114) caractérisé par une fonction sulfo-NHS ester à chacune de ces extrémités. Il est hydrosoluble et réagit avec les fonctions amines des chaînes latérales des lysines. La longueur du bras espaceur est de 11.4 Å. Quand le BS3 est lié de deux côtés sur une protéine, la masse molaire ajoutée est de 138 g/mol.

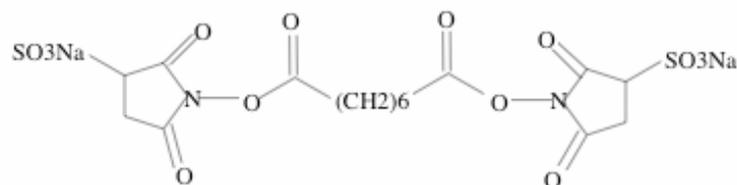


Figure 114 : Formule du BS3 (Pierce).

La réaction de réticulation se produit par coupure des liaisons esters et formation de deux liaisons peptidiques avec les amines des chaînes latérales des lysines. Le tampon de la protéine p47 a été préalablement changé en tampon phosphate PBS tamponné à pH 7.5. La réticulation se faisant sur des fonctions amines, le tampon de la protéine ne doit pas en contenir afin de limiter les réactions non spécifiques. Avant l'étape de réticulation, une analyse par spectrométrie de masse de type électrospray a été réalisée afin de vérifier la pureté et l'homogénéité de l'échantillon de p47. Le spectre de masse présenté au chapitre 2 (Figure

30) ne montre qu'une seule espèce correspondant à la masse molaire de p47 soit 46 300 g/mol. La réaction de réticulation se fait à température ambiante pendant 15 minutes et plusieurs conditions ont été testées. Pour chaque réaction, un témoin sans agent réticulant est réalisé parallèlement dans les mêmes conditions que la réticulation. Les conditions testées sont présentées dans le Tableau 20.

N° de la réaction	Concentration de p47 en mg/mL	Concentration de BS3 en mg/mL	Volume de réaction en μ L
1	2.3	0.4	500
2	4.6	0.4	50
3	4.6	0.2	50
4	4.6	0.1	50

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des conditions testées de réticulation de p47 par le BS3. Toutes les réactions ont été faites à température ambiante pendant 15 min.

La réaction de réticulation est stoppée et l'excès de BS3 enlevé par filtration sur membranes de taille 30 000 g/mol. Le tampon est à nouveau changé en 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl afin de limiter la présence de sels pour l'analyse en spectrométrie de masse. Le volume final de l'échantillon est d'environ 50 μ L. Afin de vérifier si la réticulation a eu lieu, une première analyse en spectrométrie de masse de type MALDI est réalisée. La présence de réticulation intramoléculaire va induire l'étalement du pic observé et son décalage vers des plus hautes masses molaires. Ce décalage est proportionnel au nombre d'agents réticulant fixés sur la protéine. Les résultats des réactions de réticulation 1 et de la série (2, 3, 4) seront présentés séparément. Les spectres de masse obtenus en MALDI pour la réaction n°1 sont représentés à la Figure 115.

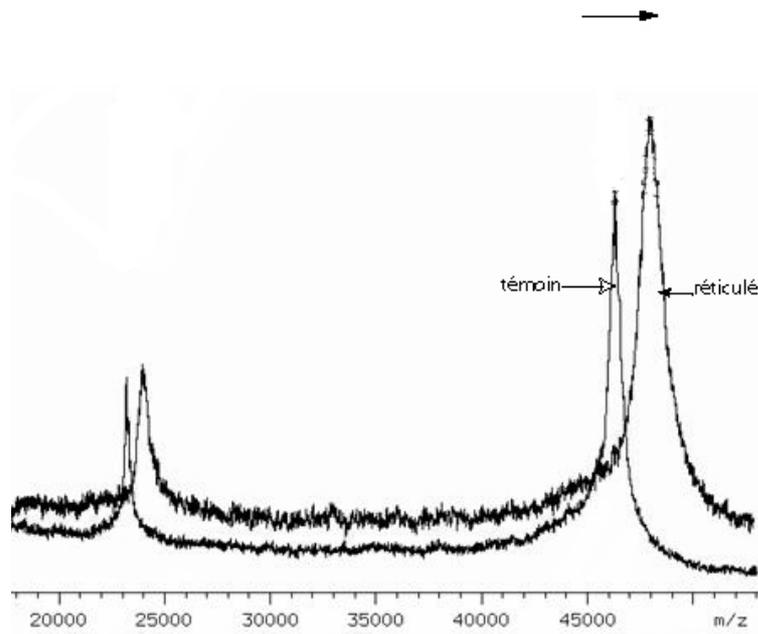


Figure 115 : Spectres MALDI de p47 réticulé et non réticulé (témoin). L'échantillon réticulé a été obtenu en présence de 0.4 mg/mL de BS3 et de 25 pmol de p47 (réaction n° 1). Le témoin subit la même réaction que l'échantillon réticulé moins l'addition d'agents réticulant. La flèche indique le déplacement du pic de la protéine réticulée par rapport au témoin.

La superposition des spectres MALDI des échantillons témoin et réticulé montre une différence entre eux. Le pic témoin correspondant à une masse molaire de 46300 g/mol nous indique qu'il s'agit bien de p47. Le procédé de réticulation n'altère donc pas notre protéine. L'échantillon mis en présence de l'agent réticulant (BS3) montre un décalage du pic de la protéine vers les hautes masses molaires. La masse molaire de la protéine est désormais estimée à 47 700 g/mol. De plus, le pic est plus large que celui observé pour l'échantillon témoin. L'agent réticulant s'est donc fixé sur p47 en quantités importantes. Les autres essais réalisés ont eu pour but de diminuer le nombre d'agents réticulant fixés à la protéine. En effet, la fixation d'un trop grand nombre d'agents réticulant peut détruire la protéine.

