



**HAL**  
open science

**Formation, cristallogenèse et détermination de la structure tridimensionnelle, d'un dérivé phosphorylé covalent stable, de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique.**

Franck Delavoie

► **To cite this version:**

Franck Delavoie. Formation, cristallogenèse et détermination de la structure tridimensionnelle, d'un dérivé phosphorylé covalent stable, de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2003. Français. NNT : . tel-00364640

**HAL Id: tel-00364640**

**<https://theses.hal.science/tel-00364640>**

Submitted on 26 Feb 2009

**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.

## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

**Biophysique**

Présentée par

**M<sup>r</sup> Franck DELAVOIE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'UNIVERSITE PARIS 6**

Sujet

**Formation, cristallogenèse et détermination de la structure tridimensionnelle, d'un dérivé phosphorylé covalent stable, de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique.**

Thèse dirigée par Jean-Jacques LACAPERE

Soutenue le 1<sup>er</sup> décembre 2003 devant le jury composé de :

M <sup>r</sup> Jean DELETTRE	Président
M <sup>r</sup> Philippe DETERRE	Rapporteur
M <sup>r</sup> Pierre FALSON	Rapporteur
M <sup>r</sup> Nicolas BOISSET	Examineur
M <sup>r</sup> Jean-Jacques LACAPERE	Directeur de thèse

## Avant-propos

Au cours de cette thèse, deux sujets d'études ont été traités. Le premier et le plus développé, concerne une ATPase de type P, l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA). Les travaux conduits avaient pour but : a) la formation d'un dérivé phosphorylé covalent stable de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  ; b) la cristallisation de ce dérivé phosphorylé ; c) la détermination de la structure tridimensionnelle par cryomicroscopie électronique de ce dérivé phosphorylé. Le manuscrit est divisé en quatre parties principales. La première partie (INTRODUCTION) est une présentation des connaissances actuelles sur les ATPases ioniques, les ATPase de type P puis de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA). La deuxième partie (MATERIELS ET METHODES) résume les techniques et les moyens utilisés pour réaliser ce travail. La troisième partie (RESULTATS) est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre concerne les études publiées sur la formation d'un dérivé phosphorylé covalent de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  que j'ai reproduit et complété. Le second chapitre concerne la cristallisation de ce dérivé phosphorylé, dont la grande partie des résultats a été obtenue pendant mon DEA. Enfin, le troisième chapitre concerne l'obtention et l'étude de la structure 3D de ce dérivé phosphorylé. Les DISCUSSION et PERSPECTIVES de ce travail sont ensuite développées. Ainsi, ce sujet de thèse est la suite logique de mon DEA de biophysique moléculaire, qui traitait de la formation et de la cristallisation d'un dérivé phosphorylé covalent stable de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ . Le deuxième sujet concerne le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR). Les travaux conduits avaient pour but : a) la reconstitution dans des protéoliposomes de la protéine PBR recombinante ; b) l'étude de la relation structure fonction du PBR reconstitué. Le manuscrit est divisé en trois parties principales. La première partie (INTRODUCTION) est une présentation des connaissances actuelles sur le PBR. La deuxième partie (RESULTATS) présente les résumés des deux publications parues suite à ces études. Les DISCUSSION et PERSPECTIVES de ce travail sont ensuite développées. Ce sujet m'a permis d'obtenir un financement d'un laboratoire de Georgetown University (USA), qui a duré deux ans et demi.

## SOMMAIRE

	Page
<b>Table des illustrations</b>	10
<b>Liste des abréviations</b>	15
<b>Introduction générale</b>	16
<b>Chapitre I - introduction</b>	19
<b>A. Les ATPases de type F, V et P.</b>	19
A.1 Les ATPases de type F.	19
A.2 Les ATPases de type V.	21
A.3 Les ATPases de type P.	23
<b>B. Le contrôle de l'homéostasie calcique.</b>	27
B.1 Les ATPases-Ca <sup>2+</sup> de la membrane plasmique (PMCA, PIIB-ATPase).	29
B.2 Les ATPases-Ca <sup>2+</sup> du réticulum endo/sarcoplasmique (SERCA, PIIA-ATPase).	31
<b>C. L'ATPase calcium du réticulum sarcoplasmique (SERCA1a) du muscle squelettique.</b>	35
C.1 Le muscle squelettique strié.	35
C.2 Le couplage excitation contraction et la relaxation musculaire.	38
C.3 L'ATPase calcium (SERCA1a) du réticulum sarcoplasmique.	40
C.3.1 Le mécanisme enzymatique de transport du calcium par l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	40
C.3.2 La détermination des structures des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	43
a) La structure 3D de la forme E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	43
b) La structure 3D de la forme E <sub>1</sub> Ca <sub>2</sub> de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	45
<b>Chapitre II – matériels et méthodes</b>	49
<b>A. La purification des vésicules du réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique de lapin.</b>	49
<b>B. Les études spectrophotométriques.</b>	50
B.1 La mesure de la concentration en protéine.	50
B.2 L'activité ATPasique de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	50
B.3 L'activité pNPPasique de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	51

	<b>Page</b>
<b>C. La modification de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> par des sondes fluorescentes.</b>	51
C.1 Le FITC (fluorescéine-4-isothiocyanate).	51
C.2 Le SITS (acide 4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène disulfonique).	52
C.3 La caractérisation de l'acide aminé modifié par le SITS.	53
<b>D. Les études spectrofluorimétriques.</b>	53
D.1 Le FITC (Fluorescéine-4-IsoThyoCyanate).	53
D.2 Le SITS (acide 4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène disulfonique).	54
<b>E. La phosphorylation de la FITC-ATPase par le [<sup>32</sup>P]AcP en présence de calcium.</b>	54
<b>F. L'accumulation de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> dans les vésicules de RS.</b>	55
<b>G. La formation des cristaux 2D de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>.</b>	55
G.1 L'agent cristallisant.	56
G.2 La fusion des vésicules de SR.	56
<b>H. La microscopie électronique en coloration négative.</b>	56
H.1 La préparation des échantillons.	56
H.2 La prise de photographies.	57
<b>I. L'analyse d'images de clichés de microscopie électronique en coloration négative.</b>	58
I.1 Le banc optique.	58
I.2 La digitalisation.	59
I.3 L'indexation.	59
I.4 Le filtrage.	59
I.5 Les corrections des déformations du cristal.	60
I.6 La recherche des symétries.	60
I.7 La génération des cartes de projection.	61
<b>J. La cryomicroscopie électronique.</b>	61
J.1 La préparation de l'échantillon.	61

	<b>Page</b>
J.2 La prise de photographies.	62
J.3 La digitalisation.	62
<b>K. L'analyse d'images de cryomicroscopie électronique.</b>	<b>62</b>
K.1 La détermination de la défocalisation et de l'astigmatisme.	62
K.2 Définir la distance de répétition.	63
K.3 L'indexation.	63
K.4 La correction du cristal.	63
K.5 La moyenne des données et le calcul des cartes de projection.	64
<b>L. La chromatographie sur colonne d'affinité agarose-Red120.</b>	<b>64</b>
<b>M. La trypsinisation de la FITC-ATPase.</b>	<b>65</b>
<b>Chapitre III – Résultats</b>	<b>66</b>
<b>A. La formation d'un dérivé phosphorylé covalent stable de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> marquée par le FITC.</b>	<b>66</b>
A.1 La formation d'un intermédiaire catalytique à bas niveau de fluorescence de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> modifiée par le FITC.	66
A.1.1 Le marquage de l'ATPase calcium par le FITC.	66
A.1.2 La caractérisation des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> , par les changements de l'intensité de fluorescence du FITC lié à la protéine.	66
a) La formation de l'espèce à bas niveau de fluorescence en présence d'AcP.	67
b) La formation de l'espèce à bas niveau de fluorescence en présence de Pi.	68
c) La stabilisation de l'espèce à bas niveau de fluorescence par la thapsigargine.	69
A.2 L'espèce à bas niveau de fluorescence est une forme phosphorylée covalente de la FITC-ATPase.	69
A.2.1 La phosphorylation de la FITC-ATPase par le [ <sup>32</sup> P]AcP en présence de calcium.	69
A.2.2 La phosphorylation de la FITC-ATPase par le [ <sup>32</sup> P]Pi.	70

	Page
<b>B. Le dérivé phosphorylé covalent stable ne peut pas être obtenu lorsque l'ATPase calcium est marqué par le SITS.</b>	72
B.1 Le marquage de l'ATPase calcium par le SITS.	73
B.1.1 L'inactivation de l'ATPase calcium par le SITS.	73
B.1.2 L'ATPase calcium est marquée de façon covalente et spécifique par le SITS.	73
B.1.3 Le marquage de l'ATPase calcium est suivi par les changements de fluorescence du SITS.	75
B.2 La caractérisation des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> modifiée par le SITS.	77
B.2.1 Les changements de l'intensité de fluorescence du SITS lié à la protéine.	77
B.2.2 Le transport et l'accumulation de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> par la SITS-ATPase.	78
B.2.3 La phosphorylation de l'ATPase calcium marquée par le SITS à partir de [ <sup>32</sup> P]AcP en présence de calcium.	79
<b>C. La cristallogenèse du dérivé phosphorylé covalent stable.</b>	81
C.1 La stabilité du dérivé phosphorylé covalent sur plusieurs jours.	81
C.2 La formation de cristaux 2D de type vésiculaire du dérivé EP.	81
C.3 La formation de longs tubes cristallins du dérivé phosphorylé covalent stable.	83
C.3.1 La fusion des vésicules de RS.	83
a) La recherche des conditions optimales de fusion des vésicules de RS.	83
b) L'analyse statistique des diamètres des vésicules de RS.	84
c) La fusion des vésicules de RS est améliorée en présence de décavanadate.	87
C.3.2 La formation de longs tubes cristallins du dérivé EP stable.	87
a) La formation de longs tubes cristallins de la forme E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .	87
b) La formation de longs tubes cristallins du dérivé EP stable.	89
c) L'optimisation de la cristallogenèse du dérivé EP stable.	91
<b>D. L'analyse d'images de tubes du dérivé EP stable.</b>	92
D.1 L'analyse d'images à partir de clichés de microscopie électronique de cristaux en coloration négative.	92
a) La sélection des clichés au banc optique.	93
b) La digitalisation des clichés.	94
c) L'indexation des réseaux cristallins.	95

	<b>Page</b>
d) La recherche des symétries et la génération des cartes de projections.	96
<b>D.2 L'analyse d'images à partir de clichés de cristaux obtenus par cryomicroscopie électronique.</b>	<b>98</b>
a) La sélection des clichés au banc optique.	100
b) La digitalisation des clichés.	100
c) Le choix et la préparation des images de tubes à analyser.	100
d) La distance de répétition hélicoïdale.	101
e) L'indexation du cristal hélicoïdal.	101
f) La reconstruction 3D.	103
<b>E. L'analyse structurale du dérivé EP stable.</b>	<b>106</b>
<b>F. La caractérisation biochimique du dérivé EP stable.</b>	<b>112</b>
F.1 La trypsinisation des différents intermédiaires catalytiques de la FITC-ATPase.	112
F.2 L'identification des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> par chromatographie d'affinité sur une colonne d'affinité agarose-Red120.	114
F.2.1 Les caractéristiques générales de la chromatographie de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> native et de la FITC-ATPase sur une colonne d'affinité agarose-Red120.	115
F.2.2 La chromatographie de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> native en fonction de sa conformation sur une colonne d'affinité agarose-Red120.	115
F.2.3 La chromatographie de la FITC-ATPase en fonction de sa conformation, sur une colonne agarose-Red120.	117
<b>Discussion et perspectives</b>	<b>121</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>132</b>
<b>Communications écrites</b>	<b>141</b>



## Table des illustrations

	Page
Figure 1 : Les différentes sources d'énergie utilisées par les protéines membranaires pour le transport actif.	18
Figure 2 : L'ATPase de type F.	20
Figure 3 : L'ATPase de type V.	22
Figure 4 : L'ATPase de type P.	25
Figure 5 : Les différentes voies de signalisation dépendantes du calcium.	28
Figure 6 : Un modèle topologique des PMCA.	30
Figure 7 : Un modèle topologique des SERCA.	32
Figure 8 : Les protéines membranaires régulatrices des SERCA.	33
Figure 9 : Les deux principaux inhibiteurs des SERCA.	35
Figure 10 : Du muscle à la myofibrille.	36
Figure 11 : Une représentation schématique de l'organisation structurale d'un sarcomère.	37
Figure 12 : Une représentation schématique des filaments épais et fin.	38
Figure 13 : Le couplage excitation contraction et la relaxation musculaire.	39
Figure 14 : La structure 3D de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> à 14Å de résolution dans la conformation E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .	44
Figure 15 : La structure 3D de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> dans la conformation E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .	45
Figure 16 : La formation de cristaux en multicouche de la forme E <sub>1</sub> Ca <sub>2</sub> par élimination du détergent par les Bio Beads.	47
Figure 17 : Les structures atomiques de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> déterminées par diffractions des rayons X.	48
Figure 18 : La purification des vésicules de RS.	50
Figure 19 : Les caractéristiques biochimiques de la modification de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> par le FITC.	55
Figure 20 : Les caractéristiques biophysiques du FITC.	54

	<b>Page</b>
Figure 21 : Les caractéristiques biophysiques du SITS.	55
Figure 22 : Les structures développées du FITC et du SITS.	66
Figure 23 : La formation du dérivé à bas niveau de fluorescence à partir d'AcP en présence de $\text{Ca}^{2+}$ .	67
Figure 24 : La formation du dérivé à bas niveau de fluorescence à partir de phosphate inorganique Pi en présence d'EGTA.	68
Figure 25 : La stabilité du dérivé phosphorylé obtenu à partir de $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$ en présence de calcium.	70
Figure 26 : La stabilité du dérivé phosphorylé obtenu à partir de vésicules préchargées en calcium et de $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ en présence d'EGTA.	71
Figure 27 : L'inactivation de l'activité ATPasique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ par le SITS.	73
Figure 28 : Les chromatogrammes HPLC des fragments peptidiques de la SITS-ATPase à 215 et 340 nm.	74
Figure 29 : La modification de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ par le SITS suivie par les changements de la fluorescence du SITS.	76
Figure 30 : Les changements de la fluorescence du SITS lié à la protéine aux cours du cycle catalytique.	77
Figure 31 : La cinétique d'accumulation et de libération de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ par la SITS-ATPase en présence d'AcP.	79
Figure 32 : La cinétique de phosphorylation à partir de SITS-ATPase en présence de $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$ .	80
Figure 33 : La stabilité du dérivé phosphorylé obtenu à partir de $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$ .	81
Figure 34 : Photographies de cristaux 2D de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ sous la forme EP, obtenues par microscopie électronique en coloration négative.	81
Figure 35 : Photographies de cristaux 2D de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ sous la forme EP, obtenues par microscopie électronique en coloration négative.	82
Figure 36 : Les distributions des vésicules de RS en fonction de leur diamètre.	84

	Page
Figure 37 : Un exemple d'étude statistique de la distribution des diamètres des vésicules de RS.	85
Figure 38 : L'évolution de la distribution des vésicules des trois sous-population différentes en fonction du temps d'incubation.	86
Figure 39 : Différents exemples de formation de plaques cristallines à partir de vésicules de RS.	88
Figure 40 : Grossissement des bords des plaques cristallines.	89
Figure 41 : Différents tubes cristallins de la FITC-ATPase sous la forme EP.	90
Figure 42 : La stabilité du dérivé EP obtenue à partir de [ <sup>32</sup> P]AcP	91
Figure 43 : Les TF brutes et les diagrammes de diffractions après moyenne, des tubes de la forme E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> et du dérivé EP.	94
Figure 44 : L'arrangement des molécules d'ATPases en une hélice droite sur des tubes aplatis.	95
Figure 45 : Les cartes de projections de la forme E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> et du dérivé EP stable.	97
Figure 46 : La photographie d'un tube de la forme EP stable, obtenu par cryomicroscopie électronique.	99
Figure 47 : La TF de l'image tube cristallin de la forme EP stable, obtenu par cryomicroscopie électronique.	101
Figure 48 : Une représentation schématique d'une symétrie hélicoïdale (-23,7).	102
Figure 49 : L'indexation de la TF de l'image d'un tube cristallin (-23,7) de la forme EP stable, obtenu par cryomicroscopie électronique.	103
Figure 50 : La reconstruction 3D du cristal tubulaire du dérivé EP stable.	104
Figure 51 : La structure 3D du dérivé EP à 8Å de résolution.	105
Figure 52 : La comparaison entre E <sub>1</sub> Ca <sub>2</sub> et EP.	107
Figure 53 : La comparaison entre E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> TG et EP.	108
Figure 54 : La comparaison (1) par superposition des structures 3D de EP et E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .	110
Figure 55 : La comparaison (2) par superposition des structures 3D de EP et E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .	111

	<b>Page</b>
Figure 56 : Le profil électrophorétique de la digestion trypsique de la FITC-ATPase.	113
Figure 57 : Comparaison des profils d'élution de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> native et de la FITC-ATPase sur une colonne agarose-Red120.	115
Figure 58 : Les effets de la concentration en nucléotide ou en sel sur l'élution des différentes formes de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> native.	117
Figure 59 : Les effets de la concentration en nucléotide ou en sel sur l'élution des différentes formes de la FITC-ATPase.	118
Figure 60 : La structure développée du réactif Red120 (triazine).	120
Figure 61 : La sensibilité au calcium du dérivé à bas niveau de fluorescence.	124
Figure 62 : La formation de E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> P à partir de FITC-ATPase en suivant la fluorescence du FITC.	125
Schéma 1 : Le cycle catalytique général des ATPases de type P.	27
Schéma 2 : Equilibre entre les différentes formes de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> selon son état de protonation.	33
Schéma 3 : Le cycle catalytique du transport du calcium par l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> .	41
Schéma 4 : Le cycle catalytique du transport du calcium par l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> présence d'AcP.	72
Schéma 5 : Le cycle catalytique du transport du calcium par la FITC-ATPase en présence d'AcP.	125
Tableau 1 : La taille du pixel pour une digitalisation effectuée à 1600 dpi.	59
Tableau 2 : Le séquençage du peptide marqué par le SITS.	75
Tableau 3 : Distribution des populations de vésicules de RS selon les conditions expérimentales.	87
Tableau 4 : Les paramètres des cristaux tubulaires des formes EP et E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .	98

## Table des illustrations

	<b>Page</b>
Tableau 5 : Résiduel de phase et nombre de spots en fonction de la résolution.	103
Tableau 6 : Paramètres de corrélation croisée entre la structure 3D de la forme EP et les autres structures existantes.	106
Tableau 7 : Les caractéristiques de la chromatographie d'affinité de l'ATPase-Ca <sup>2+</sup> native sur une colonne agarose-Red120.	116
Tableau 8 : Les caractéristiques de la chromatographie d'affinité de la FITC-ATPase sur une colonne agarose-Red120.	119

## Liste des abréviations

AcP :	acétyle phosphate
ADP:	adénosine diphosphate
ATP:	adénosine triphosphate
EGTA :	acide éthylène glycol-tétra acétique
FEG :	field emission gun
FITC :	fluorescéine isothiocyanate
FITC-ATPase :	ATPase-Ca <sup>2+</sup> modifiée par le FITC
KCl :	chlorure de potassium
PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCA :	acide perchlorique
Pi :	phosphate inorganique
RMN :	résonance magnétique nucléaire
SDS :	dodécyle sulfate de sodium
SITS :	acide 4-acétamido-4'-isiothiocyanatostilbène disulfonique
SITS-ATPase :	ATPase-Ca <sup>2+</sup> modifiée par le SITS
RS :	réticulum sarcoplasmique
TFA :	acide trifluoroacétique
TG :	thapsigargine
Tris :	tris-(hydroxyméthyle) aminométhane
2D :	bidimensionnelle
3D :	tridimensionnelle

# Introduction générale

La membrane plasmique des cellules procaryotes et eucaryotes ainsi que les membranes internes des cellules eucaryotes, constituent une barrière physique qui possède une perméabilité hautement sélective. Les gaz et les petites molécules, de la taille d'une molécule d'eau, peuvent traverser la membrane par **diffusion libre**. Le transport passif de ces petites molécules apolaires et polaires non chargées, s'effectue toujours en réponse à un gradient de concentration. Les molécules plus grosses et surtout polaires chargées ne traversent pas spontanément les membranes biologiques. La présence d'un canal ou d'un transporteur facilite le passage de ces molécules. C'est la **diffusion facilitée**. Le mouvement des solutés s'effectue dans le sens du gradient de concentration ou électrochimique, à une vitesse plus élevée que par simple diffusion. Les protéines canaux possèdent généralement un pore hydrophile qui traverse la membrane. Leur ouverture est étroitement régulée par différents mécanismes tels que (i) un changement du potentiel de membrane, ce sont les canaux sensibles au voltage (Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC), [1]), (ii) la fixation d'un ligand, ce sont les récepteurs canaux (récepteur à l'acétylcholine, [2]), (iii) la déformation mécanique de la cellule (canal mécano-sensible, [3]). Pour les transporteurs ou perméases, leurs changements de conformation réversibles permettent la translocation des ions ou molécules à travers la bicouche lipidique. Contrairement aux canaux ioniques, la molécule transportée se fixe préalablement sur le transporteur. Certaines protéines transportent un soluté unique à travers une membrane, ce sont les uniports. D'autres fonctionnent comme des systèmes de co-transports, dans lesquels le transfert d'un soluté dépend du transfert simultané ou consécutif d'un second soluté. Ce type de transport peut être soit unidirectionnel, ce sont les symports, soit bidirectionnel, ce sont les antiports.