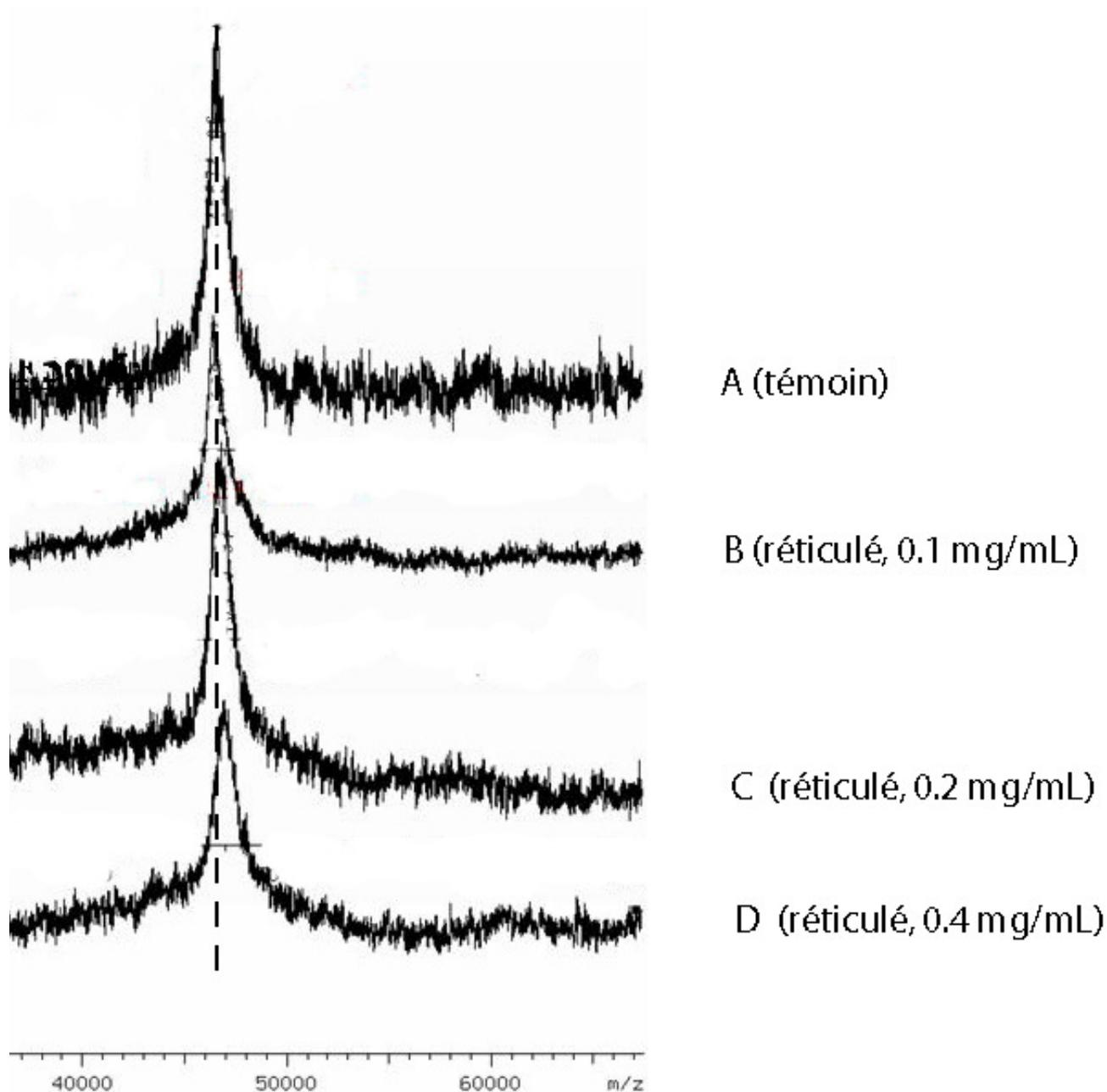


Figure 116 : Superposition des spectres MALDI des échantillons A : témoin, B : réticulé avec 0.1 mg/mL de BS3 (réaction n°4), C : réticulé avec 0.2mg/mL de BS3 (réaction n°3), D : réticulé avec 0.4 mg/mL de BS3 (réaction n°2). Le trait en pointillé montre la position du pic de p47 de l'échantillon témoin.

La superposition des spectres MALDI des expériences de réticulation avec différentes concentrations de BS3 montre qu'à une concentration de 0.1 mg/mL de BS3 (réaction n°4), il n'y a pas de décalage visible du pic donc pas de différence de masse observée. Aucune molécule de BS3 n'a réagi avec la protéine. Pour les concentrations de 0.2 et 0.4 mg/mL de BS3, les pics respectifs sont plus larges et ils sont décalés vers les hautes masses molaires. Les nouvelles masses molaires sont respectivement de 46 800 g/mol et 46990 g/mol. La

masse molaire attendue de p47 est estimée à 46 300 g/mol. Les écarts de masse montre une fixation d'agents réticulant moins importante que lors de la première expérience. Les masses molaires de p47 obtenues après réticulation sont regroupées dans le tableau suivant :

N° de la réaction	Masse molaire de p47 réticulé	Nombre moyen d'agents réticulant fixés par ses deux extrémités
1	47 700 g/mol	10
2	46 990 g/mol	5
3	46 800 g/mol	4
4	46 300 g/mol	0

Tableau 21 : Résultats des expériences de réticulation par le BS3 de p47. Le nombre d'agents réticulants fixés est calculé en considérant qu'un agent est fixé par ses deux extrémités à la protéine, l'incrément de masse est alors de 140 g/mol par molécule de BS3 fixée.

La diminution du rapport des concentrations de BS3 sur la protéine permet de diminuer le nombre d'agents réticulant fixé à la protéine. De plus, moins la concentration de l'agent réticulant est importante, moins il y a de réticulation et pour une concentration inférieure à 0.2 mg/mL, nous n'observons plus de réticulation. D'après les résultats des analyses en MALDI, seules les réactions n° 1, 2 et 3 sont conservées pour la suite de l'expérience. La présence de contaminants de hautes masses molaires est révélée par analyse sur gel SDS-PAGE 12%. Pour les enlever, les échantillons sont filtrés sur membrane 100.10³ g/mol, p47 passe alors à travers la membrane, ce qui nous permet de récupérer un échantillon homogène.

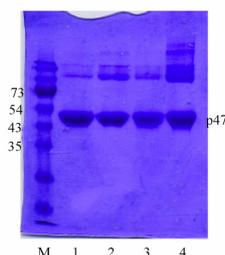


Figure 117 : Gel SDS-PAGE 12% du témoin et de l'échantillon réticulé issu de la réaction n°1 avant passage sur membrane (respectivement 2 et 4) et après passage (1 et 3). M est le marqueur de masses molaires (Fermentas).

Suite à ce dernier passage sur membrane, les échantillons sont digérés par une endoprotéase à sérine, la Lys-C (Roche). La Lys-C hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques au

niveau du site carboxylique des lysines. La fixation de l'agent réticulant sur une lysine empêchera donc la coupure de se faire et par conséquent cela nous permet de détecter les lysines modifiées. La digestion se fait à température ambiante pendant 18 heures. Nous mettons nos échantillons témoins et réticulés en présence 5µg de protéase. Les peptides issus de la digestion par la Lys-C sont séparés par chromatographie en phase liquide puis analysés par spectrométrie de masse. Une partie du produit de digestion est diluée par un solvant contenant 0.2% d'acide formique. Les peptides sont élués par un gradient de solvant composé de 0.2% d'acide formique et 90% de méthanol. Au fur et à mesure que les peptides sont élués, ils sont alors ionisés et détectés. La comparaison entre les spectres de la protéine seule et réticulée va permettre de mettre en évidence de nouveaux peptides au niveau de la protéine réticulée. La masse de ces peptides sera ensuite comparée avec la liste théorique des peptides réticulés. Nous obtenons ainsi la distance entre deux régions de la protéine distantes de la taille du bras espaceur plus ou moins 50%.

Dans un premier temps, sur les échantillons témoins nous répertorions tous les peptides issus de la digestion par la Lys C. Dans notre cas, nous avons pu reconstituer toute la séquence de p47. La comparaison des spectres des échantillons témoins et réticulés ont permis de mettre en évidence des massifs isotopiques correspondant à des peptides supplémentaires. L'analyse par le programme développé par M. Müllerⁱ nous donne les peptides pouvant être réticulés soit de façon intrapeptidique soit de façon interpeptidique. La réaction n°1 est la seule à nous donner des résultats. L'analyse par le programme ne met en évidence qu'un seul agent réticulant fixé par ses deux extrémités. Elle se situe entre les résidus 27 et 65 du domaine PX de p47. Il s'agit d'une réticulation intrapeptidique. Les autres agents réticulant détectés n'ont réagi que d'un seul côté ou la résolution des massifs isotopiques n'est pas suffisante pour déterminer une masse molaire précise du peptide. Ils ne sont donc pas pris en compte. Le BS3 a été choisi comme agent réticulant du fait de la longueur intermédiaire de son bras espaceur. Cependant cette longueur (11.4 Å) est soit trop importante soit trop courte pour pouvoir interagir avec deux lysines. Deux autres agents réticulant sont à notre disposition : le sulfo-DST et le sulfo-EGS dont les bras espaceur ont une longueur respective de 6.3 et 16.1 Å. La prochaine étape de ce travail sera de tester ces deux agents en particulier le sulfo-EGS qui permettrait de réticuler des lysines plus espacées dans l'espace que le BS3 car p47 est une molécule allongée et que les lysines sont réparties dans toute la séquence.

ⁱ de chez expazy

Conclusions & perspectives.

I. Conclusions.

Au début de ce travail de thèse, les principales données structurales connues sur les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH oxydase concernaient les domaines isolés. La cristallisation des protéines entières se relevant impossible, des études en solution ont été engagées [Grizot et al, 2001b], [Lapouge et al, 2002]. Elles ont permis de mettre en évidence l'interaction entre p40 et p47 et de décrire un modèle du complexe ternaire présenté au chapitre 1. Le travail réalisé a comporté deux axes principaux : une étude des domaines PB1 de p40 et p67Nter par cristallographie des rayons X et une étude des protéines entières par microscopie électronique et diffusion des rayons aux petits angles.

1. Étude des domaines PB1-p40 et p67Nter par cristallographie des rayons X.

Au début du projet, la seule structure connue de domaine PB1 était celle de l'homologue de PB1-p67 chez la levure Bem1p. Une étude structurale a donc été engagée sur le domaine PB1 de p40. Les différentes conditions testées ont conduit à l'obtention de cristaux en forme de baguettes qui n'ont pas pu être reproduits. La construction du domaine PB1 utilisée possédait en amont et en aval deux régions ne présentant aucune structuration connue et donc flexible. La présence de zones flexibles est à corréler avec les difficultés rencontrées pour concentrer et cristalliser ce domaine. Récemment, une équipe a résolu la structure du complexe PB1-p40/PB1-p67 [Wilson et al, 2003]. La construction du domaine PB1-p40 utilisée est à quelques acides aminés près la même que celle que nous avons utilisé, excepté une mutation C242V permettant d'éviter les problèmes d'agrégation. Cependant, la structure du domaine PB1-p40 a été résolue uniquement en complexe avec son partenaire PB1-p67. Il est donc possible que ce domaine soit très peu stable quand il n'est pas complexé à son partenaire. Cela a été montré par des études en RMN (S. Chenavas^j, communication personnelle).

Le domaine p67Nter (résidus 1 à 232) contient le domaine d'activation interagissant avec le cytochrome *b558*. Il contient le domaine TPR dont la structure est connue [Grizot et

^j S. Chenavas, IBS/LPM

al, 2001a], [Lapouge et al, 2000], mais aucune donnée structurale n'existe sur le domaine d'activation. L'optimisation des conditions de cristallisation de p67Nter a permis l'obtention de cristaux en forme de baguettes. Cependant, la qualité des cristaux n'était pas constante. En effet, la caractérisation des différents échantillons a permis de mettre en évidence une protéolyse C-terminale de la protéine au cours du temps et lors de la congélation. Malheureusement, les cristaux de bonne qualité correspondent à la protéine protéolysée. Les cristaux obtenus avec la forme entière étaient systématiquement plus petits plus souples et diffractant mal. La seule carte de densité électronique qu'il a été possible de calculer correspond au domaine TPR de p67. Le domaine d'activation semble donc être une zone très peu structurée.

2.Études des facteurs cytosoliques entiers du complexe de la NADPH oxydase.

Deux approches différentes ont été utilisées pour l'étude des facteurs cytosoliques entiers : d'une part par cristallisation 2D et microscopie électronique et d'autre part en solution par diffusion des rayons X aux petits angles. Les premiers résultats de diffusion confirment les résultats de précédentes études par diffusion de neutrons [Grizot et al, 2001b] et d'ultracentrifugation analytique [Lapouge et al, 2002]. En effet, les facteurs cytosoliques p47 et p67 ne sont pas des protéines globulaires mais allongées et flexibles. Les enveloppes de ces deux facteurs cytosoliques ont pu être calculées par le programme DAMMIN. De nombreux essais de cristallisation 2D sur monocouche de lipides à l'interface air/eau ont été réalisés. Diverses conditions de lipides, tampons, sels, durée d'incubation ont été testées. Sur toutes les constructions, nous avons pu noter la formation de monocouches denses et homogènes sans organisation cristalline. Cette absence de cristaux peut être causée par la flexibilité de la molécule étudiée. Ce phénomène se retrouve pour des domaines isolés des facteurs cytosoliques pour lesquels des essais ont été réalisés. Pour la plupart p67Nter, p40Cter, p47Cter, il s'agit de constructions possédant des zones très peu structurées. Un cristal est une organisation périodique de molécules identiques. Une des raisons de la non cristallisation 2D des protéines étudiées peut se trouver dans leur forme. Prenons l'exemple du facteur cytosolique p47. Son enveloppe a été calculée d'après les données de diffusion de rayons X. Il possède une forme plutôt allongée et asymétrique (Figure 107). Sur une

monocouche de lipides contenant un mélange de lipides ligands et diluants, nous pouvons penser que les molécules de p47 ne s'adsorbent pas dans la même orientation. Cette orientation serait aléatoire et régit non pas par des interactions intermoléculaires mais par des phénomènes de gênes stériques. La Figure 118 propose un schéma d'adsorption de p47 sur une monocouche de lipides. Cette théorie ne peut s'appliquer qu'à de gros domaines ou aux protéines entières. La flexibilité est pour les petits domaines étudiés le seul paramètre pouvant empêcher la cristallisation.