Les cellules ont également besoin de protéines membranaires qui transportent certains solutés de façon spécifique et contre leur gradient de concentration ou électrochimique. C'est le **transport actif**. Les transporteurs actifs ou pompes peuvent être aussi classifiés en fonction du processus de transport : uniport, symport et antiport. Le transport actif permet à une cellule d'**absorber** de façon spécifique de nombreux substrats comme des ions, des acides aminés et des sucres. Par exemple chez les entérocytes, l'absorption des glucides s'effectue par un transport actif associé au transport du

sodium (GLUT 1 à 4, [4]) ou l'absorption de dipeptides et tripeptides par un système de transport actif alimenté via un différentiel électrochimique de proton (PEPT1 et 2, [5]).

Le transport actif permet aussi la **sécrétion** d'une grande variété de substrats, allant de petites molécules comme des ions à des macromolécules comme des drogues, des toxines animales, des protéases et des polysaccharides. Ce système "d'import-export" est généralement réalisé par les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) qui couplent le transport de solutés organiques à l'hydrolyse de l'ATP [6].

La cellule utilise aussi le transport actif pour le maintien des différences de concentrations ioniques soit entre les milieux intracellulaire et extracellulaire, soit entre les différents compartiments de la cellule. C'est le **transport actif ionique**.

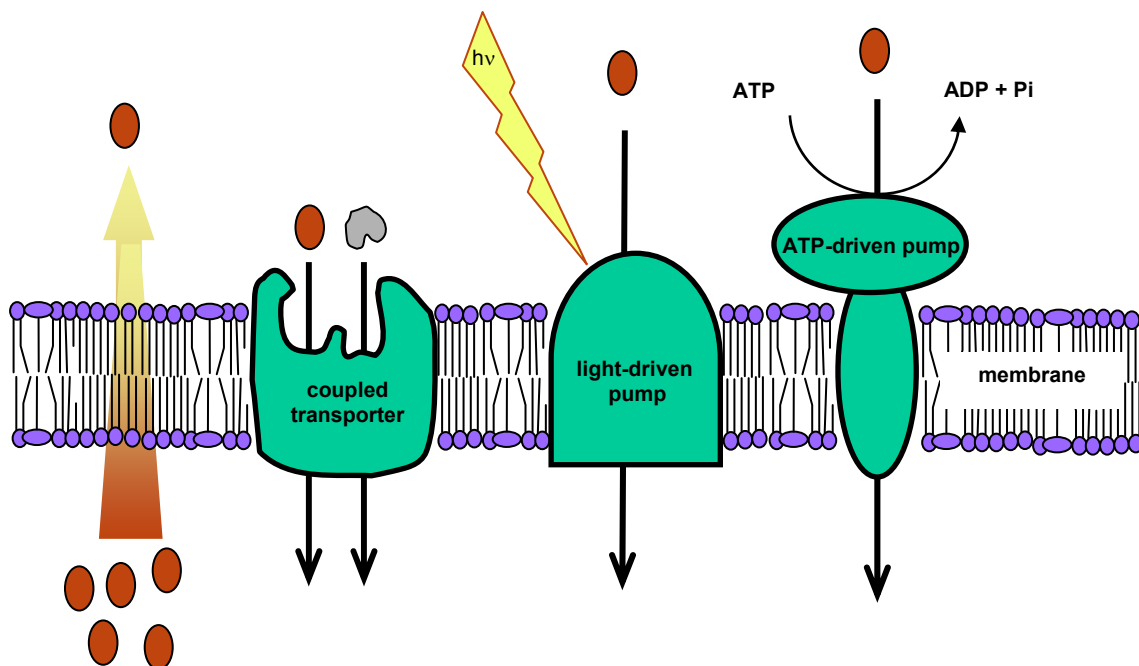
Le transport actif s'effectue toujours par l'intermédiaire d'un transporteur qui couple le pompage à une source d'énergie métabolique (Figure 1). De nombreuses protéines membranaires fonctionnent comme des systèmes de co-transport en utilisant l'énergie stockée dans les **gradients ioniques** (transport actif secondaire). Chez les bactéries et les végétaux, la plupart des systèmes de transport actif secondaire dépendent des gradients de protons (lactose perméase [7]). Dans les cellules eucaryotes, l'ion co-transporté est habituellement l'ion sodium dont le gradient électrochimique fournit la force motrice pour le transport actif d'un second ion ou molécule (échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  [8]).

D'autres protéines membranaires utilisent l'énergie de la **lumière** absorbée par un groupe prosthétique, servant de photorécepteur ou chromophore. Dans le cas de la bactériorhodopsine chez *Halobacterium halobium*, le photorécepteur est un rétinal liée de façon covalent à la protéine. Sa photoactivation (transisomérisation) induit un changement de conformation qui permet la translocation d'un proton hors de la cellule. La bactériorhodopsine transporte un proton pour chaque photon absorbé par le rétinal. Cette accumulation de protons crée un gradient à travers la membrane plasmique, qui à son tour, est utilisée pour la production d'ATP [9]. Un deuxième type de protéines membranaires photoactivables, l'halorhodopsine, transporte des ions chlorures dans le milieu



intracellulaire contre le potentiel de membrane, afin de maintenir l'équilibre osmotique pendant la croissance des cellules [10].

La dernière source d'énergie utilisée par les protéines membranaires est l'**ATP**. Son hydrolyse permet le transport actif de différents ions par des **ATPases**.



**Figure 1** : Les différentes sources d'énergie utilisées par les protéines membranaires pour le transport actif – Le transport actif de solutés est toujours orienté car il est étroitement couplé à une source d'énergie métabolique telle qu'un gradient ionique (*coupled transporter*), un photon (*light-driven pump*) ou l'hydrolyse de l'ATP (*ATP-driven pump*). Le gradient électrochimique est symbolisé par la flèche colorée de gauche.

# Chapitre I - introduction

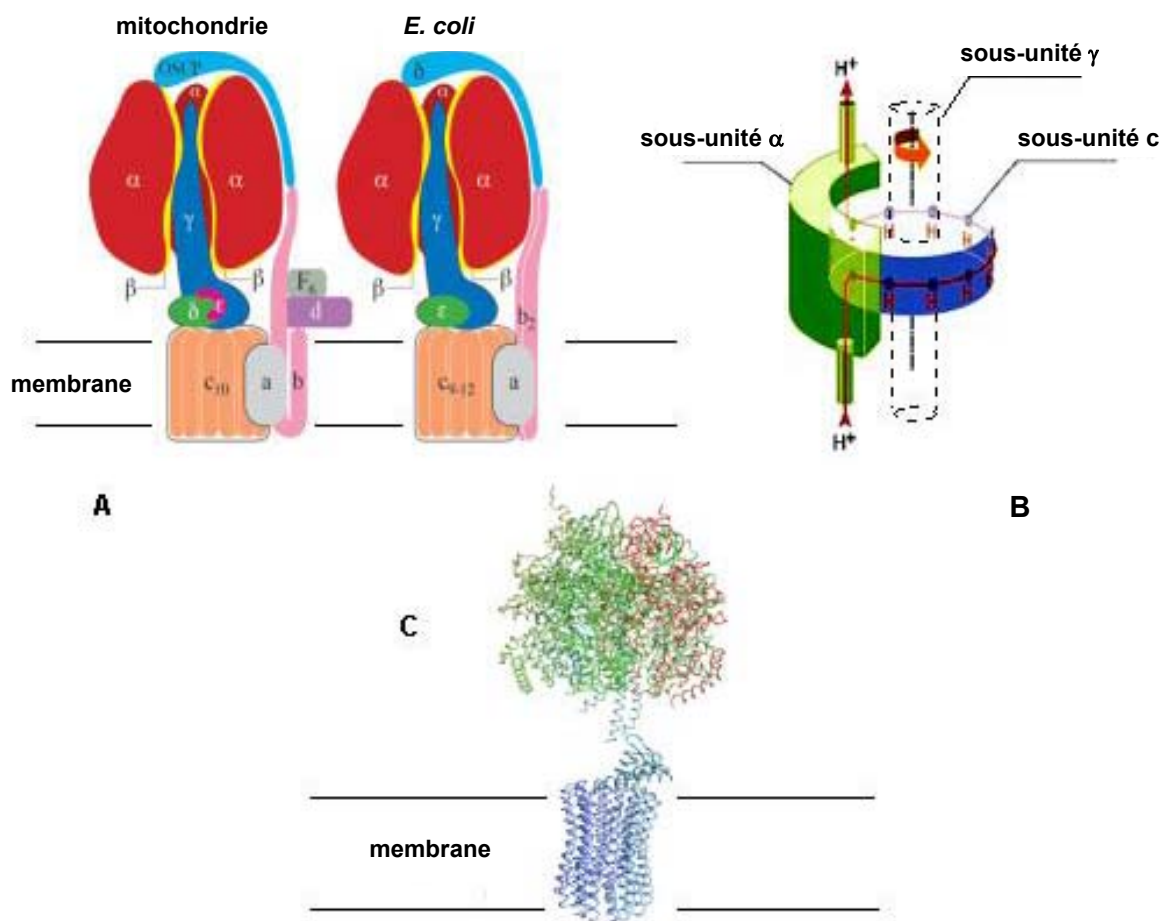
## A. Les ATPases de type F, V et P.

La superfamille des ATPases ioniques est représentée dans différents types cellulaires comme les procaryotes, les eucaryotes inférieurs, les plantes et les animaux. Ces ATPases appartiennent à la famille des hydrolases. Un regroupement et un classement ont été établis en 1987 pour obtenir trois classes majoritaires [11].

### A.1 Les ATPases de type F.

Les F-ATPases sont aussi bien localisées dans les membranes internes des mitochondries et des chloroplastes que dans la membrane plasmique des bactéries. Les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases eucaryotes qui sont composées de 16 à 18 sous-unités différentes, sont plus sophistiquées que les complexes enzymatiques bactériens qui ne possèdent que huit sous-unités différentes. Les F-ATPases possèdent un haut poids moléculaire (> 500 kDa) et sont composées de deux domaines distincts, l'un cytosolique (F<sub>1</sub>) et l'autre membranaire (F<sub>0</sub>), facilement séparable par différents traitements biochimiques. La composition en sous-unités des F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases comporte des différences mineures entre les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes, surtout au niveau de certaines petites sous-unités, ce qui génère une nomenclature confuse. Le système le plus simple est celui de *E. coli* [12]. Ainsi, l'ATPase F<sub>1</sub> est composé de cinq sous-unités selon le modèle  $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\epsilon$  et possède six sites de fixation pour les nucléotides, localisés à l'interface des sous-unités  $\alpha\beta$  (Figure 2A). Ces sites ne sont pas équivalents au cours du cycle catalytique (3 catalytiques et 3 non catalytiques): l'un fixe l'ADP et le phosphate inorganique Pi, le deuxième permet la synthèse d'ATP et le troisième est vide. Le domaine F<sub>0</sub> contient de douze à quinze sous unités transmembranaires selon le modèle  $ab_2c_9-12$  et constitue le canal à protons (Figure 2A). Ce domaine F<sub>0</sub> isolé et incorporé dans une bicouche lipidique, garde ces caractéristiques de canal à proton.

Deux inhibiteurs de la F-ATPase sont généralement employés : l'oligomycine qui se lie à l'interface entre F0 et F1 ; le dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) qui se fixe sur un résidu acide conservé dans la sous-unité c de F0 [13].



**Figure 2 : L'ATPase de type F** – (A) L'ATPase de type F est composée d'un stator et d'un rotor. Le stator est constitué des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  (domaine F1) et a (domaine F0) avec en plus des petites sous-unités comme b,d, F6 et OSCP (mitochondrie) ou b et  $\delta$  (*E. coli*). Le rotor est constitué des sous-unités c (domaine Fo),  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (domaine F1, mitochondrie) ou  $\gamma$  et  $\epsilon$  (domaine F1, *E. coli*). (B) Représentation schématique du système « rotor » de l'ATP synthase. La tige centrale tourne entre 50 et 100 fois par seconde. La rotation est produite dans F0 qui est en contact avec le pied de la tige centrale [18]. (C) La structure 3D du complexe F1c<sub>10</sub> à partir d'ATP synthase de mitochondrie de *S. cerevisiae* (PDB 1Q01 [18]).

L'observation par cryomicroscopie électronique de particules isolées a permis d'obtenir des images à basses résolutions de complexes F0/F1 d'ATPase de *E. coli* [14], de chloroplaste [15] et de mitochondrie [16]. De nombreuses structures 3D, majoritairement déterminées par diffraction des rayons X, de différents arrangements des sous-unités de F1-ATPase avec ou sans (i) différents type

de nucléotides (ADP, AMP-PNP), (ii) différents inhibiteurs, (iii) de différentes espèces, ont été obtenues. Les deux structures 3D les plus importantes sont celles (i) du domaine F1 de l'ATPase de cœur de bœuf avec  $\alpha_3\beta_3$  et une partie de la sous-unité  $\gamma$  à une résolution de 2,8Å [17], (ii) du complexe F1c<sub>10</sub> à partir de F-ATPase de mitochondrie de *S. cerevisiae*, à une résolution de 3,9 Å [18] (Figure 2C).

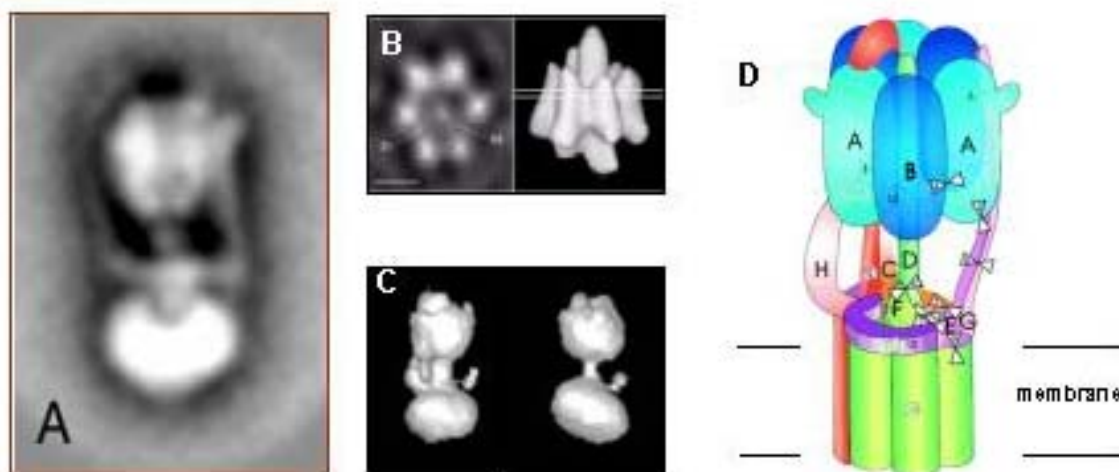
Grâce aux nombreuses études biochimiques et structurales, le mécanisme enzymatique fin de la F-ATPase commence à être compris [19]. Ce complexe protéique est considéré comme un moteur moléculaire. Il est composé d'une partie mobile, le rotor et d'une partie fixe, le stator (Figure 2B). Schématiquement, en présence d'un gradient de proton (force proton motrice), la rotation de la tige  $\gamma$  déforme les sous-unités  $\beta$  et fournit à celles-ci l'énergie nécessaire à la libération de l'ATP néo-synthétisé. Ce mouvement rotatoire est induit par le passage de protons entre le rotor et le stator dans le domaine F0, via un système de protonation-déprotonation d'un aspartate (Asp61), contenu dans chaque sous-unité c. Durant le cycle catalytique, ces ATPases ne forment pas d'intermédiaire phosphorylé covalent mais un intermédiaire avec un ATP occlus. En absence de gradient ou dans des conditions d'anaérobiose pour les F-ATPases bactériennes, la même enzyme peut effectuer son cycle catalytique à l'envers et hydrolyser de l'ATP pour pomper des protons. Toutes les F-ATPases procaryotes pompent 3 - 4 protons et/ou ions sodium (selon le système) hors de la cellule pour un équivalent ATP hydrolysé. Les F-ATPases eucaryotes pompent 3 - 4 protons hors des mitochondries ou dans les thylakoïdes des chloroplastes, pour un équivalent ATP hydrolysé. En fait, les F-ATPases peuvent être définies comme des pompes à protons particulières. Ces systèmes sont à considérer comme des ATP synthases plutôt que des ATPases.

## **A.2 Les ATPases de type V.**

Les V-ATPases sont présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. Elles sont apparentées aux ATPases de type F. Leur structure est semblable avec un domaine cytosolique V1 et intramembranaire V0 [20]. Le domaine V1 est composé de huit sous-unités différentes selon le modèle A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>CDEFG<sub>2</sub>H (Figure 3) et possède, comme les F-ATPases, une symétrie d'ordre six créée par l'alternance des sous-unités A et B. L'hexamère A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> contient trois sites de fixation de nucléotides

situés à l'interface des sous-unités. Le domaine V0, qui correspond au canal à protons, comporte trois sous-unités différentes selon le modèle  $adc_6$ . Comme pour la F-ATPase, la V-ATPase est composé d'un stator et d'un rotor [21]. L'observation par cryomicroscopie électronique de particules isolées de V-ATPases de différentes espèces, a permis de générer plusieurs structures 3D à basse résolution. (Figure 3, [22, 23]).

La V-ATPase peut être utilisée soit pour la synthèse d'ATP, soit pour pomper des protons selon les besoins. Toutefois, la fonction principale de la V-ATPase dans l'ensemble du système sécrétoire, est d'acidifier la lumière des compartiments où elle est active. Par exemple, chez les plantes cette pompe acidifie le milieu intravacuolaire et crée ainsi le gradient de protons nécessaire pour le transport actif secondaire [24]. Chez les eucaryotes, les membranes du système sécrétoire (Golgi, endosomes, lysosomes, etc.) sont dotées d'une V-ATPase. Par exemple dans le rein, en réponse à un déséquilibre du pH sanguin (acidose ou alcalose), les V-ATPases contenues dans des vésicules, peuvent changer de localisation subcellulaire en passant du pôle apical au pôle basal de la cellule [25]. Durant leur cycle catalytique, ces ATPases ne forment pas d'intermédiaire phosphorylé covalent. Les V-ATPases peuvent pomper 2 - 3 protons pour un équivalent ATP hydrolysé.



**Figure 3 : L'ATPase de type V – (A)** Image obtenue par microscopie électronique de l'ATPase de type V de la bactérie thermophile *Calorimotor fervidus* (image tirée du site web : <http://rugbe2.chem.rug.nl/projects/v-atpase.htm>). **(B)** Carte de projection (gauche) et reconstruction 3D de l'enveloppe du domaine V1 de *Manduca sexta* (droite) à partir d'études de particules isolées [22]. **(C)** Reconstruction 3D de l'ATPase de type V de plante à partir d'études de particules isolées [23]. **(D)** Représentation schématique de l'ATPase de type V de plante déduite à partir d'études biochimiques et structurales [23].

### A.3 Les ATPases de type P.

Chez les procaryotes, les P-ATPases sont localisées dans la membrane plasmique. Chez les eucaryotes, ces ATPases sont présentes dans la membrane plasmique ou la membrane du réticulum endo/sarcoplasmique. La masse moléculaire des P-ATPases procaryotes est généralement plus petite (~ 70 kDa) que celle des eucaryotes (100 – 140 kDa). Il existe de nombreuses similarités structurales et fonctionnelles au sein des P-ATPases [26]:

- Un premier domaine cytosolique protubérant qui contient les sites de fixation du nucléotide et de phosphorylation.
- Un second domaine cytosolique plus petit localisé dans la région N-terminale du polypeptide.
- Les domaines cytosoliques sont reliés à la membrane par des hélices  $\alpha$  transmembranaires, qui forment un canal à travers la bicouche lipidique.
- L'identification de motifs consensus [27]: **TGES**, localisé dans le repliement  $\alpha/\beta$  de type Rossmann.  
**DKTGT**, qui comporte l'aspartate phosphorylé.  
**GDGXNDXP**, localisé dans le domaine nucléotidique.
- Les P-ATPases forment deux intermédiaires aspartyl-phosphoryl-enzyme de haute et basse énergie dans leur cycle catalytique.
- L'inhibition de l'activité ATPasique par l'orthovanadate  $VO_4$ .