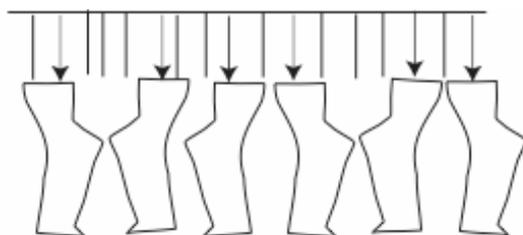


Figure 118 : Modèle proposé d'adsorption de p47N-His à la monocouche de lipides. La forme donnée pour p47N-His est basée sur l'enveloppe de p47 déterminée par diffusion des rayons X aux petits angles. Les lipides ligands sont représentés par les → et les lipides diluants par les — .

La caractérisation des monocouches lipides-protéines a été réalisée par ellipsométrie. Elle consiste en la mesure de l'angle delta. Cet angle est fonction de l'adsorption des protéines sur la monocouche de lipides. Il existe une forte adsorption aspécifique du facteur cytosolique p67. La fixation du complexe p47/p67 se fait mieux qu'en fixant p47 dans un premier temps puis p67. Une des explications de ce phénomène possible viendrait de la proximité des molécules de p47 fixées à la monocouche. En effet, si les molécules de protéines sont proches les unes des autres sans qu'il soit possible pour p67 de venir s'insérer dans la monocouche. De plus, cette dernière est trop dense et pas suffisamment fluide pour que les complexes lipides protéines puissent bouger dans le plan et permettre à p67 d'interagir avec p47. De plus, la proximité des molécules de p47 peut favoriser des interactions de type SH3-PP p47/p47 d'une affinité plus forte que celle résultante de l'interaction p47/p67. L'addition de p67 ne pourra donc pas permettre la dissociation des complexes de p47 formés à la surface de la monocouche et l'interaction de p67 avec p47. Ainsi, si les deux protéines sont mélangées en solution, le complexe peut se former. Il sera ensuite possible de l'adsorber sur la monocouche. La formation de complexe par adsorption sur des lipides nécessiterait une proportion plus importante de lipides diluants par rapport aux lipides ligands. La monocouche serait ainsi plus

fluide, les complexes lipides-protéines pourraient ainsi diffuser dans le plan pour que p67 puisse s'insérer entre les molécules de p47 et donc interagir entre elles.

II.Perspectives.

A l'heure actuelle, la voie la plus prometteuse pour obtenir des informations structurales sur les facteurs cytosoliques entiers est la diffusion des rayons X aux petits angles. Nous possédons désormais une enveloppe pour les protéines p47 et p67. Si les données de p47 sont facilement exploitables, celles de p67 devront être améliorées. Ceci passe par une amélioration de la qualité de l'échantillon : diminution de la concentration en sel du tampon, ajouter plus de glycérol. La construction d'un modèle de référence de p47 à partir des structures cristallographiques des différents domaines isolés est possible. Pour cela, il faudra d'abord déterminer des distances intramoléculaires par réticulation pour positionner les domaines les uns par rapport aux autres. Pour le moment, un seul agent réticulant a été testé pour p47 et il a permis de déterminer une seule distance. D'autres agents réticulants devront être testés et les mêmes études pourront être engagées pour p67 quand des données de diffusion de meilleure qualité seront à notre disposition. La même approche pourra être utilisée pour le troisième facteur cytosolique p40. Pour cela, une étape de clonage est nécessaire afin d'obtenir des échantillons homogènes de cette protéine. Une construction en fusion avec la maltose binding protein est à ce jour envisagée.

Avec les modèles de références des différentes protéines seules, l'étape suivante sera l'étude du complexe ternaire formé par les trois facteurs cytosoliques. Ce complexe devra être caractérisé biochimiquement (chromatographie d'exclusion,...), et un modèle de référence pourra également être construit. L'existence de toutes les interactions possibles entre les facteurs cytosoliques n'a pas été démontrée *in vivo*, il sera donc nécessaire de cartographier de façon précise les zones d'interactions par digestion à la trypsine. La détermination de distance intermoléculaire permettra de positionner correctement les protéines les unes par rapport aux autres.

Enfin, la cristallisation 2D pourrait apporter des informations structurales supplémentaires sur le complexe formé par les facteurs cytosoliques. Pour cela, il serait intéressant d'utiliser l'affinité des domaines PX de p47 et p40 pour les phosphatidyl inositols. Cette approche possède l'avantage que ces deux protéines s'adsorberaient à la monocouche

dans la même orientation. La cristallisation serait ainsi favorisée. Cette stratégie serait particulièrement intéressante pour étudier le complexe sous sa forme active. Dans la cellule, l'interaction de p47 avec le phosphatidyl inositol (3, 4) diphosphates se fait au moment de l'activation du complexe. La cristallisation du complexe via l'interaction p47/ phosphatidyl inositol (3, 4) diphosphates permettrait d'obtenir des informations sur les modifications structurales provoquées par l'activation du complexe.

Annexes

Annexe1 : Microscopie électronique et cristallographie de rayons X.

Cette étude a été publiée par Sato C., et al en 2004

Le récepteur 1,4,5 inositol triphosphate est un homotétramère de 1252.10^3 g/mol formant un canal à calcium dans le réticulum endoplasmique. Il joue un rôle important dans la transmission neuronale et dans différents processus physiologiques et morphologiques (mémoire, division cellulaire,...). Le récepteur peut être décomposé en trois domaines structuraux distincts : le domaine cytoplasmique avec une poche de liaison pour l'inositol triphosphate proche du côté N-terminal suivi d'un domaine transmembranaire composé de six hélices transmembranaires et une courte région C-terminale cytoplasmique. L'inositol triphosphate et le calcium sont deux co-agonistes et leur liaison du côté cytoplasmique sur le récepteur entraîne le passage du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. L'analyse structurale a été faite par cryo-microscopie électronique sur des particules isolées. Elle permet de mettre en évidence une structure complexe composée de plusieurs cavités dont la principale est située du côté cytoplasmique au sommet de la molécule avec une forme en L (Figure 119a).

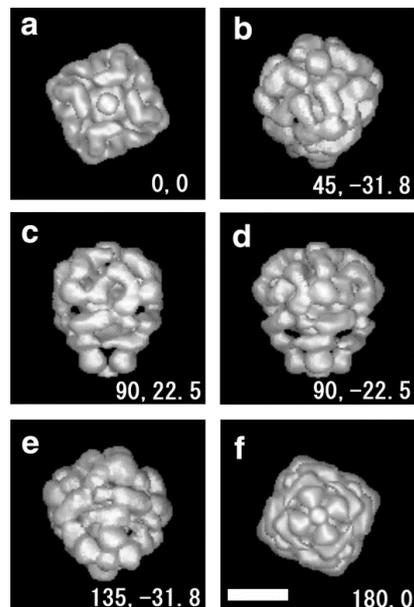


Figure 119 : Carte de densité du récepteur IP₃R1 vue sous différents angles.

De plus, il existerait une connexion entre cette structure en L et l'intérieur de la molécule. La densité de l'intérieur est quant à elle continue et montre une structure en forme de tubules.

D'après la carte tridimensionnelle du récepteur, il a été possible de déterminer le domaine transmembranaire mettant en évidence une partie cytoplasmique importante par rapport à la partie du côté de la lumière du réticulum endoplasmique. Le domaine de liaison de l'inositol triphosphate résolu par cristallographie des rayons X en présence de l'inositol triphosphate a pu être ajusté dans la carte obtenue par microscopie électronique du récepteur sans ligand au niveau de la structure en L. Suite à cet ajustement, des modifications ont été apportées sur la structure cristallographique, elles sont indiquées par des flèches sur la Figure 120. Un modèle de fonctionnement du canal a été proposé par les auteurs sur la base de l'ajustement de la structure modifiée dans leur modèle basse résolution.

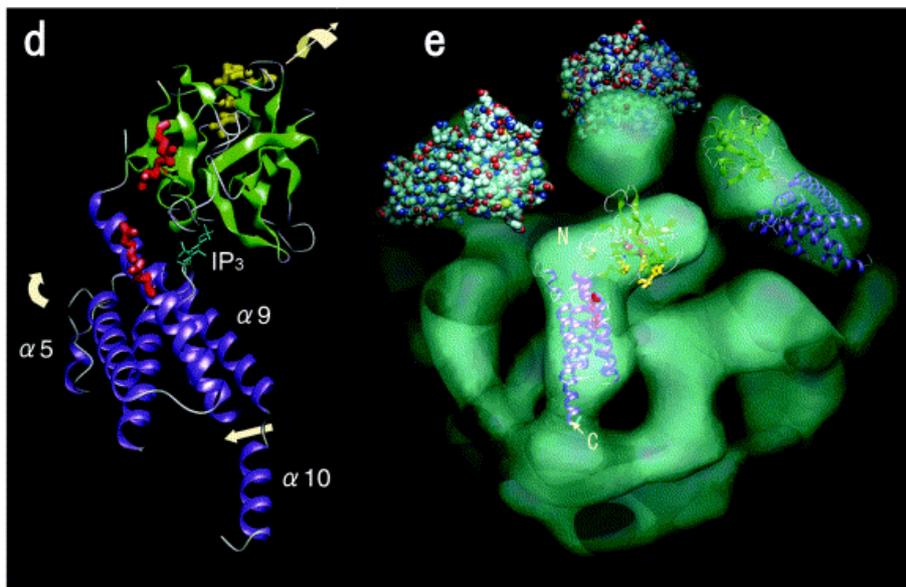


Figure 120 : Structure cristallographique du site de liaison de IP₃ (d), les flèches indiquent les modifications apportées pour l'ajustement dans l'enveloppe du récepteur obtenue par cryo-microscopie (e). (D'après Sato et al, 2004)

Annexe 2 : SAXS et cristallographie de rayons X :

Pour revue Petoukhov MV et al (2003).

La glutamate synthase (GltS) est une enzyme bactérienne de la classe des flavoprotéines contenant un complexe fer-soufre. Elle est essentielle dans le processus d'assimilation de l'ammoniaque. La partie catalytique active est formée par deux sous-unités : α (162 g/mol) et β (52.3 g/mol). La structure de la sous-unité α a été résolue auparavant par cristallographie. L'étude structurale de l'holoenzyme $\alpha\beta$ a été réalisée par diffusion aux petits angles suite aux échecs de la cristallisation tridimensionnelle. Au cours de des expériences des données ont été enregistrées pour les deux sous unités séparément puis pour l'holoenzyme. La détermination des paramètres structuraux de la sous-unité α et l'holoenzyme $\alpha\beta$ montre qu'elles forment un tétramère alors que la sous-unité β existe sous forme de monomère et dimère. La forme des molécules a été déterminée par une approche *ab initio* [Svergun et al, 1999]. La superposition des enveloppes de α_4 et de GltS indique que les deux protéines ont une structure globale similaire. Cependant, GltS présente un volume supplémentaire à sa périphérie formant ainsi un espace pour la sous-unité β (Figure 121). De plus, le modèle de β suggère qu'il s'agit d'une protéine allongée contrairement à α qui est une protéine globulaire.

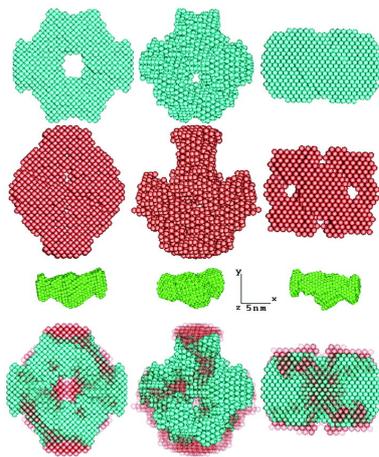


Figure 121 : Modèle à basse résolution obtenue par la méthode *ab initio* avec le programme DAMMIN. α_4 est représentée en cyan (première ligne), la GltS ($\alpha\beta$) en rouge (deuxième ligne), et β_2 en vert (troisième ligne). La superposition de α_4 et GltS est à la quatrième ligne. Les colonnes du milieu et de droite montrent les modèles après rotation de 45° et 90° selon x et y dans le sens horaire.

La modélisation de l'holoenzyme entière a été réalisée à partir des coordonnées de la structure de la sous-unité α et d'une structure similaire de la sous-unité β , le domaine N-terminal de la dihydropyrimidine déhydrogénase porcine (DPD). Le résultat de la modélisation est montré à la Figure 122. Le modèle est en accord avec les propriétés connues de la GtlS décrites dans la littérature.

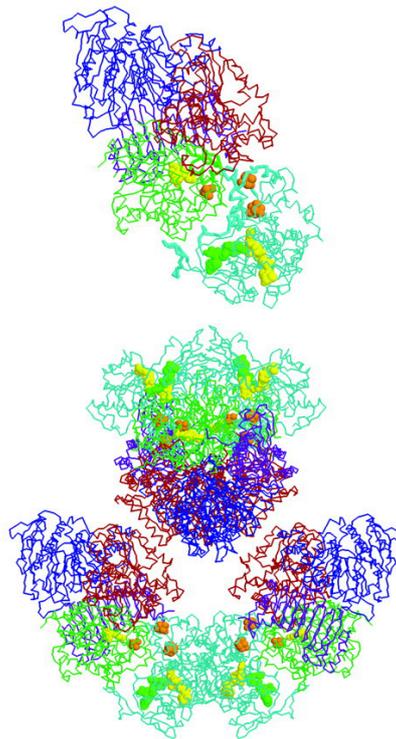


Figure 122 : Modèle de la GtlS obtenue après modélisation. En haut, est représenté le protomère $\alpha\beta$, en bas l'holoenzyme $(\alpha\beta)_4$. Les résidus de la DPD sont en cyan, ceux de la sous-unité α sont en rouge pour le domaine GAT (1-422), rouge pour le domaine central (423-780), vert pour le domaine FMN (781-1203).