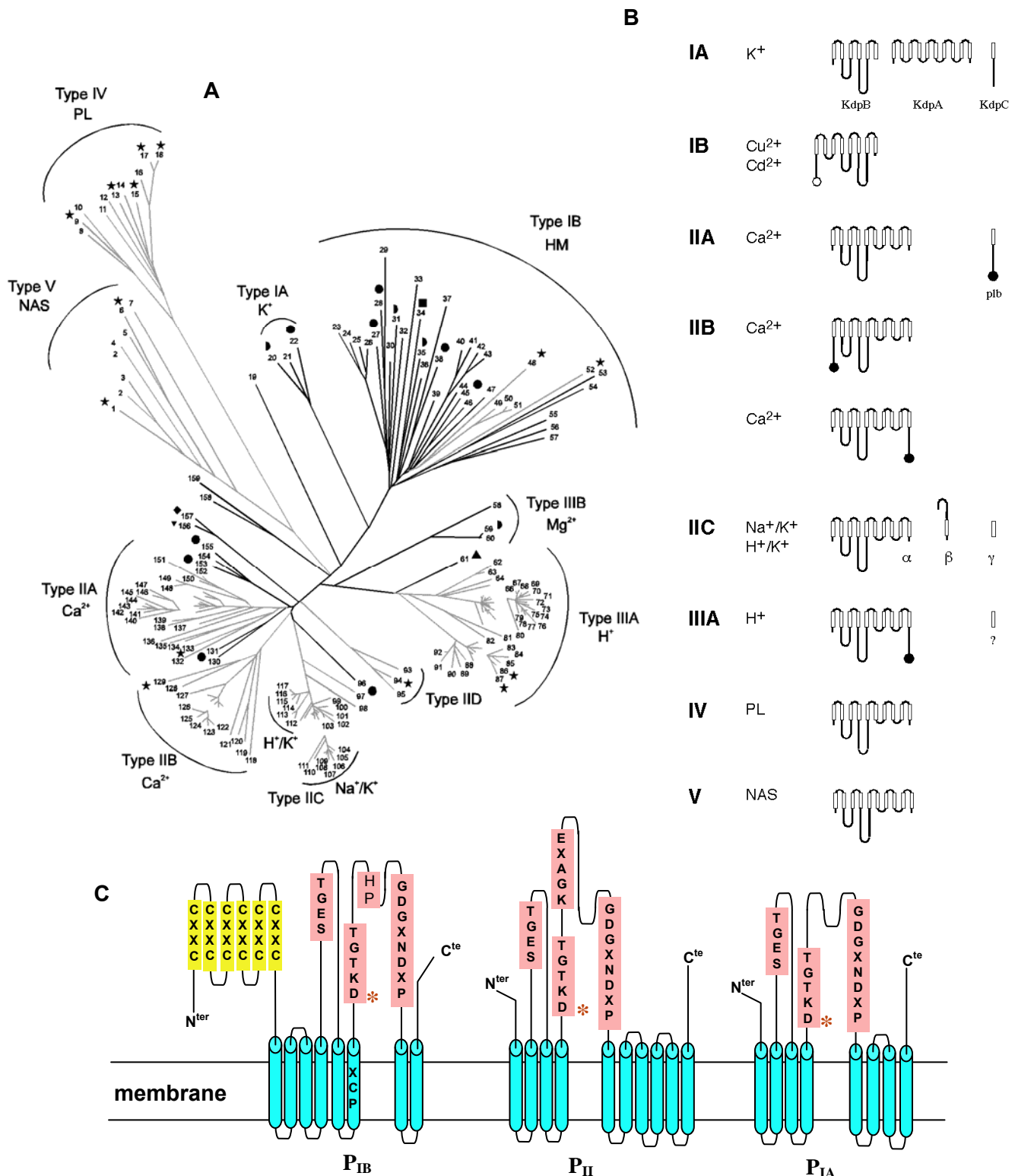
La classification phylogénique des P-ATPases a énormément changé au cours du temps [28-30]. Actuellement, les P-ATPases se divisent en cinq groupes PI-V, eux-mêmes divisés en sous-groupes A-D (Figure 4). Cette classification est fondée sur le diagramme d'hydropathie des protéines, le type d'ion transporté et les alignements de séquences consensus des P-ATPases.

Le groupe **PI** comporte la Kdp-ATPase (PIA) et les HM-ATPases (Heavy Metal-ATPase, PIB). La Kdp-ATPase transporte du potassium à travers la membrane interne de *E. Coli* [31], *Synechocystis* PCC6803 et *Mycobacterium tuberculosis* [30]. Cette ATPase présente uniquement dans les bactéries, est constituée de quatre sous-unités, A, B, C et F, produits de quatre gènes différents [31]. La sous-

unité F ne semble pas être essentielle *in vivo*. La sous-unité B correspond à une ATPase de type P tronquée avec six segments transmembranaires. Cette sous-unité participe à la fixation du potassium et à l'hydrolyse de l'ATP [31]. La sous-unité A contient douze segments transmembranaires et contribue à la fixation et la translocation du potassium. La sous-unité C permet le couplage entre les sous-unités A et B [31]. Ainsi l'hydrolyse de l'ATP sur la sous-unité B, permet le transport du potassium à travers la sous-unité A.

Les HM-ATPases transportent des métaux lourds ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  [32, 33]). Elles sont présentes dans les archaées bactériennes, les bactéries et les eucaryotes [30]. Leurs diagrammes d'hydropathie prédisent de six à huit segments transmembranaires. La région cytoplasmique N-terminale contient un motif répété de une à six fois et qui permet la fixation des métaux lourds. Ce motif correspond à la séquence consensus **GMTCXXCXXXIE** ou **[M/H]XXMDH[S/G]XM** selon les espèces [34]. Le domaine cytoplasmique le plus protubérant, situé entre le quatrième et le cinquième segment transmembranaires, contient les domaines de fixation de l'ATP et de phosphorylation, les séquences consensus **TGES**, **CPX** ainsi que le motif **SEHPL** conservés au sein de ce sous-groupe  $P_{IB}$  [34].

Le groupe **PII** contient les Ca-ATPases du réticulum sarcoplasmique (PIIA), exprimées dans les archaées bactériennes, les bactéries et les eucaryotes [30], ainsi que les ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  de la membrane plasmique (PIIB) exprimées uniquement chez les eucaryotes [30]. Ces deux types d'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  sont composés d'un seul polypeptide. Le groupe PII contient aussi des ATPases qui comportent deux sous-unités comme les H,K-ATPases (PIIC) ou trois sous-unités comme les Na,K-ATPases. La sous-unité principale (sous-unité  $\alpha$ ) contient dix hélices transmembranaires. La séquence en acides aminés des protéines de ce groupe est très conservée au niveau du domaine de fixation du nucléotide [35]. Il existe plusieurs séquences consensus propres à ce groupe PII dont **KGAXE** ( $X = P, S, V$  ou  $F$ ), qui joue un rôle important dans la fixation du nucléotide. La conservation la moins importante se situe dans le domaine transmembranaire, surtout au niveau des sites de fixation et de passage des ions [35].



**Figure 4 : L'ATPase de type P – (A)** Une représentation schématique des différentes sous-unités des groupes PI-V [30]. **(B)** L'arbre phylogénique des ATPases de type P [30]. **(C)** Une représentation schématique de quelques sous-unités  $\alpha$  d'ATPases de type P. Les cylindres représentent les hélices  $\alpha$  transmembranaires. Les encadrés jaunes correspondent aux répétitions du motif qui permet la fixation des métaux lourds. L'aspartate phosphorylé au cours du cycle catalytique est indiqué par l'étoile rouge (\*).



Le groupe **P<sub>III</sub>** contient les pompes à proton de la membrane plasmique [36] qui sont exprimées dans les archaées bactériennes, les plantes et les champignons mais pas dans les bactéries [30].

Le groupe **P<sub>IV</sub>** comporte des P-ATPases eucaryotes particulières qui semblent transporter des aminophospholipides [37].

Enfin, peu de données scientifiques existent sur le groupe **P<sub>V</sub>**. Les substrats des protéines membranaires qui appartiennent à ce sous-groupe n'ont pas été identifiés. Seul leurs séquences sont connues et elles possèderaient dix segments transmembranaires [30].

Certaines des P-ATPases sont multimériques avec une grande sous-unité  $\alpha$  qui remplit les fonctions primaires d'hydrolyse de l'ATP et de transport d'ions. Les sous-unités additionnelles semblent avoir un rôle de régulation. Ainsi, la Na,K-ATPase et la H,K-ATPase possèdent une sous-unité  $\beta$  essentielle au bon fonctionnement de l'enzyme. Cette sous-unité permet à la fois la maturation et l'adressage de l'enzyme à la membrane plasmique, ainsi qu'une activité enzymatique optimale [26]. La sous-unité  $\beta$  est liée à la sous-unité  $\alpha$  avec une stœchiométrie 1:1. Cette protéine contient approximativement 300 acides aminés et possède trois sites de glycosylation. La majorité de sa masse se trouve du côté extramembranaire [26]. La Na,K-ATPase possède une autre sous-unité en plus de la  $\beta$ . Cette sous-unité  $\gamma$  est un protéolipide qui semble être important pour la modulation par le potassium de l'activation de l'enzyme [38].

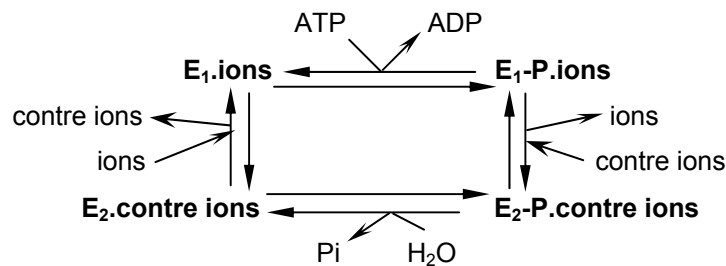
Les stœchiométries de transport ionique sont connues. Dans le cas de la Na,K-ATPase, trois ions sodium sont échangés pour deux ions potassium pour un équivalent ATP hydrolysé. La H,K-ATPase gastrique permet la translocation d'un proton contre un ion potassium. Enfin, les Ca-ATPases SERCA (cf. B.3) catalysent le transport de deux ions calcium couplé au passage de deux ou trois protons.

Tous les membres de cette famille d'ATPase ont en commun un cycle catalytique qui met en jeu la formation d'intermédiaires phosphorylés covalents de basse et haute énergie, couplés aux changements d'affinité des sites de fixation des ions de chaque côté de la membrane [26]. Dans ce cycle catalytique, les ATPases de type P existent sous deux états appelés  $E_1$  et  $E_2$  (schéma 1). L'état

$E_1$  permet la fixation des ions ( $E_1$ .ions) et il est phosphorylable par l'ATP ( $E_1$ .ions-P). La transconformation de l'état  $E_1$ .ions-P à l'état  $E_2$ .P.contre ions permet le transport et la libération des ions de l'autre côté de la membrane, en changeant l'accessibilité et l'affinité des sites de liaisons des ions. Le transporteur est alors déphosphorylé *via* l'entrée d'une molécule d'eau dans le site catalytique ( $E_2$ .contre ions) [26]. Le transport des ions est toujours couplé à celui de contre ions.

Les fonctions principales des P-ATPases sont la régulation du volume cellulaire, la création d'un potentiel de membrane, la sécrétion d'ions et le contrôle de l'homéostasie ionique dans les cellules. L'altération du gradient transmembranaire de plusieurs ions physiologiques, peut amener la cellule à l'apoptose. En particulier, de nombreuses études montrent que l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induit la mort cellulaire [39]

**Schéma 1** : Le cycle catalytique général des ATPases de type P.



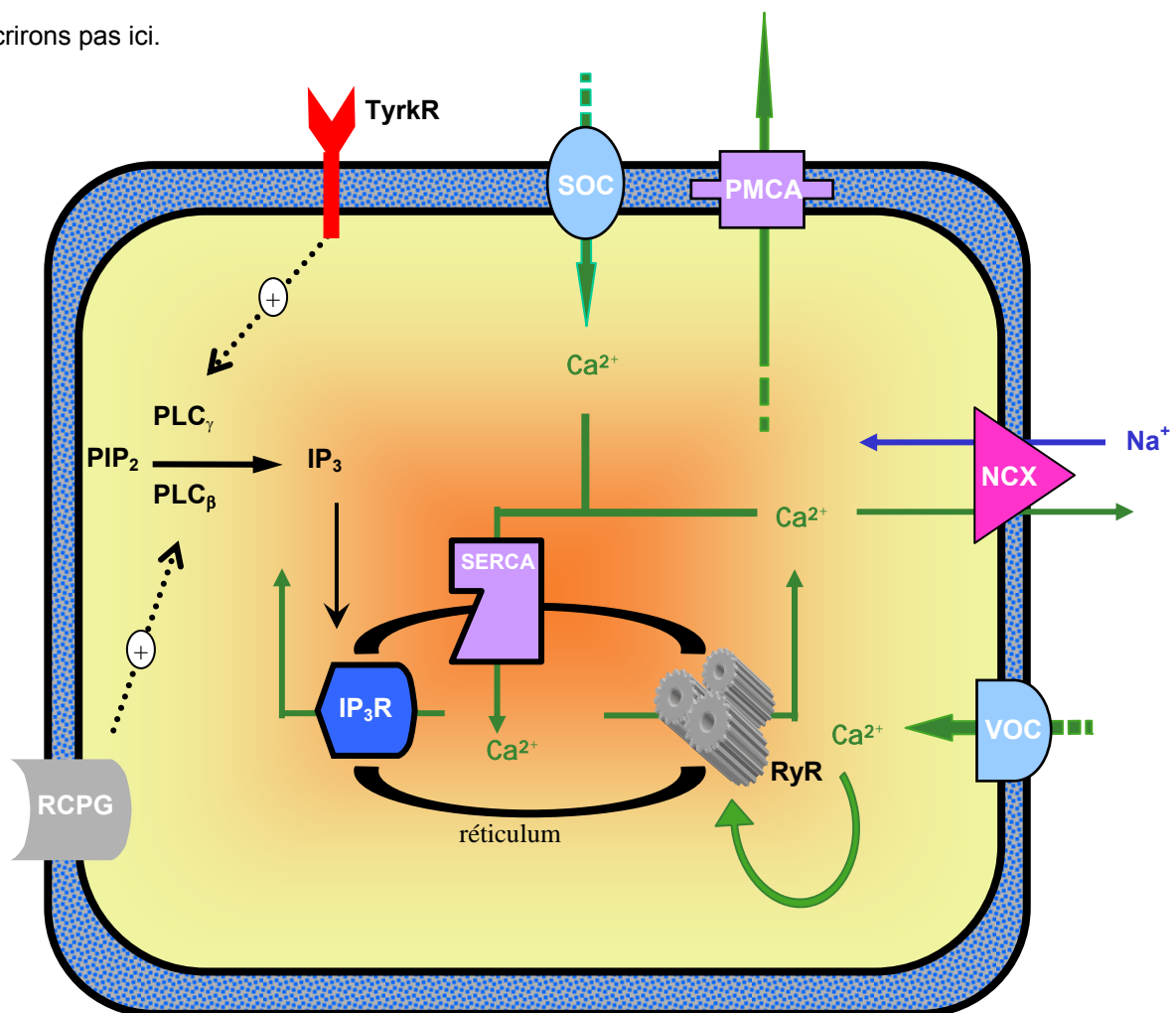
## B. Le contrôle de l'homéostasie calcique.

Le calcium agit comme un messager secondaire ubiquiste qui contrôle de nombreux processus cellulaires. Il intervient aussi bien chez les bactéries, les végétaux que les animaux pour transmettre des informations perçues au niveau de la membrane de la cellule vers les cibles intracellulaires. La signalisation calcique est toujours liée à une augmentation de la concentration en calcium interne. Le signal est caractérisé par son amplitude, sa durée et aussi par sa fréquence et son origine. Il peut durer de quelques microsecondes à plusieurs heures, peut être transitoire ou peut présenter des variations de concentration oscillatoires [40].

D'une manière générale, l'augmentation de la concentration calcique est due (Figure 5) :

- Soit à une entrée de calcium qui vient du milieu extracellulaire par l'intermédiaire de canaux calciques localisés dans la membrane plasmique (ex : SOC, VOC, NCX).

- Soit à une libération à partir des réserves internes au niveau du réticulum endo/sarcoplasmique. Cette libération fait intervenir l'activation de récepteurs canaux situés dans la membrane du réticulum (IP<sub>3</sub>R et RyR). Ces récepteurs peuvent être stimulés soit par l'IP<sub>3</sub> lors de l'activation du cycle des phosphoinositides soit par le calcium lui-même. Il existe une signalisation calcique mitochondriale, qui permet aussi de contrôler l'homéostasie calcique et que nous ne décrivons pas ici.



**Figure 5** : Les différentes voies de signalisation dépendantes du calcium – VOC : Voltage Operated Channel, RyR : Récepteur à la Ryanodine, IP<sub>3</sub>R, Récepteur IP<sub>3</sub>, TyrkR : Récepteur Tyrosine Kinase, SOC : Store Operated Channel, RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G, NCX : échangeur Ca/Na. La signalisation calcique mitochondriale n'a pas été prise en compte.

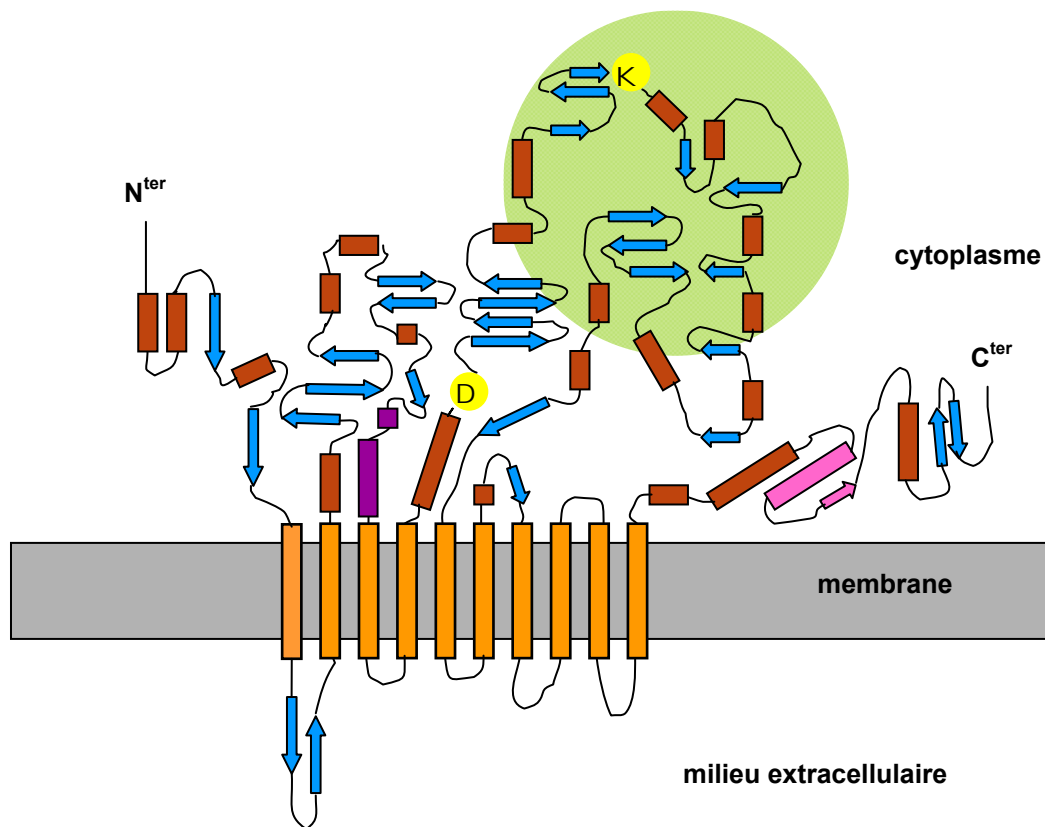
Pour une cellule non stimulée, la concentration cytoplasmique en calcium libre est de l'ordre du nanomolaire contre millimolaire du coté extracellulaire. Le gradient électrochimique est en faveur d'une entrée de calcium dans la cellule. Le maintien de l'homéostasie calcique s'effectue grâce au fonctionnement d'ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  de type PMCA (Plasmatic Membrane Ca-ATPase). De la même façon, la concentration en calcium à l'intérieur du réticulum est très élevée, de l'ordre de la centaine de micromolaire. Lors de la stimulation des récepteurs canaux situés sur le réticulum (Figure 5), le calcium sort selon le gradient de concentration. Le retour à une concentration cytoplasmique en calcium basale, c'est à dire la reconstitution des réserves, nécessite l'activation d'ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  de type SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase).