Annexe 3 : Expression et purification de p47 N-His et p47 C-His

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 1mM dans les cellules BL21(DE3) à $DO_{600nm}=0,6$
- 2 : Culture pendant 4 heures à 28°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazole, anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 2 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 30 min à 45 000 rpm
- 6 : Injection du surnageant sur colonne Nickel (Qiagen) équilibrée en 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl
- 7 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 300 mM Imidazole sur 60mL.
- 8 : Les fractions contenant notre protéine sont rassemblées puis diluées trois fois avec un tampon 20mM HEPES.Na pH 7.5
- 9 : Injection sur colonne Mono S (Pharmacia) équilibrée en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5
- 10 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 20 mM HEPES .Na pH 7.5, 500 mM NaCl sur 50 mL
- 11 : Pool des fractions contenant la protéine et concentration sur membrane YM30
- 12 : Pour p47, la séquence polyhistidine de p47N-His est clivée par la thrombine : pour 10 µg de protéine, on ajoute 0,025 unité de thrombine. La digestion se fait à 4°C sur la nuit.
- 13 : Injection de l'échantillon sur chromatographie d'exclusion (Superdex 200, Pharmacia)
- 14 : Éluion dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 310 mM NaCl
- 15 : Les fractions contenant p47 sont rassemblées et concentrées sur membrane YM10

Annexe 4 : Expression et purification de GST-p47

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 0.5mM dans les cellules BL21(DE3)pLysS à $DO_{600nm}=0,6$
- 2 : Culture pendant 20 heures à 20°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 50 mM Tris.HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, cocktail d'anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 2 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 30 min à 45 000 rpm
- 6 : Injection du surnageant sur colonne Glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia) équilibrée en 50 mM Tris.HCl pH8, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM DTT.
- 7 : Éluion par un tampon 50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM glutathion réduit, 100 mM NaCl sur 50 mL
- 8 : Les fractions contenant notre protéine sont rassemblées puis la séquence GST est clivée par la Precision (Amersham Biosciences) pour 40 mg de protéine, on ajoute 70 unités de protéase, à 4°C pendant 4 heures.
- 9 : Injection sur colonne Mono S (Pharmacia) équilibrée en tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM DTT.
- 10 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 50 mM HEPES .Na pH 8, 500 mM NaCl 1 mM EDTA, 2 mM DTT sur 40 mL.
- 11 : Pool des fractions contenant la protéine et concentration sur membrane YM30

Annexe 5 : expression et purification de MBP-p47 N-His

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 0,5mM dans les cellules BL21(DE3) à $DO_{600nm}=0.6$
- 2 : Culture pendant 20 heures à 16°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 50 mM Tris.HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, cocktail d'anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 2 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 30 min à 45 000 rpm
- 6 : Injection du surnageant sur colonne amylose (Biolabs) équilibrée en 50 mM Tris.HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT
- 7 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 50 mM Tris.HCl pH 8, 100 mM NaCl, 100 mM maltose.
- 8 : Coupure de la séquence MBP par le facteur XA (Novagen) (0,1 unité pour 50 µg de protéine) à 4°C sur la nuit
- 9 : Injection sur colonne Nickel (Qiagen) équilibrée en tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 50 mM NaCl,.
- 10 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 50 mM HEPES .Na pH 8, 50 mM NaCl, 500 mM Imidazole sur 100 mL.
- 11 : Pool des fractions contenant la protéine et concentration sur membrane YM30
- 12 : Injection de l'échantillon sur chromatographie d'exclusion (Superdex 75, Pharmacia)
- 14 : Éluion dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl, 5% glycérol
- 15 : Les fractions contenant p47 sont rassemblées et concentrées sur membrane YM30

Annexe 6 : expression et purification de p47 Cter N-His et p47 Cter C-His

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 0.5mM dans les cellules BL21(DE3) à $DO_{600nm}=0.6$
- 2 : Culture pendant 4 heures à 28°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazole, anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 2 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 30 min à 45 000 rpm
- 6 : Injection du surnageant sur colonne Nickel (Qiagen) équilibrée en 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl
- 7 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 300 mM Imidazole sur 60mL
- 8 : Les fractions contenant notre protéine sont rassemblées puis diluées trois fois avec un tampon 20mM HEPES.Na pH 7.5
- 9 : Injection sur colonne SP-Sepharose (Pharmacia) équilibrée en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5
- 10 : Elution par un gradient linéaire de 0 à 100% de tampon 20 mM HEPES.Na pH7.5, 500 mM NaCl sur 30mL
- 11 : les fractions contenant notre protéine sont rassemblées et concentrées sur membrane YM10
- 12 : Injection sur une chromatographie d'exclusion (Superdex 200, Pharmacia)
- 13 : éluion avec un tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT
- 14 : Pool de fractions contenant notre protéine et concentration sur membrane YM10

Annexe 7 : expression et purification de p67

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 0.5mM dans les cellules BL21(DE3)pLysS à $DO_{600nm}=0.6$
- 2 : Culture pendant 20 heures à 16°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 50 mM Tris.HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM DTT, anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 3 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 40 min à 40 000 rpm
- 6 : Incubation sur la nuit à 4°C du surnageant sur des billes de Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) équilibrée en 50 mM Tris.HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM DTT.
- 7 : Éluion avec un tampon 50 mM Tris.HCl pH 8, 300 mM NaCl.
- 8 : Les fractions contenant notre protéine sont rassemblées puis digérées avec la protéase Precision (Amersham Biosciences) pendant 4 heures à 4°C
- 9 : Injection de l'échantillon sur colonne Mono Q (Pharmacia) équilibrée en tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2mM DTT.
- 10 : Elution par un gradient linéaire de 0 à 100% en tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 2 mM DTT sur 50 mL.
- 11 : Les échantillons contenant notre protéine sont rassemblées et concentrées sur membrane YM 30
- 12 : Injection sur une chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 (Pharmacia)
- 13 : Elution dans un tampon 50 mM HEPES.Na pH 8, 100 mM NaCl.
- 14 : Pool des fractions contenant p67 et concentration sur membrane YM 30.