### **B.1 Les ATPases- $\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique (PMCA, PIIB-ATPase).**

La découverte chez l'érythrocyte d'un système de pompage du calcium extracellulaire dépendant de l'ATP, a permis de mettre en évidence l'existence des PMCA [41]. Ces protéines membranaires sont activées par la calmoduline, ce qui a permis de les purifier en 1979 par chromatographie à partir d'une colonne d'affinité à la calmoduline [42]. Pendant longtemps, la recherche sur les PMCA a été menée exclusivement à partir d'érythrocytes. Par la suite, les études ont été étendues sur d'autres types cellulaires, démontrant que cette protéine est ubiquitaire dans les cellules eucaryotes.

Les PMCA sont codées par une famille de 4 gènes : PMCA1-4. La distribution des isoformes PMCA1 et 4 est ubiquitaire chez les animaux, alors que les isoformes PMCA2 et 3 sont localisées essentiellement dans les cellules nerveuses. En plus de ces quatre isoformes standards, il existe une trentaine d'isoformes qui sont générées par épissage alternatif des transcrits primaires [43]. La masse moléculaire des PMCA varie entre 125 et 140 kDa. Dix segments transmembranaires ont été identifiés. Trois domaines structurés, très importants pour le bon fonctionnement de l'enzyme, sont situés du coté intracellulaire (Figure 6). Le premier est constitué de 40 acides aminés basiques et permet la liaison de phospholipides. Ces derniers stimulent l'enzyme en modifiant les vitesses maximales d'hydrolyse ( $V_{\max}$ ) et les affinités ( $K_m$ ). Le phosphoinositol pyrophosphate ( $\text{PIP}_2$ ) est l'un des stimulateurs les plus efficaces des PMCA [44]. Le deuxième domaine contient l'aspartate

catalytique situé dans le domaine de phosphorylation. Enfin, le troisième domaine, qui correspond à la partie carboxy-terminale, comporte le site de fixation de la calmoduline [45]. Dans les conditions où la concentration en calcium intracellulaire est faible, la calmoduline n'est pas fixée et l'ATPase est inactive. Ce domaine régulateur comporte aussi des sites d'interactions avec les protéines kinases A et C (phosphorylations activatrices), ainsi que les sites allostériques de fixation du calcium [45]. La principale différence entre les isoformes se situe au niveau de cette région carboxy-terminale autoinhibitrice. Les PMCA transportent uniquement un ion calcium pour un équivalent ATP hydrolysé. A l'état non stimulé, la PMCA possède une basse affinité pour le calcium ( $> 10$  mM). L'enzyme est donc inactive aux concentrations physiologiques en calcium. La fixation de la calmoduline ou de phospholipides augmentent cette affinité (0,2 - 0,3 mM) [45].



**Figure 6 : Un modèle topologique des PMCA** – Les segments transmembranaires sont illustrés par les rectangles oranges. Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont représentés respectivement par les rectangles rouges et les flèches bleues. L'aspartate phosphorylé ainsi que la lysine modifiée par le FITC est identifiée par un cercle jaune. Le site de fixation du nucléotide est représenté par le cercle vert. Les sites de fixation de la calmoduline et des phospholipides sont représentés respectivement en rose et violet. Le modèle est basé sur la séquence de PMCA4.

## **B.2 Les ATPases-Ca<sup>2+</sup> du réticulum endo/sarcoplasmique (SERCA, PIIA-ATPase).**

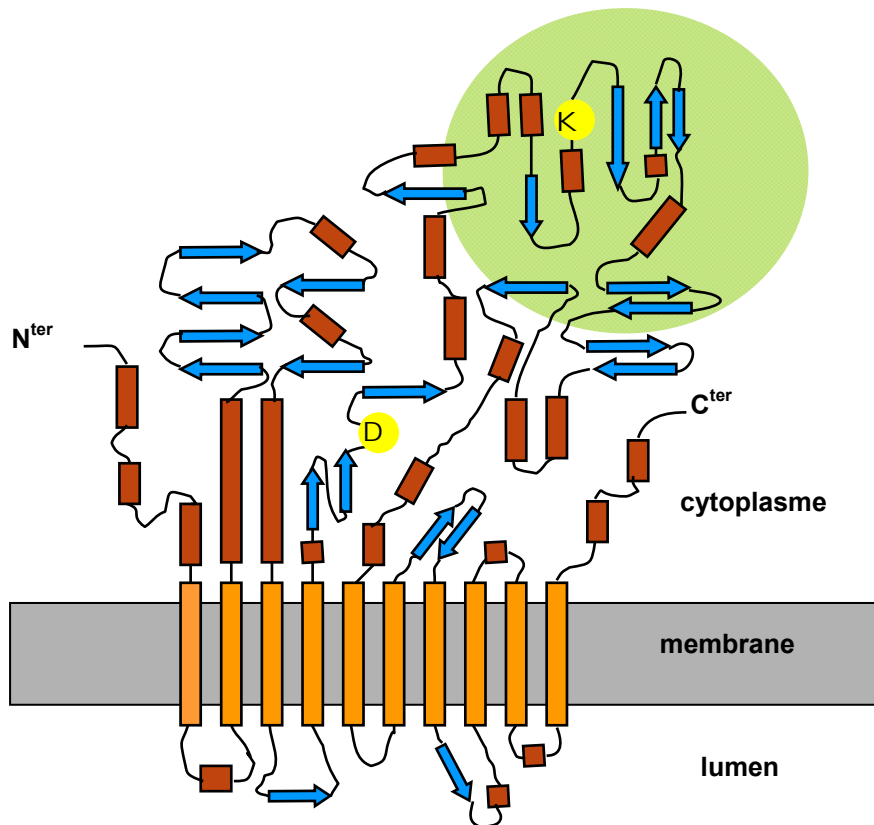
Les pompes SERCA ont été découvertes presque simultanément par deux groupes en 1961-62, après la mise en évidence que le réticulum sarcoplasmique isolé est capable d'accumuler le calcium avec hydrolyse de l'ATP [46, 47]. La pompe fut identifiée et purifiée en 1970 [48]. Plus tard, d'autres protéines membranaires qui possèdent les mêmes caractéristiques, ont été trouvées dans les cellules non-musculaires au niveau du réticulum endoplasmique [141].

Les génomes de mammifère et d'oiseau contiennent trois gènes SERCA (SERCA1-3), contrairement aux invertébrés pour lesquels, au moins jusqu'à présent, il n'existe qu'un gène SERCA par génome [49]. Ces trois gènes SERCA génèrent par épissage alternatif deux ou trois isoformes chacun. Les SERCA1a et 1b sont exprimées dans les muscles squelettiques [49]. SERCA2a est exprimée dans les muscles cardiaques et squelettiques ainsi que dans les muscles lisses [49]. SERCA2b est exprimée de façon ubiquitaire dans le réticulum endoplasmique [49]. Les isoformes SERCA3a, b et c sont exprimées dans les cellules endothéliales, dans les cellules de lignée hématopoïétique, les cellules sécrétrices et dans les neurones de Purkinje [50, 51]. SERCA2 et SERCA3 possèdent respectivement 84 % et 75 % d'identité avec SERCA1.

Les pompes SERCA comportent dix segments transmembranaires. Trois domaines structurés sont situés du côté intracellulaire (Figure 7). Les domaines de fixation du nucléotide, de phosphorylation et un domaine nommé actuator, dont la fonction n'est pas clairement caractérisée. Les séquences en acides aminés des hélices  $\alpha$  transmembranaires M4, M5, M6 et M8, impliquées dans la liaison du calcium, sont hautement conservées au sein de tous les isoformes [26]. Les pompes SERCA ne possèdent pas de sites de régulation identiques aux PMCA.

La stœchiométrie de transport des SERCA diffère de celui des PMCA dans le fait que deux ions calcium sont transportés pour un équivalent ATP hydrolysé. Toutes les isoformes possèdent une affinité ( $K_m$ ) quasi identique pour l'ATP [52]. SERCA1 et 2a possèdent la même affinité ( $K_d$ ) pour le calcium, alors que celle de SERCA2b est meilleure mais avec une vitesse maximale d'hydrolyse de

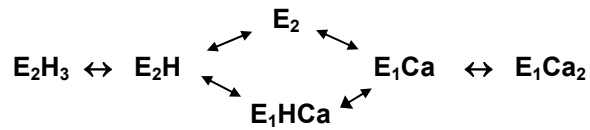
l'ATP ( $V_{max}$ ) plus petite. L'affinité ( $K_d$ ) pour le calcium de SERCA3 est trois fois inférieure aux autres SERCA mais avec une vitesse maximale d'hydrolyse de l'ATP ( $V_{max}$ ) plus grande.



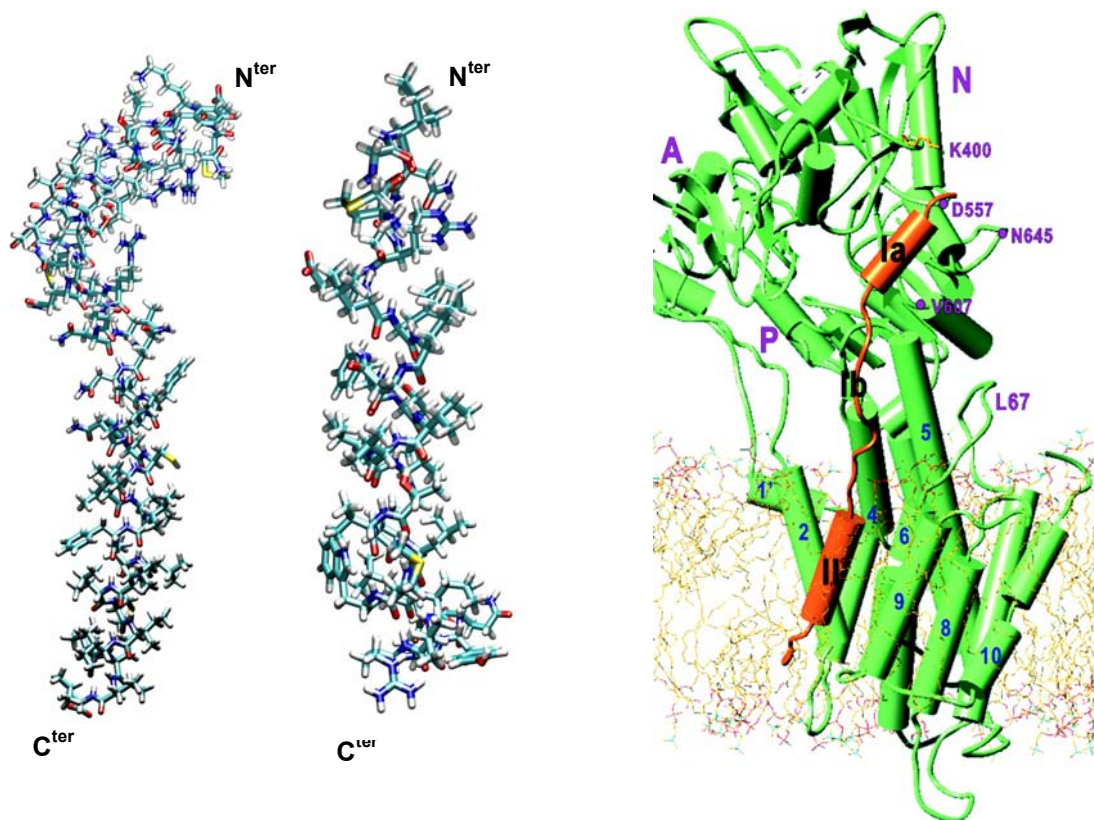
**Figure 7 : Un modèle topologique des SERCA** – Les segments transmembranaires sont illustrés par les rectangles oranges. Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont représentés respectivement par les rectangles rouges et les flèches bleues. L'aspartate phosphorylé ainsi que la lysine modifiée par le FITC sont identifiés par un cercle jaune. Le site de fixation du nucléotide est représenté par le cercle vert.

Le pompage du calcium vers le lumen du réticulum, est obligatoirement couplé avec la sortie de protons dans le cytoplasme. Ainsi, l'activité ATPasique des SERCA est dépendante du pH. Le pH intervient dans l'équilibre des différents états de la pompe comme décrit dans le schéma 2. Les SERCA1 et 2 possèdent une activité maximale à pH neutre et une inactivation à pH basique [52]. L'activité enzymatique de SERCA3 présente une dépendance au pH particulière. L'activité ATPasique est maximale à pH7,3 et décroît très rapidement à pH < 7 [53].

**Schéma 2** : Equilibre entre les différentes formes de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> selon son état de protonation [80,81].



L'activité enzymatique de SERCA2a est inhibée *in vivo* par le phospholamban, alors que SERCA1 et 2b le sont *in vitro* [54]. Cette protéine membranaire contient 52 acides aminés (Figure 8B) et est codée par le gène *pln*. Sous la forme déphosphorylée, le phospholamban interagit avec les domaines cytoplasmiques et transmembranaire de la SERCA2a, ce qui abaisse son affinité pour le calcium [55].



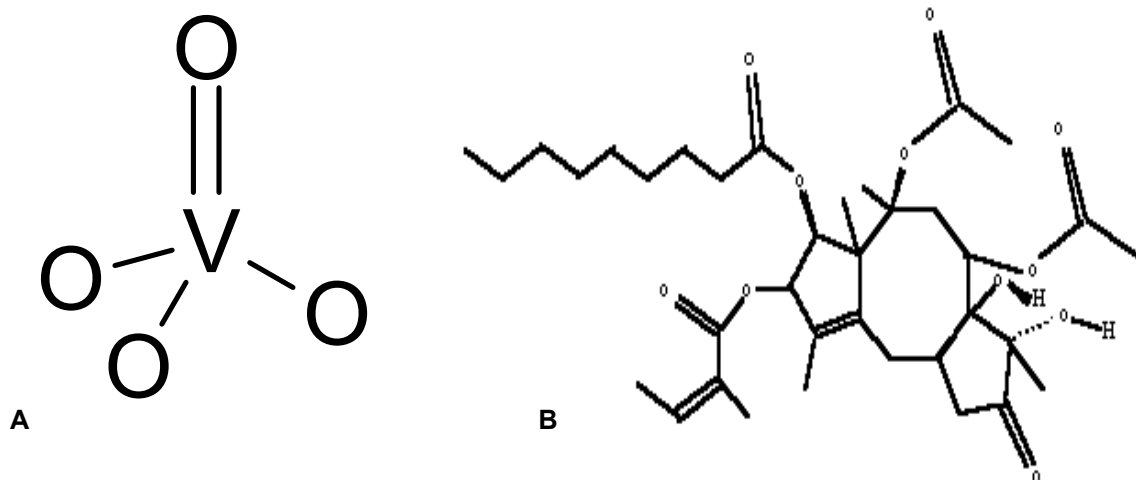
**Figure 8** : Les protéines membranaires régulatrices des SERCA – (A) La structure de la sarcolipine obtenue par RMN ([60], PDB 1JDM). (B) La structure du phospholamban obtenue par RMN [57, PDB 1FJK]. (C) Une représentation schématique de l'interaction probable entre l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> (vert) et le phospholamban (rouge) [153].



En réponse à une stimulation bêta-adrénergique, le phospholamban est phosphorylé, se polymérise en homopentamère et ne peut plus se fixer sur SERCA2a [56]. Récemment, une structure 3D vient d'être déterminée par RMN (Figure 8B, [57]). Le phospholamban possède trois domaines: un domaine cytoplasmique Ia, composé de 20 acides aminés et contient les sites de phosphorylation par la protéine kinase A et la calmoduline kinase II; un domaine Ib qui est non structuré et polaire; un domaine II qui forme la partie transmembranaire composée de 22 acides aminés hydrophobes. Il existe d'autres protéines régulatrices, ce sont les protéolipides nommés ainsi car ils se solubilisent dans un mélange chloroforme/méthanol. Un protéolipide associé à SERCA1 fut purifié et caractérisé en 1980 par le groupe de recherche de Martonosi [58]. Plus tard, ce protéolipide fut nommé sarcolipine [59]. Il est essentiellement exprimé dans les muscles squelettiques. La sarcolipine est codée par le gène *sln*. Récemment, une structure 3D vient d'être déterminée par RMN (Figure 8A, [60]). Cette protéine contient 31 acides aminés dont 19 hydrophobes et comporte une hélice  $\alpha$  transmembranaire. L'activité de la sarcolipine est contrôlée par le niveau de calcium intracellulaire. Cette protéine associée à SERCA1a, abaisse l'affinité de la pompe pour le calcium [61].

Plusieurs types d'inhibiteurs des SERCA existent. Les principaux et les plus utilisés sont l'orthovanadate  $VO_4$  et la thapsigargine. Les caractéristiques chimiques du vanadate (V) sont très proches de celles du phosphate [62]. La longueur de la liaison V-O de l'orthovanadate est approximativement de 0,17 nm, comparée à environ 0,15 nm pour la liaison P-O de l'orthophosphate  $PO_4$ . L'orthovanadate possède une géométrie bipyramidale trigonale très proche de l'état de transition de l'orthophosphate (Figure 9A), il est donc considéré comme un analogue de l'état de transition de l'orthophosphate  $PO_4$ . La fixation de l'orthovanadate sur la Ca-ATPase, en compétition avec celle de l'orthophosphate, dépend de la conformation de l'enzyme qui doit être bloquée dans la conformation  $E_2$  [63]. Il se forme un complexe cinétiquement stable  $E_2H_3VO_4$ .

La thapsigargine (TG), une molécule naturelle tirée de la *Thapsia garnica* (Figure 9B et C), est un inhibiteur non compétitif et spécifique des pompes calciques des réticulum endo/sarcoplasmique [52]. La constante d'inhibition  $K_i$  est de l'ordre du picomolaire et la stœchiométrie est de 1:1 (mole/mole) [64]. Cette molécule, qui fait partie de la famille des sesquiterpène lactone [65], empêche la fixation d'ATP et stabilise l'enzyme dans une conformation qui ne peut plus fixer de calcium [142]. La thapsigargine interagit avec la partie transmembranaire de la pompe [103].

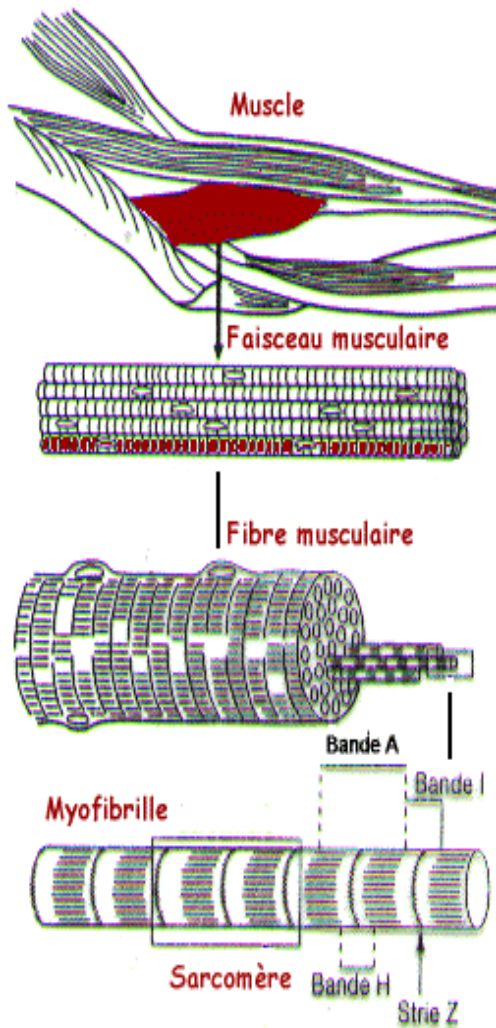


**Figure 9 : Les deux principaux inhibiteurs des SERCA – (A) La structure développée de l’orthovanadate. (B) La structure développée de la thapsigargine.**

## **C. L’ATPase calcium du réticulum sarcoplasmique (SERCA1a) du muscle squelettique.**

### **C.1 Le muscle squelettique strié.**

Le muscle squelettique est constitué de fibres musculaires. Leurs diamètres varient de 10 à 100 microns et leurs longueurs peuvent atteindre une dizaine de centimètres. Les fibres musculaires se regroupent en faisceaux qui fusionnent avec les filaments de collagène pour former les tendons. Une fibre musculaire est un ensemble de cellules dont le cytoplasme a fusionné. Les nombreux noyaux de ces cellules sont situés à la périphérie du cytoplasme, le sarcoplasme, juste sous la membrane cellulaire, le sarcolème. La fibre musculaire renferme dans son sarcoplasme les myofibrilles. Elles sont les éléments contractiles de la fibre musculaire (Figure 10). Leur diamètre est d’environ un micron et elles sont allongées d’une extrémité à l’autre de la fibre. Les myofibrilles sont groupées généralement par vingtaine et présentent une alternance régulière de bandes sombres et de bandes claires, dont la parfaite correspondance de niveau d’une myofibrille à l’autre donne à la fibre son aspect strié. Cette striation se caractérise par l’alternance régulière de disques sombres A anisotropes, d’une longueur moyenne de 1,5 microns, et de disques clairs I isotropes d’une longueur moyenne de 0,8 micron. La partie centrale des disques I est marquée par une strie régulière ou strie Z. Une zone plus claire au centre du disque A correspond à la bande H.



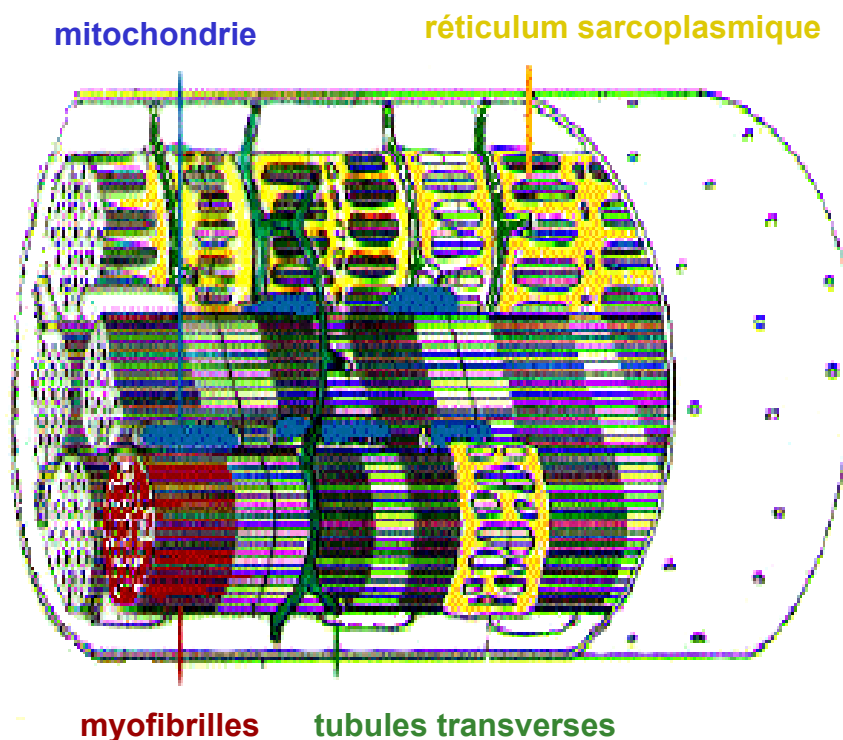
**Figure 10 : Du muscle à la myofibrille –**

Un muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires, qui regroupent quelques dizaines à quelques milliers de fibres musculaires. L'ensemble des protéines qui régulent la contraction musculaire forme la myofibrille. *Image tirée du site web : <http://obnet.chez.tiscali.fr/p028631.htm>*

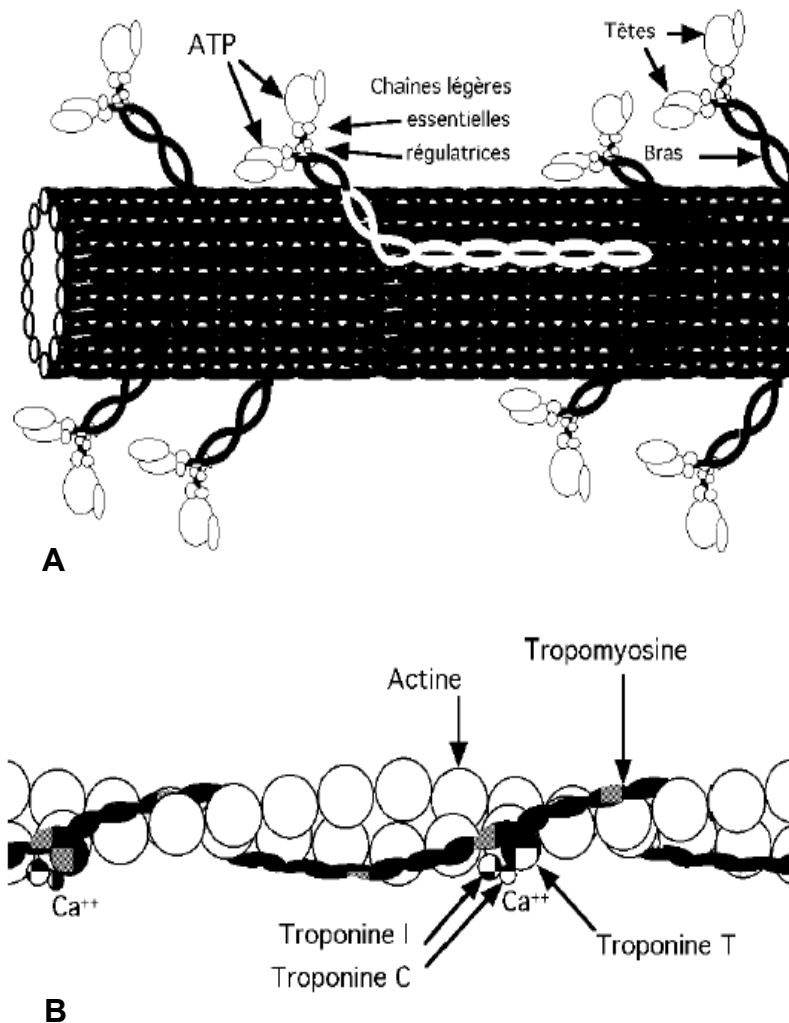
Les myofibrilles sont entourées de structures formées de membranes qui apparaissent comme un réseau de réservoirs et de tubules. Ces structures composent le système sarcotubulaire constitué d'un système T et du réticulum sarcoplasmique. Le système T joue un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux. Il est composé d'un ensemble d'invaginations de la membrane plasmique, les tubules T, qui s'enfoncent en profondeur entre les citernes terminales voisines du réticulum sarcoplasmique. Le réticulum dans lequel s'accumule le calcium, constitue un rideau régulier autour de chaque fibrille. Les parties sacculaires du réticulum de deux sarcomères voisins sont directement au contact des tubules transverses situés au niveau de la strie Z (Figure 11).

Le sarcomère contient deux types de myofilaments superposés les uns aux autres et orientés dans l'axe des myofibrilles. Le myofilament primaire ou épais (12 à 14 nm d'épaisseur) est situé au milieu du sarcomère au niveau du disque A. Ils sont composés de myosines dites à chaînes légères

(queue) et lourdes (tête). La queue est composée de deux brins enroulés l'un sur l'autre. La tête est contient un site de fixation à l'actine et un site ATPasique. Le myofilament secondaire ou fin (5 à 7 nm d'épaisseur) est situé dans les disques I et les parties latérales du disque A. Il est composé de molécules d'actines disposées en double hélice (Figure 12). Ces filaments d'actine sont associés à des protéines, la tropomyosine et le complexe de troponine. La tropomyosine est un dimère d'hélices  $\alpha$  identiques de 284 acides aminés chacune, qui s'enroulent l'une autour de l'autre. Le complexe de troponine est constitué de troponines T (liaison à la Tropomyosine), I (sous-unité Inhibitrice) et C (liaison du Calcium). Pendant la phase de repos, la sous-unité inhibitrice empêche la myosine d'interagir avec le filament d'actine. Les sous-unités T et C interviennent au moment de la mise en place du complexe actine-myosine, qui est à la base de la contraction musculaire [66].



**Figure 11** : Une représentation schématique de l'organisation structurale d'un sarcomère – Le sarcomère est constitué de myofibrilles (rouge), de mitochondries qui fournissent l'ATP (bleu), d'un réticulum sarcoplasmique composé de citernes terminales et d'un réseau de tubules (jaune) et de tubules transverses (vert). Image tirée du site web : <http://obnet.chez.tiscali.fr/p028631.htm>

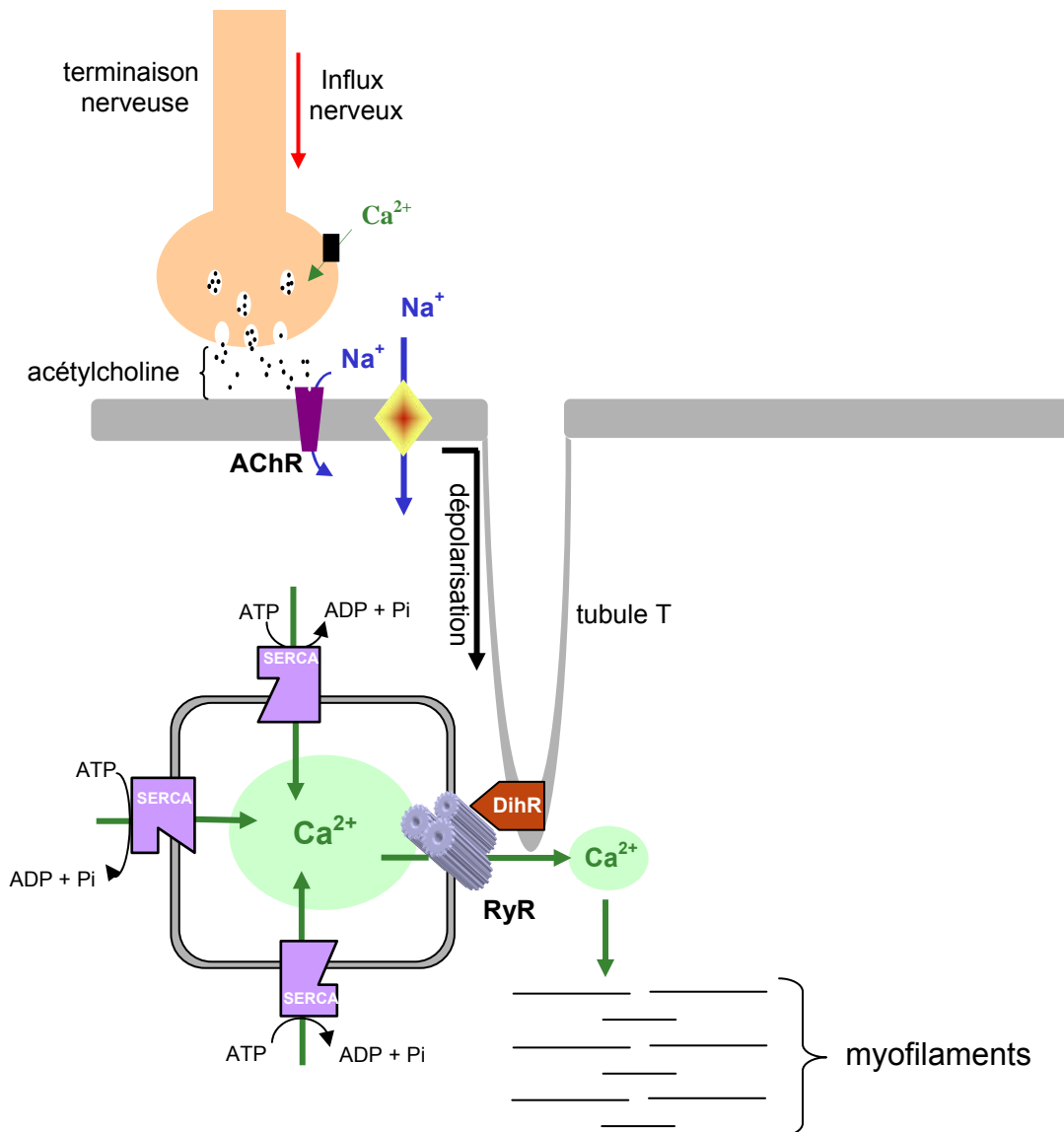


**Figure 12 : Une représentation schématique des filaments épais et fin – (A)** Le filament épais de myosine est constitué de 200 à 300 molécules de myosine native. Un monomère de myosine est une molécule constituée de six polypeptides avec deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères. Les deux chaînes lourdes sont organisées en hélice  $\alpha$ , enroulées en superhélice. **(B)** Le filament fin d'actine est constitué par deux brins d'actine, formant une hélice dans laquelle se logent des molécules de tropomyosine et des complexes de troponines. *Images tirées du site web : <http://obnet.chez.tiscali.fr/p028631b.htm>*

## C.2 Le couplage excitation contraction et la relaxation musculaire.

L'influx nerveux, caractérisé par une dépolarisation de la membrane plasmique du motoneurone, atteint la terminaison nerveuse (Figure 13). La dépolarisation provoque l'ouverture momentanée des canaux calciques contrôlés par la tension et situés dans le bouton terminal. Les ions calcium affluent selon leur gradient électrochimique dans la terminaison nerveuse. L'augmentation de la concentration cytosolique en calcium, stimule une libération localisée d'acétylcholine dans la fente synaptique de la plaque motrice. L'activation des récepteurs à l'acétylcholine situés dans la membrane plasmique de la cellule musculaire, permet l'entrée de façon transitoire de sodium. L'influx de sodium provoque une dépolarisation localisée de la membrane. Cette dépolarisation induit l'ouverture des

canaux sodiques dépendent du voltage, ce qui permet l'entrée d'une plus grande quantité d'ions sodium et donc une dépolarisation plus importante de la membrane.



**Figure 13 : Le couplage excitation contraction et la relaxation musculaire** - A la suite d'une stimulation nerveuse, la transmission par les tubules T d'une onde de dépolarisation membranaire au réticulum sarcoplasmique, via le récepteur à la dihydropyridine (DihR) et le récepteur à la ryanodine (RyR), favorise la libération d'ions calcium dans le sarcoplasme où ils entrent en contact avec les myofilaments. L'augmentation soudaine de la concentration en calcium intracellulaire provoque la contraction des myofibrilles. *In fine*, le calcium est pompé par les Ca-ATPases (SERCA) pour permettre la relaxation.

La dépolarisation va alors se propager jusqu'au tubule T (activation dépolarisante du canal sodium suivie de l'activation repolarisante du canal potassium). La dépolarisation atteint les

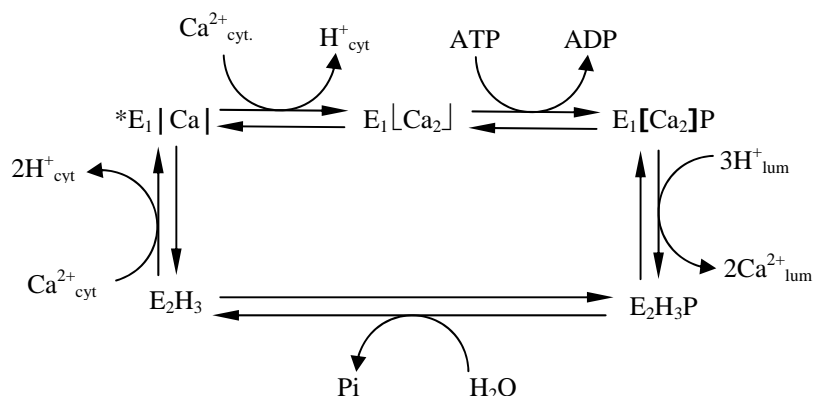
récepteurs à la dihydropyridine qui transduit le signal aux récepteurs à la ryanodine des citernes terminales, qui à son tour permet la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (Figure 13). La concentration cytosolique en calcium passe du submicromolaire au millimolaire en une fraction de seconde. Les ions calcium libérés se fixent spécifiquement sur la sous-unité C de la troponine. Il en résulte un changement de la structure secondaire et tertiaire de la troponine C et de la troponine T. La troponine T permet le déplacement du filament de tropomyosine par rapport aux chaînes d'actine, ce qui démasque le site de fixation de la myosine sur les monomères d'actine. La tête d'une molécule de myosine peut alors se fixer sur la chaîne d'actine. L'interaction actine - myosine et la présence de calcium activent alors le domaine ATPasique située dans les têtes de myosine. L'hydrolyse d'ATP produit l'énergie nécessaire à leur mouvement [67]. La relaxation musculaire est produite par la chute rapide de la concentration en calcium dans le cytosol. Pour cela, les ions calcium sont rapidement pompés dans le réticulum sarcoplasmique par une protéine transmembranaire, l'ATPase calcium (SERCA1a). En fait, cette Ca-ATPase fonctionne en permanence. Elle doit pomper le calcium qui s'échappe du réticulum par des phénomènes de fuites. Elle est plus fortement activée par le calcium qui a été libéré par le récepteur à la ryanodine après le stimulus.

### **C.3 L'ATPase calcium (SERCA1a) du réticulum sarcoplasmique.**

#### **C.3.1 Le mécanisme enzymatique de transport du calcium par l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>.**

Le mécanisme enzymatique de transport du calcium par l'ATPase calcium est relativement bien connu et un cycle complet a été décrit (schéma 3) [26, 68]. Il est actuellement admis que deux ions calcium se fixent sur les sites de haute affinité dont l'entrée se trouvent du côté cytosolique. La fixation des deux ions calcium est coopérative [69, 143]]. La cinétique de fixation du <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> sur la protéine semble indiquer que la liaison du premier calcium, induirait un changement de conformation locale de la protéine, qui rendrait accessible ou formerait le deuxième site de liaison [70]. La fixation de calcium est couplée au largage de protons dans le cytosol (2 ou 3 selon les auteurs [78 - 80]). Plus précisément, un modèle propose que deux protons se dissocient du site de fixation du calcium avant que le premier calcium ne puisse se fixer. Puis, un troisième proton se dissocie de la protéine au moment de la fixation du deuxième calcium [81, 82].

**Schéma 3 : Représentation schématique du cycle catalytique du transport du calcium par la Ca-ATPase de type PIIA** – Les symboles |, ⊥ et [ représentent les formes de la Ca-ATPase avec un ou deux ions calcium non-occlus et occlus.



Le complexe MgATP se fixe sur le domaine nucléotidique de la protéine. Toutefois, l'ATP et le  $Mg^{2+}$  peuvent s'associer et se dissocier du site catalytique indépendamment [71, 144]. La présence de  $Mg^{2+}$  est indispensable pour la phosphorylation de la protéine par l'ATP. L'ATP ne peut être hydrolysé tant que la protéine n'a pas fixé deux ions calcium, même si le nucléotide est préalablement lié à la protéine. En effet, l'ATP peut se fixer à la fois sur les formes  $E_1$  et  $E_2$  [72]. Le transfert du phosphate terminal de l'ATP à l'enzyme, conduit à la formation d'un dérivé phosphorylé covalent  $E_1Ca_2P$ . Ce dérivé phosphorylé est considéré comme de haute énergie. Il est capable de transférer de nouveau le phosphate sur l'ADP, pour reformer de l'ATP [145]. Au stade  $E_1Ca_2P$ , les ions calcium sont occlus et sont donc inaccessibles des deux cotés de la protéine, tant cytosolique que luminal. L'existence d'une forme avec le(s) calcium(s) occlu(s) a été mise en évidence après l'observation que la dissociation du calcium à partir de la forme phosphorylée, est plus lente qu'à partir de la forme non-phosphorylée [73]. Cette hypothèse fut confirmée après avoir observé que deux moles de calcium sont occlus par mole de phosphoenzyme  $E_1Ca_2P$  formé [74]. Une forme stable de l'ATPase calcium avec calcium occlus a été produite en remplaçant le MgATP par le Cr-ATP [75]. L'ATPase calcium s'arrête dans son cycle catalytique après fixation du Cr-ATP et les ions calcium restent associés à l'enzyme. Vilsen et Andersen démontrèrent que le  $\gamma$ -phosphate du Cr-ATP n'est pas transféré à l'Asp351 et donc aucun intermédiaire phosphorylé n'était formé [76]. La phosphorylation de l'enzyme n'est donc pas obligatoire pour l'occlusion des ions calcium. Cependant l'effet de la fixation du  $Cr^{3+}$ , à la place du  $Mg^{2+}$ , doit certainement mimer les changements structuraux induits lors de la formation du phosphoenzyme.



La translocation des ions calcium vers les sites de basse affinité, permet leur libération à l'intérieur du réticulum et l'échange avec des protons. La protéine passe de l'état  $E_1Ca_2P$  à la forme  $E_2H_3P$ , dit de basse énergie. Comme pour la fixation du calcium du côté cytosolique, sa libération du côté luminal est séquentielle. Le premier calcium fixé sera le premier libéré [77]. La libération du calcium est couplée à la fixation de protons sur l'ATPase. (2 ou 3 selon les auteurs [78 - 80]). Les études indiquent que la fixation des protons sur la protéine s'effectue au moment de la dissociation des calciums [82]. Ce couplage induit une légère alcalinisation de la lumière du réticulum sarcoplasmique, de l'ordre de 0,3 - 0,6 unité pH [83]. La capacité tampon des protéines contenues dans la lumière, ainsi que la perméabilité aux protons de la membrane du réticulum, semblent expliquer ce changement limité du pH. Enfin, le dérivé phosphorylé  $E_2H_3P$  est hydrolysé *via* l'entrée d'une molécule d'eau dans le site catalytique et le phosphate inorganique est relâché dans le cytosol. L'ATPase calcium passe de la forme  $E_2H_3P$  à  $E_2H_3$ .