Annexe 8 : expression et purification de p67 TPR et p67 Nter

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 1mM dans les cellules BL21(DE3) à $DO_{600nm}=0.6$
- 2 : Culture pendant 4 heures à 28°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazole, anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 2 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 30 min à 45 000 rpm
- 6 : Injection du surnageant sur colonne Nickel (Qiagen) équilibrée en 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl
- 7 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 300 mM Imidazole sur 50mL
- 8 : Les fractions contenant notre protéine sont rassemblées puis diluées trois fois avec un tampon 20mM HEPES.Na pH 7.5
- 9 : Injection sur colonne SP Sepharose (Pharmacia) équilibrée en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5
- 10 : Elution par un gradient de 0 à 100% en tampon 20 mM HEPES.Na pH 7.5, 1M NaCl sur 50 mL
- 11 : les fractions contenant la protéine sont rassemblées et concentrées sur membrane YM 10.

Annexe 9 : expression et purification de p40 Cter

- 1 : Induction de l'expression par IPTG 1mM dans les cellules C41(DE3) à $DO_{600nm}=0.6$
- 2 : Culture pendant 20 heures à 15°C
- 3 : Reprise du culot dans le tampon 50 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, cocktail d'anti-protéases.
- 4 : Lyse des cellules par sonication : 2 cycles de 1 min à 40%
- 5 : Ultracentrifugation pendant 30 min à 45 000 rpm
- 6 : Injection du surnageant sur colonne Nickel (Qiagen) équilibrée en 50 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl
- 7 : Éluion par un gradient linéaire de 0 à 100 % en tampon 50 mM HEPES.Na pH 7.5, 250 mM NaCl, 500 mM Imidazole sur 100 mL.
- 8 : Les fractions contenant notre protéine sont rassemblées puis diluées trois fois avec un tampon 20mM HEPES.Na pH 7.5
- 9 : Coupure de la séquence polyhistidine par le facteur XA (Novagen) à 4°C sur la nuit
- 10 : concentration de l'échantillon et injection sur une chromatographie d'exclusion de type Superdex 75
- 11 : Elution dans un tampon 50 mM HEPES.Na pH 7.5, 30 mM NaCl.

Bibliographie

Ago, T., R. Takeya, et al. (2001). "The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module." Biochem Biophys Res Commun **287**(3): 733-8.

Avila-Sakar A.J., C. W. (1996). "Visualization of beta-sheets and chain clusters in two-dimensional periodic arrays of streptavidin on phospholipid monolayers by electron crystallography." Biophys J **70**: 57-68.

Baumeister W., H. M. (1978). "Principles and Techniques of Electron Microscopy : Biological applications." Van Nostrand Reinhold CO., New York **8**: 1.

Blankenburg, R., P. Meller, et al. (1989). "Interaction between biotin lipids and streptavidin in monolayers: formation of oriented two-dimensional protein domains induced by surface recognition." Biochemistry **28**(20): 8214-21.

Blokzijl, W. E., J. B. F. N (1993). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **32**: 1545-1579.

Bravo, J., D. Karathanassis, et al. (2001). "The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate." Mol Cell **8**(4): 829-39.

Brisson, A. Olofsson A., (1994). "Two-dimensional crystallization of proteins on planar lipid films and structure determination by electron crystallography." Biol. Cell. **80**: 221-228.

Brisson, A. Bergsma-Schutter W., Oling F., Lambert O., Reviakine I. (1999). "Two-dimensional crystallization of proteins on lipid monolayers at the air-water interface and transfer to an electron microscopy." Journal of Crystal Growth **196**: 456-470.

Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **54** (Pt 5): 905-21.

Calvert T. L., Leckband, D. (1997). "Two-Dimensional Protein Crystallization on Solid Supports." Langmuir **13**: 6737-6745.

Celia, H., L. Hoermann, et al. (1994). "Three-dimensional model of Escherichia coli gyrase B subunit crystallized in two-dimensions on novobiocin-linked phospholipid films." J Mol Biol **236**(2): 618-28.

Courty, S. L., L.; Martel, L.; Lenne, P.F.; Balavoine, F.; Dischert, W.; Konovalov, O.; Mioskowski, C.; Legrand, J.F.; Vénien-Bryan, C. (2002). "Two-dimensional crystallization of a His-tagged protein on monolayers of fluidity-enhanced Ni²⁺-chelating lipids." Langmuir **18**: 9502-9512.

Courty, S. (2001). "Solides bidimensionnels à l'interface air-eau : mesures mécaniques et optiques." Thèse de l'Université Joseph Fourier.

Dang, P. M., A. R. Cross, et al. (2001). "Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3001-5.

Dang, P. M., A. R. Cross, et al. (2002). "Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4262-5.

Darst, S. A., H. O. Ribi, et al. (1988). "Two-dimensional crystals of Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme on positively charged lipid layers." J Mol Biol **203**(1): 269-73.

Das, A. K., P. W. Cohen, et al. (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." Embo J **17**(5): 1192-9.

de Mendez, I., A. G. Adams, et al. (1996). "Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in whole cells." Embo J **15**(6): 1211-20.

Diebold, B. A. and G. M. Bokoch (2001). "Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase." Nat Immunol **2**(3): 211-5.

Dietrich, C., L. Schmitt, et al. (1995). "Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9014-8.

Drubin, D. G., J. Mulholland, et al. (1990). "Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I." Nature **343**(6255): 288-90.

Dubochet, J., M. Adrian, et al. (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." Q Rev Biophys **21**(2): 129-228.

Dubuisson J.M., D. T., vachette P. (1997). "Improved Signal-to-Background Ratio in Small-Angle X-ray Scattering Experiments with Synchrotron Radiation using an Evacuated Cell for Solutions." J Appl. Cryst **30**: 49-59.

Dusi, S., M. Donini, et al. (1996). "Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox." Biochem J **314** (Pt 2): 409-12.

Ebisu, K., T. Nagasawa, et al. (2001). "Fused p47phox and p67phox truncations efficiently reconstitute NADPH oxidase with higher activity and stability than the individual components." J Biol Chem **276**(27): 24498-505.

English, J. M., C. A. Vanderbilt, et al. (1995). "Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms." J Biol Chem **270**(48): 28897-902.

Fuchs, A., M. C. Dagher, et al. (1995). "Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system." J Biol Chem **270**(11): 5695-7.

Grener, H. (1959).

Grizot, S., F. Fieschi, et al. (2001a). "The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease." J Biol Chem **276**(24): 21627-31.

Grizot, S., N. Grandvaux, et al. (2001b). "Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox." Biochemistry **40**(10): 3127-33.

Groemping, Y., K. Lapouge, et al. (2003). "Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase." Cell **113**(3): 343-55.

Guinier, F. (1955).

Hammarstrom, M., N. Hellgren, et al. (2002). "Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in Escherichia coli." Protein Sci **11**(2): 313-21.

Han, C. H., J. L. Freeman, et al. (1998). "Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox)." J Biol Chem **273**(27): 16663-8.

Haniu, M., L. O. Narhi, et al. (1993). "Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): cross-linking with disuccinimidyl esters and identification of the interfacing domains in EPO." Protein Sci **2**(9): 1441-51.

Hata, K., T. Ito, et al. (1998). "Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. Implication for regulatory Src homology 3 domain-mediated interactions." J Biol Chem **273**(7): 4232-6.

Heyworth, P. G., A. R. Cross, et al. (2003). "Chronic granulomatous disease." Curr Opin Immunol **15**(5): 578-84.

Hiroaki, H., T. Ago, et al. (2001). "Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain." Nat Struct Biol **8**(6): 526-30.

Ito, T., Y. Matsui, et al. (2001). "Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions." Embo J **20**(15): 3938-46.

Kabsch W. (1993). "Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants." J. Appl. Cryst., **26**: 795-800.

Kanai, F., H. Liu, et al. (2001). "The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K." Nat Cell Biol **3**(7): 675-8.

Karathanassis, D., R. V. Stahelin, et al. (2002). "Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction." Embo J **21**(19): 5057-68.

Koga, H., H. Terasawa, et al. (1999). "Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase." J Biol Chem **274**(35): 25051-60.

Kornberg, R. D. D., S. A. (1991). Curr. Opin. Struct. Biol. **1**: 642-646.

Kroger, D., M. Liley, et al. (1999). "Immobilization of histidine-tagged proteins on gold surfaces using chelator thioalkanes." Biosens Bioelectron **14**(2): 155-61.

Kubalek, E. W., S. F. Le Grice, et al. (1994). "Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel-chelating lipid." J Struct Biol **113**(2): 117-23.

Kuribayashi, F., H. Nuno, et al. (2002). "The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase." Embo J **21**(23): 6312-20.

Levy D., Chami M., (2001), "Two-dimensional crystallization of membrane proteins : the lipid layer strategy." FEBS letter **504** (3) : 187-193

Lapouge, K., S. J. Smith, et al. (2002). "Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox." J Biol Chem **277**(12): 10121-8.

Lapouge, K., S. J. Smith, et al. (2000). "Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP." Mol Cell **6**(4): 899-907.

Lebeau, L., S. Nuss, et al. (1999). "Self-assembly of soluble proteins on functionalized lipid layers: a tentative correlation between the fluidity properties of the lipid film and protein ordering." Chem Phys Lipids **103**(1-2): 37-46.

Leckband, T. C. a. D. (1997). "Two-Dimensional Protein Crystallization on Solid Supports." Langmuir **13**: 6737-6745.

Lopes, L. R., M. C. Dagher, et al. (2004). "Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase." Biochemistry **43**(12): 3723-30.

Marquez, J. A., C. I. Smith, et al. (2003). "Conformation of full-length Bruton tyrosine kinase (Btk) from synchrotron X-ray solution scattering." Embo J **22**(18): 4616-24.

Martel L., (2002). "Méthodes d'analyse de surface appliquées à l'étude des protéines d'adhérence cellulaire." Thèse de l'Université Joseph Fourier.

Massenet, C. (2002). "Etude des interactions entre les facteurs cytosoliques p40phox et p67phox du complexe de la NADPH oxydase." Thèse de l'Université Joseph Fourier.

Mosser, G., V. Mallouh, et al. (1992). "A 9 Å two-dimensional projected structure of cholera toxin B-subunit-GM1 complexes determined by electron crystallography." J Mol Biol **226**(1): 23-8.

Nuss, S., C. Mioskowski, et al. (1999). "Synthesis of new fluidity-enhanced amphiphilic compounds for soluble protein two-dimensional crystallization purpose." Chem Phys Lipids **103**(1-2): 21-35.

Otwinowski, Z., and W. Minor. (1997). "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Methods Enzymol **276**: 307-326.

Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." Nature **373**(6515): 573-80.

Perez, J., P. Vachette, et al. (2001). "Heat-induced unfolding of neocarzinostatin, a small all-beta protein investigated by small-angle X-ray scattering." J Mol Biol **308**(4): 721-43.

Petoukhov, M. V., D. I. Svergun, et al. (2003). "Quaternary structure of *Azospirillum brasilense* NADPH-dependent glutamate synthase in solution as revealed by synchrotron radiation x-ray scattering." J Biol Chem **278**(32): 29933-9.

Ponting, C. P. (1996). "Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains?" Protein Sci **5**(11): 2353-7.

Powell, H. R. (1999). "The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55 (Pt 10)**: 1690-5.

project, C.-C. c. (1994). "The CCP4 suite : programs for proteins crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **D50**: 760-763.

Ries-Kautt M., D. A. (1992). "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins : a practical approach." the practical approach series, Oxford University Press chap 9: 195-218.

Sathyamoorthy, M., I. de Mendez, et al. (1997). "p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain." J Biol Chem **272**(14): 9141-6.

Sato, C., K. Hamada, et al. (2004). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor contains multiple cavities and L-shaped ligand-binding domains." J Mol Biol **336**(1): 155-64.

Sumimoto, H., Y. Kage, et al. (1994). "Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5345-9.

Svergun, D. I. (1999). "Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing." Biophys J **76**(6): 2879-86.

Svergun, D. I., M. V. Petoukhov, et al. (2001). "Determination of domain structure of proteins

from X-ray solution scattering." Biophys J **80**(6): 2946-53.

Svergun, D. I. (1992). "Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria." J. Appl. Crystallogr. **25**: 495-503.

Svergun, D. I., Volkov, V.V., Kozin, M.B. & Stuhrmann H.B (1996). "New Developments in Direct Shape Determination from Small-Angle Scattering. 2. Uniqueness." Acta Crystallogr A **52**: 419-426.

Svergun, D. I., S. Richard, et al. (1998). "Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2267-72.

Terasawa, H., Y. Noda, et al. (2001). "Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif." Embo J **20**(15): 3947-56.

Tsunawaki, S., H. Mizunari, et al. (1994). "A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox." Biochem Biophys Res Commun **199**(3): 1378-87.

Uzgiris, E. E. and R. D. Kornberg (1983). "Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen-antibody-complement complexes." Nature **301**(5896): 125-9.

Venien-Bryan, C., P. F. Lenne, et al. (1998). "Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy." Biophys J **74**(5): 2649-57.

Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." Cell Mol Life Sci **59**(9): 1428-59.

Wilson, M. I., D. J. Gill, et al. (2003). "PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62." Mol Cell **12**(1): 39-50.

Wishart, M. J., G. S. Taylor, et al. (2001). "Phoxy lipids: revealing PX domains as

phosphoinositide binding modules." Cell **105**(7): 817-20.

Xu, Y., L. F. Seet, et al. (2001). "The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling." Biochem J **360**(Pt 3): 513-30.

Yoshinaga, S., M. Kohjima, et al. (2003). "The PB1 domain and the PC motif-containing region are structurally similar protein binding modules." Embo J **22**(19): 4888-97.

Young, M. M., N. Tang, et al. (2000). "High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5802-6.

Yu, L., M. T. Quinn, et al. (1998). "Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7993-8.

Yuzawa, S., K. Ogura, et al. (2004). "Solution structure of the tandem SH3 domains of p47phox in an autoinhibited form." J Biol Chem.