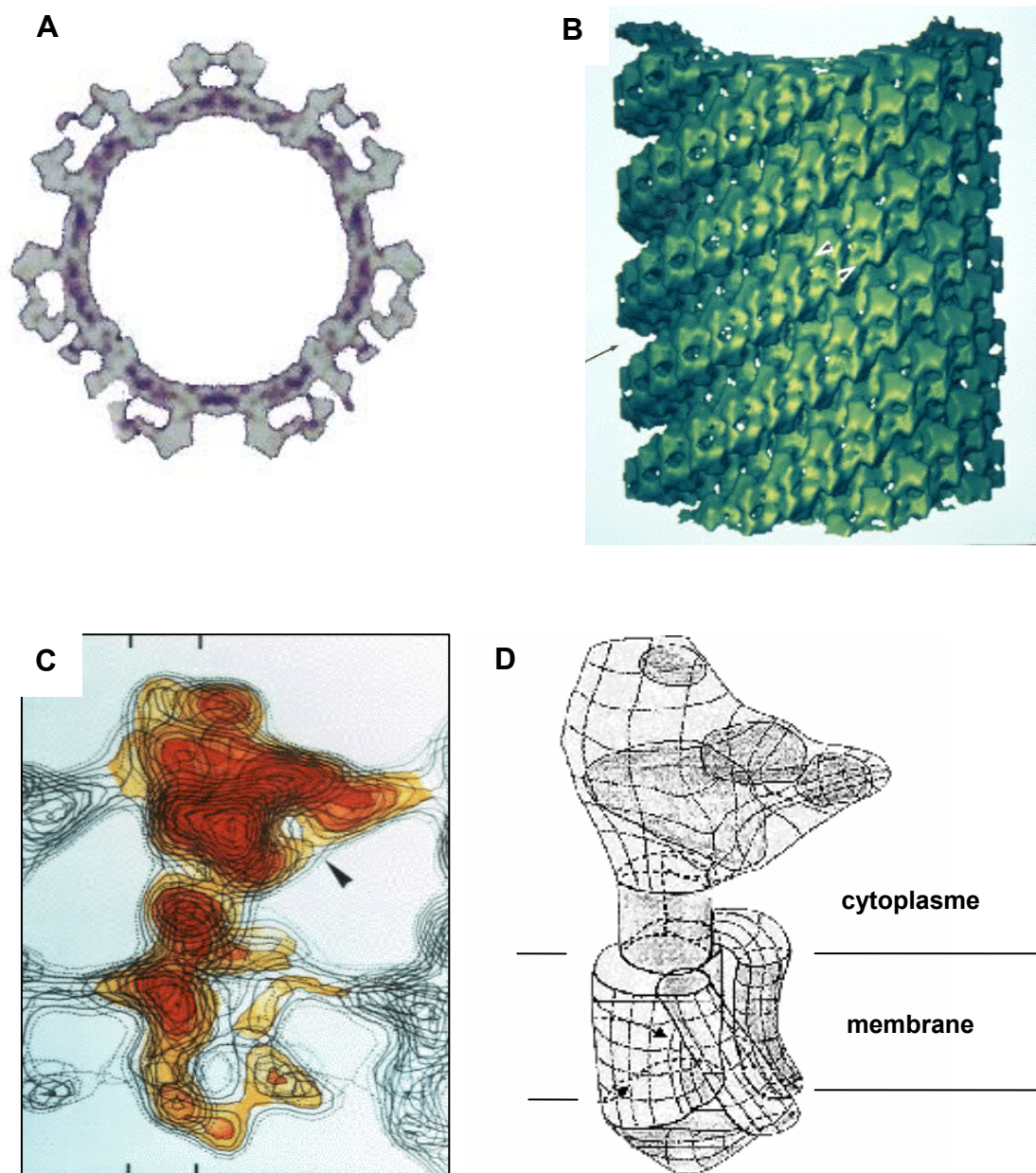
Un des points importants de ce schéma réactionnel est que toutes les étapes sont réversibles, ce qui permet de décrire une synthèse d'ATP [84]. La protéine peut être phosphorylée par le phosphate inorganique en présence d'un gradient transmembranaire de calcium. Ainsi, l'addition d'EGTA sur des vésicules de SR préchargées passivement en calcium, induit la transconformation  $E_1Ca_2$  vers la forme  $E_2H_3$ . L'addition d'ADP, de phosphate inorganique et de magnésium induit une sortie rapide du calcium, couplée à une synthèse d'ATP [85]. La phosphorylation de l'enzyme par le phosphate inorganique se produit seulement en l'absence de calcium extravésiculaire et en présence de magnésium [86]. Elle est inhibée par la présence de calcium extravésiculaire à des concentrations identiques à celles qui activent l'hydrolyse de l'ATP.

Le mécanisme moléculaire par lequel l'ATPase calcium transduit l'énergie chimique d'hydrolyse de l'ATP en transport de calcium contre son gradient électrochimique, reste à élucider. La connaissance des changements de conformation fins, impliqués dans les différentes étapes du cycle de transport actif, nécessite de connaître les structures 3D des différents intermédiaires ainsi que les acides aminés impliqués. La mutagenèse dirigée a permis de caractériser de nombreux acides aminés importants. Toutefois, la pénurie d'informations structurales résulte dans la difficulté d'obtenir des cristaux de différentes conformations, qui possèdent une qualité suffisante pour leurs études par la diffraction des rayons X ou la microscopie électronique.

### **C.3.2 La détermination des structures des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>**

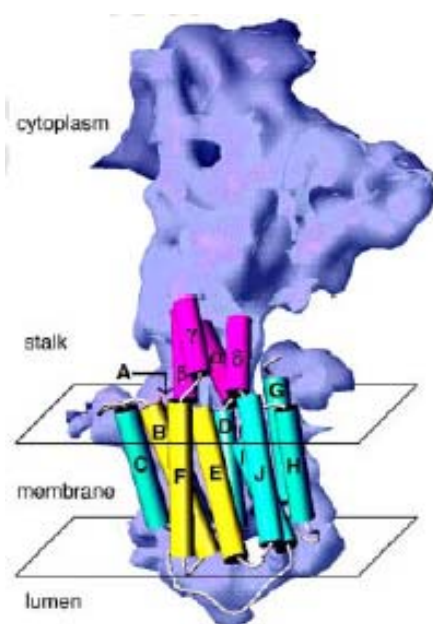
#### **a) La structure 3D de la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>.**

Les premières études structurales ont débuté dans les années 1960, avec l'observation de microsomes de réticulum sarcoplasmique en microscopie électronique en coloration négative. Les groupes de Martonosi et de Ikemoto ont en même temps observés des particules de 40 Å de diamètre à la surface des vésicules de SR [87, 88]. Le dernier groupe remarqua que ces particules étaient distantes de 40 Å de la membrane, et proposa que les particules doivent être reliées à la membrane par une tige trop petite pour être visible [88]. L'analyse de clichés de cryofracture de vésicules de SR a démontré la présence d'un domaine transmembranaire [89]. La formation des premiers cristaux de Ca-ATPase fut décrite par Dux et Martonosi en 1983 [90]. L'incubation de vésicules avec du décavanadate permet la formation d'un réseau cristallin de molécule à la surface des vésicules. Ces cristaux ne peuvent être produits qu'en absence de calcium, l'addition de calcium dans le milieu de cristallogénèse induit leur destruction. La forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub> semble donc être requise pour la formation de ce type de cristal. L'analyse d'images à partir de clichés de cristaux bidimensionnels par microscopie électronique en coloration négative, a permis de générer une carte de projection [91]. Elle indique que la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> de l'ATPase cristallise sous forme d'un dimère et présente l'aspect d'une poire avec un domaine central dense qui s'étale pour former un petit lobe. La première reconstruction 3D de l'ATPase calcium sous la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, a été réalisée en 1986 avec une résolution de 25 Å [92]. L'utilisation de la coloration négative pour ce type d'étude structurale, ne permet pas de déterminer l'organisation de la partie transmembranaire de la protéine. La mise en place et le développement de la cryomicroscopie électronique, ainsi que la formation de plus grands cristaux en forme de tube, ont rendu possible l'observation de la protéine dans sa totalité avec une meilleure résolution. La cryomicroscopie électronique permet d'observer les tubes cristallins sans colorant et non aplatis. De plus, cette technique de congélation ultrarapide en film mince conserve la conformation native de la protéine dans son milieu, contrairement à la coloration négative qui déshydrate l'échantillon. L'étude des tubes a permis dans un premier temps d'atteindre une résolution de 14 Å (Figure 14, [93]).



**Figure 14** : La structure 3D de l'ATPase- $Ca^{2+}$  dans la conformation  $E_2H_3VO_4$  à 14 Å de résolution – (A) Coupe transversale d'un tube cristallin de l'ATPase- $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique. Les deux anneaux concentriques correspondent à deux feuillets de la bicouche lipidique. Les densités supérieures correspondent au dimères d'ATPses. (B) La moitié avant d'un tube qui fait apparaître l'organisation hélicoïdale du cristal. (C) La carte de projection générée à partir d'analyse d'images obtenues par cryomicroscopie électronique [93]. (D) La structure de la Ca-ATPase dans la conformation  $E_2H_3VO_4$  [93].

La reconstruction 3D montre que le domaine cytoplasmique, qui représente près de 70 % de la masse de la protéine, est relié au domaine membranaire par une tige, confirmant les premières observations de Ikemoto en 1968 [88]. La résolution du domaine transmembranaire était insuffisante pour visualiser individuellement les hélices  $\alpha$ . Cependant, la taille globale de ce domaine concorde avec la présence de dix segments transmembranaires. La partie luminale de l'enzyme, qui ne représente que 5 % de la masse totale de la protéine, est identifiée par une densité majoritaire qui semble correspondre à la boucle entre les segments transmembranaires M7 et M8 [93]. Ces dernières années la cryomicroscopie électronique a vu son champ d'action considérablement s'accroître, notamment pour ce qui est de la résolution maximale. Les récents développements de microscope électronique à émission de champ (FEG) et de traitement des données ont permis de pousser cette résolution en dessous de 10 Å. Ainsi, en 1998 a été publiée la structure 3D de l'ATPase calcium sous la forme  $E_2H_3VO_4$  avec une résolution de 8 Å (Figure 15) [94]. A cette résolution, les hélices transmembranaires peuvent être observées individuellement. Puis en 2002, la résolution atteint 6 Å de résolution, toujours avec les mêmes cristaux tubulaires [95].



**Figure 15** : La structure de cryomicroscopie électronique de l'ATPase- $Ca^{2+}$  à 8 Å de résolution dans la conformation  $E_2H_3VO_4$  [94].

**b) La structure 3D de la forme  $E_1Ca_2$  de l'ATPase- $Ca^{2+}$ .**

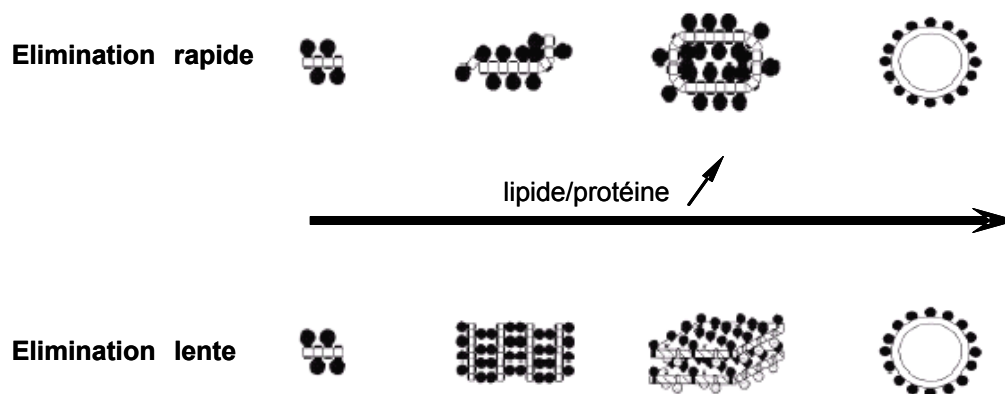
L'ATPase calcium a aussi été cristallisée sous sa forme  $E_1Ca_2$ . Les premiers cristaux ont été obtenus en 1985, en incubant des vésicules de réticulum sarcoplasmique en présence de calcium, à pH légèrement alcalin (pH8) [96]. Les cristaux 2D sont de type vésiculaire et donc inexploitable. A partir de 1987, la cristallogénèse s'effectue à partir de protéines solubilisées en détergent [97]. Le premier

problème posé par ce type de cristallisation, est de trouver un détergent dans lequel la protéine reste active pendant plusieurs jours. De plus, il a été montré que la protéine solubilisée doit être encore associée à des lipides pour garder son activité. Leur présence est indispensable pour la formation des cristaux [97, 98]. Ainsi, le détergent utilisé doit permettre l'extraction de la protéine, sa stabilisation et une délipidation pas trop importante. Une cinquantaine de détergents anioniques, zwitterioniques et neutres ont été testés [97]. Le  $C_{12}E_8$  remplit parfaitement toutes ces conditions avec une stœchiométrie protéine:détergent de 1:1 (poids:poids). Le deuxième paramètre physico-chimique important pour la cristallogenèse de l'ATPase sous la forme  $E_1Ca_2$ , est la concentration en calcium. Les conditions de cristallogenèse sont différentes de celles de la forme  $E_2$ . Les cristaux de la forme  $E_1$  ne se forment qu'en présence de calcium. Une concentration inférieure au millimolaire ne permet pas la formation de cristaux. La concentration optimale est de l'ordre de  $10^{-2}$  M [98].

Les cristaux obtenus sont des multicouches empilées dans lesquelles les molécules d'ATPase sont orientées de façon bidirectionnelle par rapport à la bicouche lipidique [98]. Malheureusement, ces cristaux sont petits et mal ordonnés. Pour agrandir la taille et améliorer la qualité de ces cristaux, une autre approche a été mise au point. La protéine est solubilisée puis purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne agarose-Red 120 [99]. La cristallogenèse est induite par incubation en présence de lipides (phosphatidyl choline), de calcium, de  $C_{12}E_8$  et 20 % glycérol. Cette solution de micelles ternaire protéine/lipide/détergent est dialysée contre un milieu qui ne contient pas de détergent. L'élimination du détergent permet la fusion des micelles et de former ainsi de grands cristaux. En 1997, la dialyse est remplacée par l'utilisation de billes hydrophobes qui absorbent les détergents (bio beads). Des études sur la vitesse d'élimination du détergent et sur le rapport lipide/protéine, ont été menées (Figure 16) [100]. L'élimination lente, qui s'effectue en quatre additions successives de bio beads sur deux heures, semble être la meilleure technique pour obtenir de grands cristaux ordonnés et organisés en multicouche. Plusieurs cartes de projection ont été générées à partir du traitement d'images obtenues par cryomicroscopie électronique [99, 101]. Aucune reconstruction 3D de l'ATPase calcium sous sa forme  $E_1Ca_2$  n'a pas pu être réalisée à partir de ces cristaux multilamellaires. L'interprétation des clichés de diffraction est impossible.

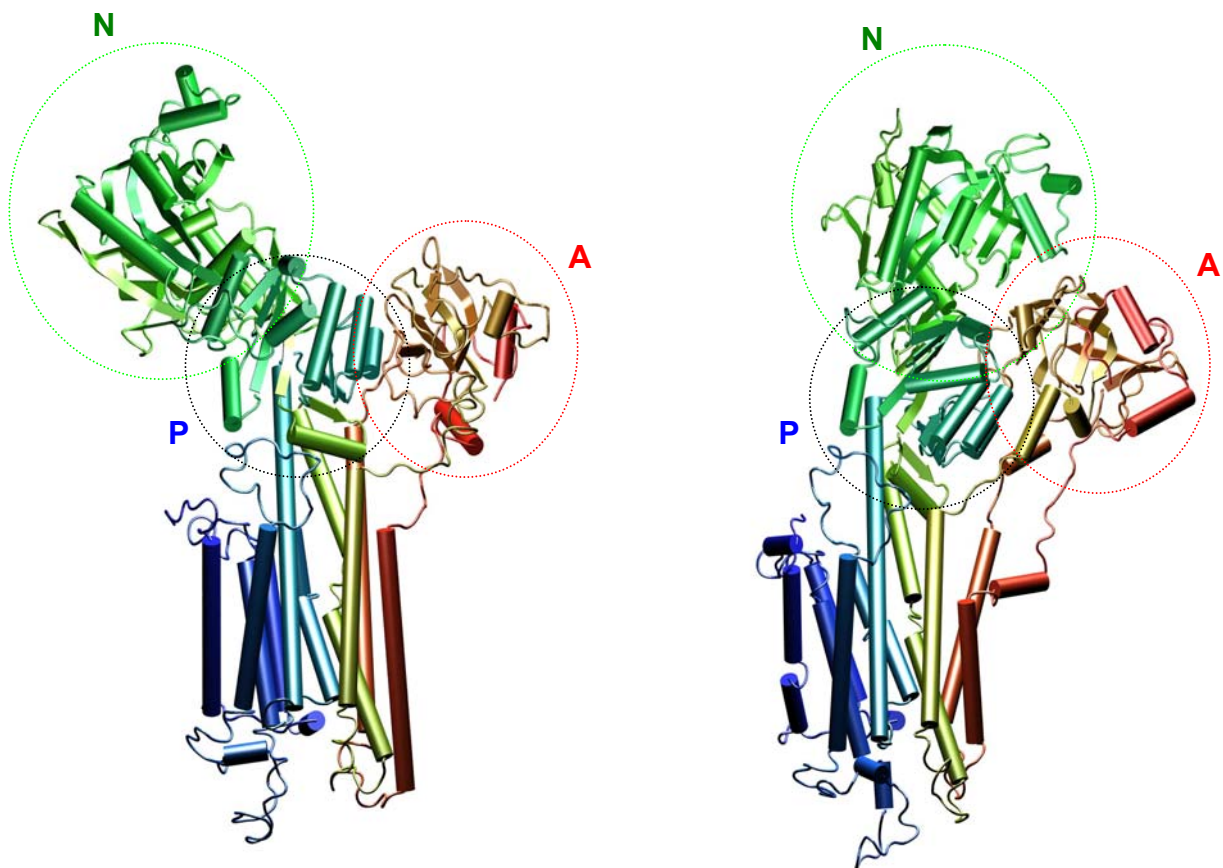
Un troisième type de cristal a été obtenu en présence de calcium et d'ADP. La conformation  $E_1Ca_2$ .ADP forme un cristal 2D en monocouche [100]. Les molécules d'ATPases présentent une

orientation bidirectionnelle par rapport à la membrane. Toutefois, ces cristaux sont de trop petite taille et aucune structure 3D de la forme  $E_1Ca_2$ .ADP n'a pu être déterminée.



**Figure 16** : La formation de cristaux en multicouche de la forme  $E_1Ca_2$  par élimination du détergeant par les bio beads – L'élimination rapide s'effectue en 30 minutes avec une seule addition de bio beads. L'élimination lente s'effectue en quatre additions successives de bio beads sur deux heures [100].

Tous ces résultats montrent que la conformation de l'ATPase- $Ca^{2+}$ , c'est à dire l'occupation ou non des sites nucléotidique et de fixation du calcium, influent sur le type de cristal formé et sur la structure 3D de l'ATPase- $Ca^{2+}$ . Ces différences ont été confirmées par l'obtention en 2000 et 2002, des structures atomiques des formes  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$  (Figure 17) [102, 103]. La première structure 3D déterminée à une résolution de 2,6 Å (Figure 17A), montre la présence de quatre domaines. Le domaine transmembranaire contient dix hélices  $\alpha$  (M1 – M10) avec quelques boucles courtes du côté luminal et cytoplasmique. Quatre des hélices transmembranaires (M2 – M5) se prolongent vers le cytoplasme pour former la tige (S2 – S5) ou cou de l'ATPase- $Ca^{2+}$ . Les trois autres domaines qui sont cytoplasmiques, correspondent aux deux grandes boucles cytoplasmiques entre les hélices M2/M3 et M4/M5. La boucle M4/M5 constitue les domaines de fixation du nucléotide (N) et de phosphorylation (P). La boucle M2/M3 avec la région amino-terminale de l'enzyme, constitue le domaine de transduction ou déclencheur (A pour actuator). Ces trois domaines cytoplasmiques se sont rapprochés dans la deuxième structure atomique, ce qui donne un aspect plus compact ou "fermée" de la forme  $E_2H_3TG$  (Figure 17B).



**Figure 17 :** Les structures atomiques de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  déterminées par diffraction des rayons X – (A)  $\text{E}_1\text{Ca}_2$  à 2,6 Å de résolution et (B)  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$ , et 3,1 Å de résolution [101, 102]. Les domaines de fixation du nucléotide (N), de phosphorylation (P) et l'actuator (A) sont représentés par les cercles en pointillés.

Finalement, plusieurs structures 3D de différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase calcium ont été déterminées. Ces informations structurales permettent de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de transport du calcium. Néanmoins, aucune structure 3D ne décrit un dérivé phosphorylé covalent des formes  $\text{E}_1$  et/ou  $\text{E}_2$ , intermédiaire indispensable dans le cycle catalytique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ .



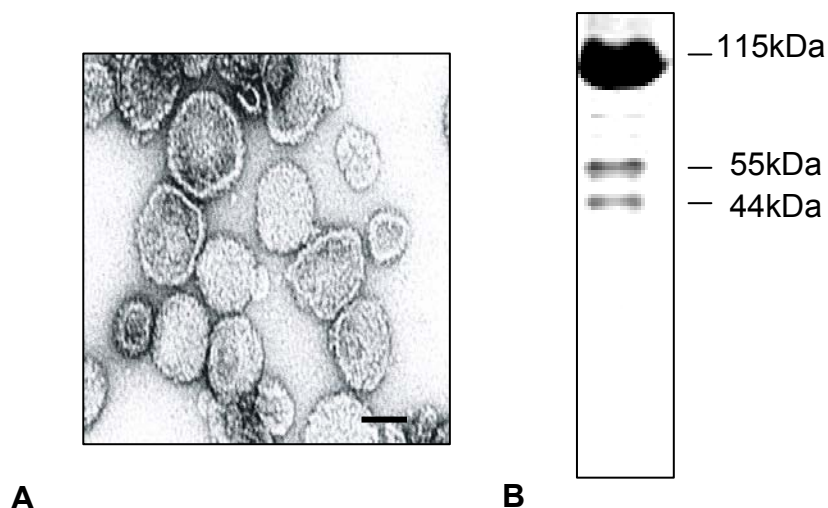
## Chapitre II - Matériels et méthodes

### A. La purification des vésicules du réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique de lapin.

Les vésicules de réticulum sarcoplasmique (RS) sont isolées à partir de muscles blancs de lapin. Les muscles prélevés sont hachés puis homogénéisés dans une solution de 0,1 M KCl. Une première centrifugation à basse vitesse permet la séparation des débris cellulaires par sédimentation. Une centrifugation à haute vitesse du surnageant permet de concentrer le SR en un culot. Celui-ci est resuspendu dans un milieu contenant 0,5 M saccharose, puis centrifugé à basse vitesse afin d'éliminer d'éventuels agrégats. Le surnageant est dilué dans un tampon de force ionique élevée 10 mM HEPES à pH7,4, 0,6 M KCl et 0,3 M saccharose. La force ionique élevée permet la solubilisation de la myosine résiduelle. Une dernière centrifugation à haute vitesse concentre les vésicules de SR purifié. Le culot est suspendu dans un tampon contenant 5 mM HEPES à pH7,4, 0,1 M KCl et 0,3 M saccharose. Des aliquotes de la solution de SR purifié (sous forme de vésicules étanches, Figure 18A) sont congelé dans l'azote liquide et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  [103b].

Après l'étape de purification, l'enrichissement en protéine est vérifié sur un gel d'électrophorèse polyacrylamide 10 % (SDS-PAGE). Après la migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie (Figure 18B). Nous pouvons observer sur le gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) une bande majoritaire à 100 kDa qui correspond à l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (80 % du total des protéines). Deux autres bandes de plus faibles intensités sont observées : la protéine à haute affinité pour le calcium à 55 kDa et la calséquestrine à 44 kDa. Ces deux protéines extrinsèques sont situées sur la surface interne du RS. Leur rôle est de complexer le calcium interne et d'augmenter ainsi la capacité de stockage dans le réticulum sarcoplasmique.





**Figure 18** – (A) Photographie de vésicules de RS par microscopie électronique en coloration négative. La barre correspond à 100 nm. (B) Gel d'électrophorèse SDS-PAGE d'une préparation de vésicules de RS.

## B. Les études spectrophotométriques.

Les mesures de la densité optique ont été réalisées en utilisant un spectrophotomètre UNICAM UV 300 et le programme d'analyse Vision32 (Unicam Software). L'appareil est équipé d'un dispositif d'agitation et de régulation en température.

### B.1 La mesure de la concentration en protéine.

La concentration en protéine a été déterminée soit en mesurant l'absorbance à 280 nm, soit en dosant les protéines par la méthode de Bradford avec le réactif de Bio Rad. Ainsi, la mesure de l'absorption à 280 nm de 1 mg/ml de protéine à 20°C, après solubilisation des vésicules dans 1 % SDS, donne une densité optique de 1 pour un chemin optique de 1 cm. Les gammes étalons (Bradford) ont été réalisées avec la sérumalbumine bovine diluée à différentes concentrations.

### B.2 L'activité ATPasique de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>.

L'activité ATPasique est mesurée par le système d'enzyme couplée pyruvate kinase/lactate déshydrogénase. Dans ce système couplé, la réaction finale implique du  $\beta$ NADH dont la disparition est suivie par le changement de la densité optique, à 20°C, en fonction du temps à 340 nm avec  $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Le tampon utilisé pour ce type de cinétique est 50 mM MOPS-KOH pH 7, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, 10  $\mu$ M ATP et 0,2 mM  $\beta$ NADH.

### B.3 L'activité pNPPasique de la Ca-ATPase.

L'activité pNPPasique est mesurée en suivant l'apparition du pNPhenol en fonction du temps grâce au changement de la densité optique à 410 nm avec  $\epsilon_{410} = 1,62 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Le tampon utilisé pour ce type de cinétique réalisée à 20°C, contient 50 mM MOPS-NaOH pH 7,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  et 10 mM pNPP.

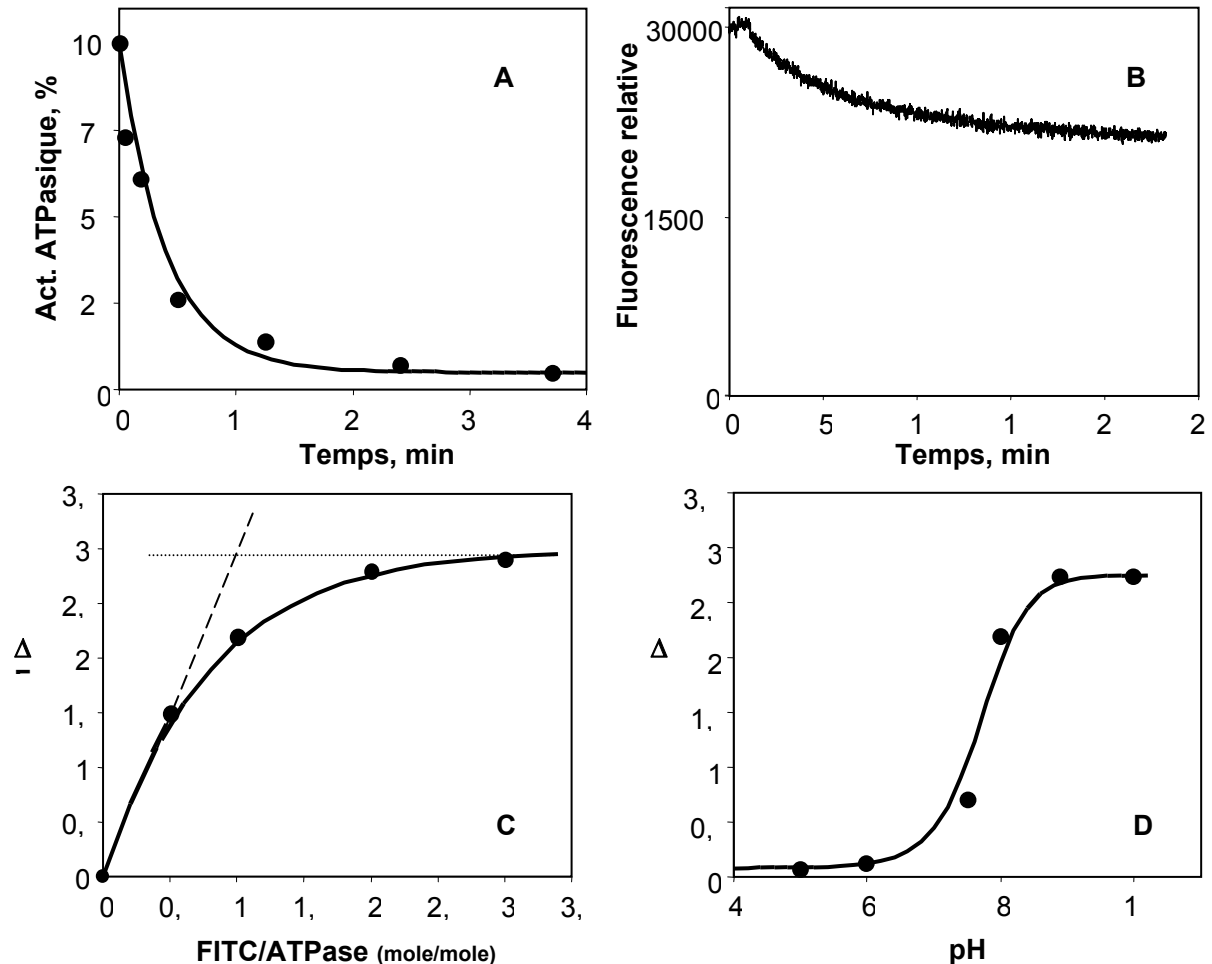
## C. La modification covalente de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ par des sondes fluorescentes.

### C.1 Le FITC (fluorescéine-4-isothiocyanate).

Les vésicules de RS natives (2 mg/ml i.e. 20  $\mu\text{M}$  ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ ) sont incubées avec 20  $\mu\text{M}$  de FITC à 20°C dans un tampon 10 mM Tris-Tricine à pH 8, 0,3 M saccharose, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  et 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . L'incubation en présence de FITC provoque une rapide et complète inactivation de l'activité ATPasique de l'ATPase calcium (Figure 19A). L'incubation d'une mole d'ATPase avec une mole de FITC permet d'obtenir 100 % d'inhibition après 20 min d'incubation à 22°C. La réaction est arrêtée après l'inhibition complète de l'activité ATPasique, en plongeant le milieu réactionnel dans la glace et en diluant au dixième le mélange dans un tampon 50 mM Tris-HCl à pH 7 et 0,2 M saccharose. Le FITC libre est éliminé des vésicules par ultracentrifugation à 45 000 tours/min pendant 45 min à 4°C dans un rotor Ti75 (Beckman). Le culot est resuspendu dans un tampon 50 mM MOPS-Tris à pH 7 et 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  [108]. Les aliquotes de préparation de vésicules de RS marquées, sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Les spectres d'absorption (260 nm – 500 nm) de l'ATPase calcium solubilisée en détergent (protéine/détergent > 2) avant et après le marquage par le FITC, ainsi que du surnageant (après ultracentrifugation), nous permettent de définir le pourcentage de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  marquée (~ 95 %), la perte en protéine lors du marquage (~10 %) et de vérifier si l'élimination du FITC libre est totale.

La fixation du FITC sur l'ATPase calcium peut aussi être suivie par les changements de sa fluorescence [132]. Une décroissance de l'intensité de fluorescence du FITC est observée en présence de Ca-ATPase (Figure 19B). La figure 19C permet d'observer un effet de saturation pour le marquage de l'ATPase calcium en fonction du rapport FITC/ATPase (mole/mole). Nous retrouvons une stœchiométrie de marquage 1:1 (mole/mole). L'amplitude des changements de l'intensité de

fluorescence du FITC en présence de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  dépend du pH (Figure 19D). L'état de protonation de la Lys515 avec laquelle le FITC réagit est important. En effet, le FITC modifie la Lys515 à l'état déprotoné.



**Figure 19 – Les caractéristiques biochimiques de la modification de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  par le FITC – (A)** L'inactivation de l'activité ATPasique par le FITC. **(B)** Les changements de l'intensité de fluorescence du FITC en présence de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ . Cette diminution de la fluorescence du FITC au cours de la modification de l'enzyme, est fonction **(C)** du rapport FITC/ATPase (mole/mole) et **(D)** du pH.

### C.2 Le SITS (acide 4-acétamido-4'-isiothiocyanatostilbène disulfonique).

Les vésicules de RS (2 mg/mL i.e. 20  $\mu\text{M}$  ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ ) sont incubées avec 20  $\mu\text{M}$  de SITS à 20°C dans un tampon 50 mM Tris-HCl à pH 9 et 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . La réaction est arrêtée après inhibition complète de l'activité ATPasique en plongeant le milieu réactionnel dans la glace et en diluant au dixième le mélange avec un tampon 50 mM Tris-HCl à pH 7. Le SITS libre est éliminé des vésicules de SR marquées, par ultracentrifugation à 45 000 tours/min pendant 45 min à 4°C dans un rotor Ti75

(Beckman). Le culot est suspendu dans un tampon 50mM MOPS-Tris à pH 7 et 100 $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> [108]. Les aliquotes de préparation de vésicules de RS marquées, sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Les spectres d'absorption (260 nm – 500 nm) de l'ATPase calcium solubilisée en détergent (protéine/détergent > 2) avant et après le marquage par le SITS, ainsi que du surnageant (après ultracentrifugation), nous permettent de définir le pourcentage de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> modifiée (90 %), la perte en protéine lors du marquage (~10 %) et de vérifier si l'élimination du SITS libre est totale.

### C.3 La caractérisation de l'acide aminé modifié par le SITS.

La protéine marquée par le SITS a été fractionnée en peptides par digestion protéolytique avec de la trypsine, puis les peptides ont été isolés par chromatographie [146]. La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) en phase inverse (colonne Vydac C<sub>4</sub>, 0,2 x 15 cm) a été réalisée à l'aide d'un système KONTRON à barrette de diode. Les peptides ont été fractionnés par un gradient linéaire d'un mélange eau/acétonitrile (10 – 100 %), à pH 2 en présence de TFA. Deux chromatogrammes ont été acquis à 215 nm et 340 nm, afin d'identifier la présence respectivement d'acides aminés et du SITS. La séquence du peptide isolé et marqué par le SITS a été déterminée sur un séquenceur Biosystem 477A, équipé d'un analyseur de type 120A.

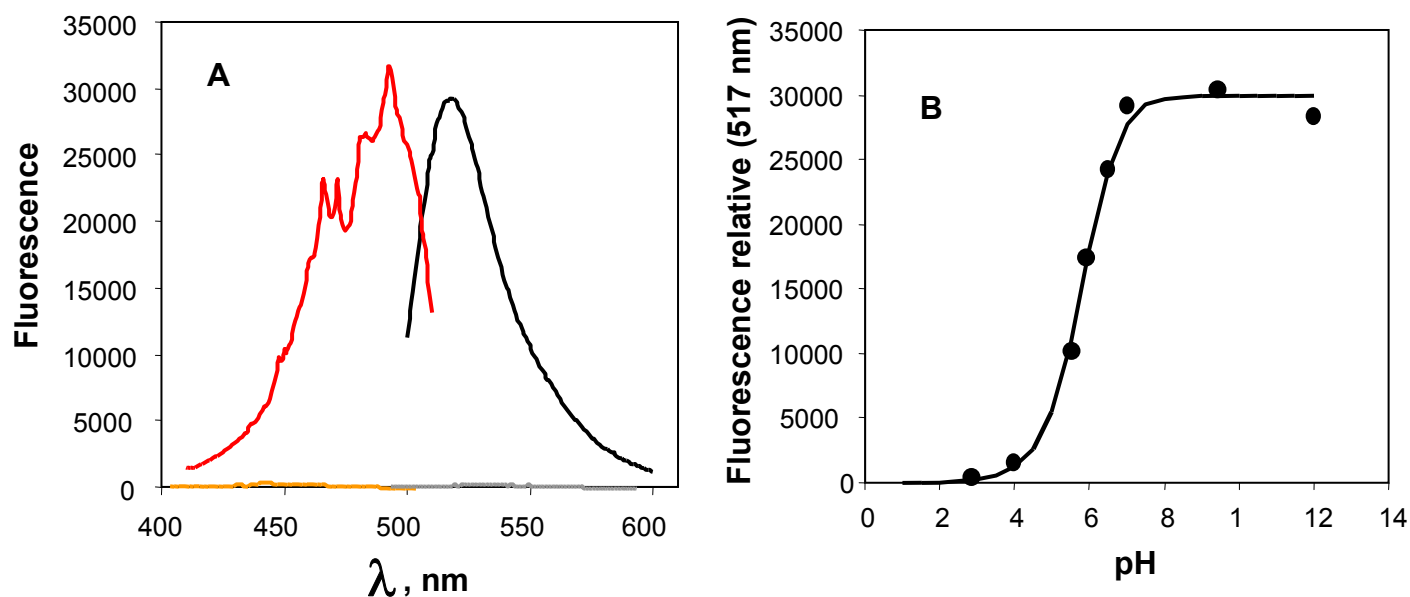
## D. Les études spectrofluorimétriques.

Les mesures de l'intensité de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre BIO-TEK KONTRON et le programme d'analyse FELIX (Bio Tek Software). L'appareil est équipé d'un dispositif d'agitation et de régulation en température.

### D.1 Le FITC (fluorescéine-4-isothiocyanate).

Les spectres d'excitation et d'émission du FITC en milieu aqueux à pH 7, présentent respectivement des maximaux à 495 nm et 517 nm (Figure 20A). L'intensité de fluorescence du FITC varie en fonction du pH. L'intensité maximale est observée dans un milieu aqueux avec un pH  $\geq$  7 (Figure 20B). L'intensité de fluorescence du FITC à 517 nm en milieu apolaire tel que le DMF, est quasi nulle car il n'absorbe plus (Figure 20). L'intensité de fluorescence du FITC lié à l'ATPase calcium varie avec la fixation de différents substrats [106 – 107]. De même, la formation du dérivé phosphorylé covalent stable (EP) en présence d'AcP et après chélation de calcium extravésiculaire

par de l'EGTA, peut être observée en suivant les changements de l'intensité de fluorescence du FITC [108].



**Figure 20 - Les caractéristiques biophysiques du FITC – (A)** Les spectres d'excitation ( $\lambda_{em} = 517$  nm) et d'émission ( $\lambda_{ex} = 495$  nm) du FITC dans un tampon pH 7 (rouge et noir) ou dans du DMF (orange et gris). **(B)** L'intensité de fluorescence du FITC à 517 nm en fonction du pH du tampon.

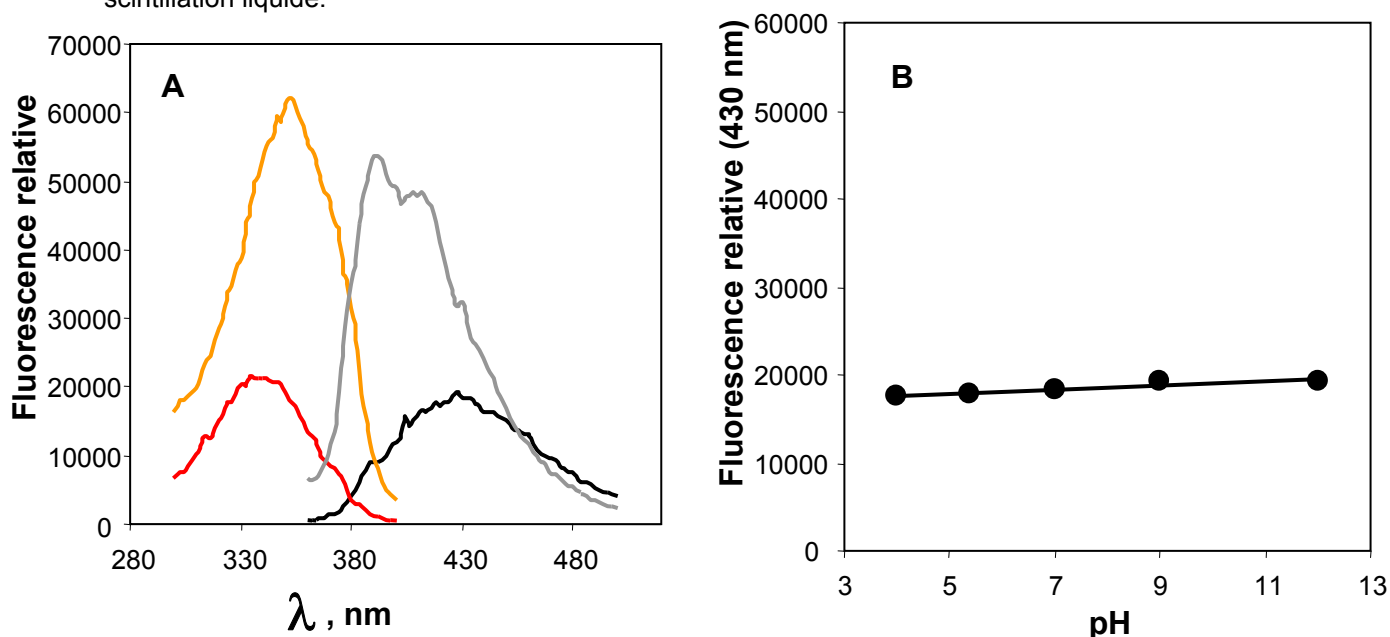
## D.2 Le SITS (acide 4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène disulfonique).

Les spectres d'excitation et d'émission du SITS en milieu aqueux à pH 7, présentent respectivement des maximaux à 340 nm et 430 nm (Figure 21A). L'intensité de fluorescence du SITS ne varie pas en fonction du pH du milieu (Figure 21B), toutefois elle dépend de la polarité du milieu (Figure 21A). L'intensité maximale à 430 nm est observée dans un milieu aqueux alors que dans un milieu apolaire, tel que le DMF, nous observons une exaltation et un changement des maxima.

## E. La phosphorylation de la FITC-ATPase par le $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$ en présence de calcium.

La synthèse de  $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$  a été effectuée selon le protocole de Bodley et Jencks [104]. Les vésicules de RS (1 mg/ml) sont phosphorylées à 20°C par 10 mM d'AcP radiomarqué  $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$  (radioactivité spécifique 2000 cpm/nmole). Des aliquotes (100  $\mu\text{l}$  *i.e.* 0,1 mg de protéine) sont prélevées à différent temps d'incubation. La réaction de phosphorylation est arrêtée en précipitant la protéine dans un milieu acide PCA 120 mM, Pi 15 mM. La solution, qui contient la protéine

phosphorylée, est déposée sur des filtres Gelmann A/E. Le filtre est rincé par un excès de la solution d'arrêt pour éliminer le signal non spécifique. La radioactivité contenue dans le filtre est mesurée par scintillation liquide.



**Figure 21 - Les caractéristiques biophysiques du SITS – (A)** Les spectres d'excitation ( $\lambda_{em} = 430$  nm) et d'émission ( $\lambda_{ex} = 340$  nm) du SITS dans un tampon pH 7 (rouge et noir) ou dans du DMF (orange et gris). **(B)** L'intensité de fluorescence du SITS à 430 nm en fonction du pH du tampon.

## F. L'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les vésicules de RS.

Les vésicules de RS (0,5 mg/ml) sont activement chargées en  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  (radioactivité spécifique 7000 cpm/nmole) en présence de 10 mM d'AcP. Des aliquotes (50  $\mu\text{l}$ ) sont prélevées à différent temps d'incubation et la charge active en calcium est arrêtée par dilution dans 5 ml de milieu sans calcium [108]. Les échantillons sont ensuite déposés sur des filtres Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ). Les filtres sont rincés par la solution de dilution. La radioactivité contenue dans le filtre est mesurée par scintillation liquide.

## G. La formation des cristaux 2D de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ .

### G.1 L'agent cristallisant.

L'agent cristallisant est le décavanadate ( $\text{V}_{10}\text{O}_{26}$ ), qui est obtenu à partir d'une solution mère à 50 mM d'orthovanadate (Sigma), qui est à pH 12 lors de la solubilisation puis acidifiée jusqu'à pH 2

avec une solution de HCl 37 % afin favoriser la formation de décavanadate (couleur orange). La solution est ajustée à pH 6,5 avec une solution de NaOH 1 N, pour être dans les conditions de cristallisation optimales. La préparation de la solution de décavanadate s'effectue à 20°C.

## G.2 La fusion des vésicules de RS.

La fusion des protéoliposomes contenant l'ATPase calcium est obtenue en effectuant plusieurs cycles de congélation/décongélation comme précédemment décrit pour des liposomes [112]. Une solution de RS à 10 ou 30 mg/ml dans une solution contenant 5 mM HEPES à pH 7,4, 0,1 M KCl et 0,3 M saccharose, est rapidement congelée à -196°C dans de l'azote liquide. Les vésicules sont décongelées à température ambiante. Ce cycle est effectué trois fois.

L'étude morphométrique des vésicules est effectuée par microscopie électronique en coloration négative. Les clichés sont digitalisés à l'aide d'une caméra Panasonic CD52 équipée d'un objectif FD50 (Canon) et d'un système d'acquisition PIA (Photometric Image Analysis). Le logiciel d'analyse d'image Imagenia (Biocom software) est utilisé pour déterminer la distribution des diamètres des vésicules de SR.

La distribution expérimentale ne suivant pas la loi Normale, la présence de sous-populations a été recherchée. L'ordre de grandeur des diamètres est différent, les données expérimentales ont été normalisées par une transformation logarithmique. Chaque sous-population a été simulée séparément en fonction de leur diamètre moyen ( $d$ ), l'écart type ( $\sigma$ ) et leur pourcentage normalisé (sachant que 100 % correspond au nombre total de vésicules comptées) [147]. L'affinement des valeurs de  $d$ ,  $\sigma$  et % de chaque sous-population, a été réalisé par la fonction SOLVEUR du programme EXCEL (Microsoft software).

## H. La microscopie électronique en coloration négative.

### H.1 La préparation des échantillons

Les grilles en cuivre sont lavées à l'acétone afin de les débarrasser des éventuels corps gras. Les grilles sont ensuite passées aux ultrasons afin de séparer celles qui se sont agglutinées lors du lavage. Après séchage, on dépose sur les grilles un film de carbone qui est utilisé comme support car

il possède une bonne conductivité, une transparence face électrons et une simplicité d'utilisation. Ces films sont obtenus par évaporation de carbone sur une feuille de mica (passage d'une haute tension à travers une tresse de carbone sous vide ( $10^{-6}$  Torr). Le film est transféré du mica aux grilles en faisant flotter la fine pellicule de carbone hydrophobe à la surface de l'eau, puis le film est doucement amené sur les grilles.

Le film de carbone fraîchement déposé sur les grilles de microscope électronique est assez hydrophile. Au cours du temps, il devient hydrophobe. Cette caractéristique influence l'adhésion et parfois la conservation de l'échantillon sur le carbone. L'effluvage permet de rendre de nouveau hydrophile le film de carbone. Ce processus est réalisé par ionisation dans un vide primaire (0,1Torr) avec un EMSCOPE SC500 en laissant 1 min les grilles entre deux électrodes à travers lesquelles passe une haute tension.

4  $\mu$ l d'une solution de SR à 0,3 mg/ml est déposé sur une grille rendue hydrophile. Après avoir laissé sédimenter les vésicules pendant 1 min, 50  $\mu$ l d'acétate d'uranyle 1 % sont ajoutées. L'excédent de liquide est absorbé par du papier Whatmann 50, après 30 s de coloration. La coloration négative préserve la forme des objets, fourni un contraste et est relativement stable sous un faisceau d'électron. La coloration des vésicules de RS par de l'acétate d'uranyle 1 % (pH 4) donne de meilleurs résultats en terme de conservation et de résistance face au faisceau d'électron, par rapport au phosphotungstate de potassium (pH 5-8). La répartition des métaux lourds lors de la coloration négative est influencée par la qualité du film de carbone et de l'échantillon.

## H.2 La prise de photographies.

La prise de photographies s'effectue avec un grandissement compris entre 25K et 60K. L'utilisation d'un plus fort grandissement risque premièrement de réduire la différence entre les niveaux de gris ou densité optique (perte de contraste), deuxièmement de détruire les objets observés. En effet, le faisceau d'électron est modifié lors du passage à travers l'échantillon par les interactions élastique et inélastique. Le faisceau incident perd une partie de son énergie par les interactions inélastiques, ce qui induit la formation d'un nombre important d'ions réactifs et de radicaux libres qui endommagent l'échantillon. Si on utilise un plus faible grandissement, la résolution pour



observer les protéines serait limitée par l'émulsion du négatif. L'acquisition des images est réalisée sur un microscope électronique JEOL JEM 1200EX. Lors de la prise de photo, le faisceau est focalisé pendant deux à trois secondes sur la zone choisie. Les films photographiques utilisés sont les 4489 de chez KODAK. Le développement des négatifs s'effectue dans du D19 pur pendant 1min.

## **I. L'analyse d'images de microscopie électronique en coloration négative.**

### **I.1 Le banc optique**

Le système est composé d'un laser et d'un ensemble de lentilles qui permet d'élargir et de focaliser le faisceau lumineux sur les clichés à analyser. La visualisation du plan de diffraction des cristaux s'effectue soit directement sur un écran, soit sur un moniteur relié à une caméra CCD. L'image du réseau réciproque obtenu par le banc optique permet de sélectionner la ou les régions d'une photo qui présentent les taches de diffraction les plus nombreuses, les plus intenses et avec la meilleure résolution. Le degré de défocalisation et l'astigmatisme sont rapidement estimés par l'observation des anneaux de diffraction (Thon). Ces anneaux représentent les zones où la CTF (Contrast Transfert Fonction) s'inverse en passant par un point où elle est nulle.

### **I.2 La digitalisation**

Après avoir choisi les meilleurs négatifs, il est nécessaire de transformer l'information qui y est contenue (densité optique) en fichier numérique. La gamme de densité optique est divisée en 256 niveaux de gris. La valeur d'un pixel (**picture element**) représente la moyenne de la densité optique à l'intérieur de la zone éclairée. La résolution maximale que l'on peut obtenir dépend de la taille du pixel de digitalisation (tableau 1). Celle-ci est fonction à la fois du grandissement auquel a été prise la photo et de la taille du spot de digitalisation qui au minimum est de 5  $\mu\text{m}$  (caractéristique propre du microdensitomètre utilisé). La digitalisation est effectuée avec un microdensotomètre HI-SCAN de chez EUROCORE et le programme de traitement d'image Braincolor 1.3.

**Tableau 1 : La taille du pixel pour une digitalisation effectuée à 1600 dpi.**

(dot per inch = pixel par 25,4 mm)

<b>grandissement</b>	<b>60K</b>	<b>50K</b>	<b>40K</b>	<b>30K</b>
<b>Å/pixel</b>	<b>2,8</b>	<b>3,4</b>	<b>4,2</b>	<b>5,6</b>

### I.3 L'indexation.

L'analyse d'image est réalisée dans l'espace réciproque, elle est ainsi basée sur la transformée de Fourier (TF) de l'image numérisée. Cette transformée (FFT : Fast Fourier Transform) s'effectue sur des images dont les dimensions sont des puissances de deux (128 X 128, 256 X 256, etc.). Il est donc nécessaire de découper une zone du tube cristallin que l'on insère dans une boîte de dimensions appropriées pour les calculs. C'est cette boîte qui est maintenant considérée comme l'image à traiter. La TF de l'image d'un cristal donne une série de spots de diffraction. L'indexation de ces spots, à l'aide du programme SPECTRA [117], permet d'obtenir les paramètres de maille (a,b, $\gamma$ ) de ce cristal.

### I.4 Le filtrage.

L'image n'est pas exempte de bruit de fond. Ce bruit provient essentiellement du support en carbone. Lors de la dépose du film de carbone, celui-ci présente une surface ondulée, qui correspond à plusieurs centaines de déflexions locales de l'ordre de 1° [148]. Cette valeur est proche de la limite tolérée pour déterminer une structure à haute résolution. En fait, le film de carbone ne présente aucun pli lorsqu'il est sur son support en mica. Les déflexions se produisent durant l'étape de dépôt sur les grilles de microscope électronique. La planarité du cristal 2D et donc du film de carbone, constituent un paramètre limitant majeur pour obtenir la structure à haute résolution de la protéine d'intérêt. Le filtrage permet d'une manière simple, d'enlever les contributions du bruit et obtenir de ce fait des images filtrées. Pour cela, il est nécessaire d'appliquer un masque autour de chaque spot de diffraction afin d'éliminer au maximum le bruit de fond. Ces masques sont positionnés par rapport aux coordonnées (h,k) des points (0,1) et (1,0), ce sont donc des points de référence. La taille du masque est choisie à la fois en fonction du grandissement du cliché et de l'élargissement des spots mais est limité par la distance entre les spots.

## 1.5 Les corrections des déformations du cristal.

Un cristal n'est jamais parfait, il contient toujours un certain désordre de position et d'orientation du réseau. Ces irrégularités induisent un élargissement des spots de diffraction par rapport à la forme théorique. Ces irrégularités limitent le nombre de spots visibles. Les corrections permettent d'affiner et d'agrandir la liste des paramètres  $(h,k,A,\phi)$  de chaque image traitée. Cette étape s'effectue avec un ensemble de programmes qui permet de générer une image filtrée du cristal, dont on extrait une boîte à partir de laquelle une carte de corrélation croisée est calculée entre cette boîte et l'image filtrée. Les corrections s'effectuent en appliquant à l'image filtrée un certain nombre de vecteurs de déplacement qui permettent de "redresser" le cristal. La TF de l'image corrigée génère une carte de diffraction qui possède un plus grand nombre de spots, de plus grande qualité et l'apparition de spots de résolution supérieure. Le processus de filtrage et de corrections est habituellement effectué deux fois.

Après le filtrage et les corrections des distorsions du cristal, une autre correction doit être appliquée, c'est la prise en compte de la défocalisation du faisceau d'électron et de l'aberration sphérique du microscope électronique ( $C_s$ ), qui donnent lieu à des effets d'interférence. Ces deux défauts affectent les phases ( $\phi$ ) et les amplitudes ( $A$ ). Nous appliquons aux facteurs de structures  $(h,k,A,\phi)$ , un terme correctif déterminé à partir de la fonction de transfert de contraste de phase (CTF). Le programme ICE s'appuie sur l'observation des anneaux de Thon, pour le calcul de la valeur de défocalisation de chaque image. Ces anneaux représentent les zones où la CTF s'inverse en passant par un point où elle est nulle. L'aberration sphérique nous est donnée par le constructeur du microscope électronique ( $C_s = 1,8$ ).

## 1.6 La recherche des symétries

Le programme ALLSPACE est utilisé pour déterminer le groupe plan du cristal [105]. Les opérations de symétrie qui laissent invariant le réseau et font correspondre le motif d'une maille à celui contenu dans une autre maille, constituent ces groupes. Le programme teste les relations entre les phases données par l'image réelle et les amplitudes des spots dans l'espace réciproque pour toutes les symétries. Le groupe plan le plus probable parmi les 17 possibles ainsi que les résiduels de phases et les déplacements à appliquer pour être sur un centre de symétrie, y sont donnés.

## I.7 La génération des cartes de projection.

Les spots de diffraction de coordonnées  $(h,k)$  sur le réseau réciproque, correspondent à des pics dont la forme théorique est représentée par la fonction  $(\sin\Pi x/\Pi x)/(\sin\Pi y/\Pi y)$  [118]. Chaque pic possède une amplitude ( $A$ ) et une phase ( $\phi$ ). Ainsi, tous les spots de diffractions sont caractérisés par des facteurs de structure  $(h, k, A, \phi)$ .

La carte de projection finale est obtenue par la TF inverse à partir des facteurs de structures  $(h,k,A,\phi)$ . Elle résulte d'une moyenne de toutes les images traitées et corrigées. Pour cela, il est nécessaire de mettre toutes les images sur un même centre de symétrie et ceci par rapport à une référence qui elle-même est une combinaison des meilleures cartes.

## J. La cryomicroscopie électronique.

### J.1 La préparation de l'échantillon.

Les grilles ont une face en cuivre et l'autre en rhodium (Rh). L'utilisation du rhodium permet de limiter la contraction de la grille et donc le stress du film de carbone au moment de la congélation dans l'éthane liquide. Dans la microscopie électronique conventionnelle, les grilles sont recouvertes d'un film de carbone ou de plastique qui permet d'absorber les particules. Dans la cryomicroscopie électronique, les grilles sont recouvertes d'un film de carbone troué. La trame de carbone, dans ce cas, sert uniquement de support à la glace.

2  $\mu$ l d'une solution de SR à 0,3mg/ml est déposé sur une grille rendue hydrophile après effluage. La grille carbonée portant l'échantillon, est plongée rapidement dans de l'éthane liquide refroidi à la température de l'azote liquide, au moyen d'un dispositif appelé "plongeur" ou "guillotine". L'échantillon ainsi préparé est maintenu sous sa forme hydratée dans l'eau transformée en glace amorphe (eau vitreuse). La grille est transférée dans un porte-objet à froid (OXFORD CT3500) via une station de transfert où la grille est maintenue à la température de l'azote liquide. Le porte objet à froid permet de maintenir dans le microscope une température inférieure à  $-160^{\circ}\text{C}$  pendant toute la durée de l'observation par conduction thermique à partir d'un réservoir à azote liquide. Si la température de la grille dépasse  $-155^{\circ}\text{C}$ , la glace devient cubique (présence de taches blanches). Lorsque la température s'élève encore davantage, de la glace hexagonale se forme (présence de stries).

L'éthane est également une source de contamination (présence de taches opaques). Un anticontamineur bilames placé dans l'enceinte du microscope électronique (Philips CM200FEG) autour de l'échantillon, réduit les problèmes de contamination liés à la présence de vapeur d'eau et à la formation de givre sur la grille. L'observation se fait à 200 kV.

## J.2 La prise de photographies.

Afin d'éviter de brûler la zone d'intérêt, la prise de cliché s'effectue à faible dose d'électron, c'est à dire  $10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$  (low dose). Une zone d'intérêt est sélectionnée à faible grandissement ( $\sim 5\text{K}$ ) (mode SEARCH). Les réglages de la focalisation s'effectuent autour de la zone d'intérêt à un grandissement de 100K (mode FOCUS). Cette étape est possible grâce à la déflexion du faisceau d'électron par les lentilles électromagnétiques du microscope électronique. Cette déflexion et la distance entre les zones de focalisation et la zone d'intérêt sont définies par l'utilisateur. Une fois les réglages effectués, le faisceau est complètement dévié hors de l'échantillon afin de ne pas l'endommager davantage. Lors de la prise de photo avec la focalisation moyennée et le grandissement désiré, le faisceau est focalisé pendant une seconde sur la zone choisie (mode EXPOSURE).

Les films photographiques utilisés sont les SO-169 de chez KODAK. Le développement des négatifs s'effectue dans du D19 pur pendant 12 min.

## J.3 La digitalisation.

La digitalisation des clichés obtenus en cryomicroscopie électronique a été effectuée avec un microdensitomètre SCAI de chez ZEISS, piloté par le logiciel PHODIS.

# K. L'analyse d'images de cryomicroscopie électronique.

## K.1 La détermination de la défocalisation et de l'astigmatisme.

La transformée de Fourier de l'image d'un cristal est divisée en cinq secteurs. Chaque secteur est filtré pour éliminer le bruit, une CTF expérimentale est déduite à partir de l'observation des anneaux de Thon. Des CTF théoriques sont calculées pour chaque défocalisation compris entre  $1 \mu\text{m}$  et  $1,6 \mu\text{m}$  (avec un pas modifiable) et le programme informatique recherche pour chaque secteur le meilleur ajustement entre les CTF théoriques et la CTF expérimentale. La valeur de défocalisation

ainsi que l'astigmatisme d'une image sont obtenues en faisant la moyenne des données des cinq secteurs.

## K.2 Définir la distance de répétition.

La distance de répétition est estimée par la corrélation de deux zones rectangulaires séparées. Le principe du programme est de prendre une petite zone du tube (référence) et de trouver la meilleure corrélation avec une zone plus grande du tube. La zone référence ne doit pas inclure les bords du tube parce que les corrélations entre les bords affectent toutes les autres corrélations et donnent de fausses répétitions. Le programme donne également l'angle de rotation du tube. Les valeurs obtenues sont seulement approximatives et seront affinées plus tard.

Le premier intérêt de définir la distance de répétition, est d'identifier la (les) meilleure(s) région(s) du tube qui, via une TF, donne les "lignes de diffraction" (cf. Chap. III D.2) les plus fines et les mieux définies. La suite de l'analyse s'effectuera sur ces distances de répétition.

## K.3 L'indexation.

La détermination de l'ordre de Bessel ( $n$ ) de quelques-unes des "lignes de diffraction", permet d'établir la loi de l'hélice (équation 1). L'ordre de Bessel ( $n$ ) peut être déterminé à partir de la position de l'amplitude maximum des lignes de diffractions les plus intenses. Pour des hélices dont le pas est supérieur à deux tours,  $n$  et  $l$  sont reliés par une loi telle que :

$$l = pm + un$$

Cette loi est une équation de nombre entier avec :  $p$  qui correspond au pas de l'hélice,  $u$  le nombre d'unité asymétrique dans une répétition.  $m$  peut avoir une valeur positive ou négative. Les solutions de cette loi indiquent la fonction de Bessel associée à chaque "ligne de diffraction". Plus le nombre de fonction de Bessel est important, plus la résolution est haute.

## K.4 La correction du cristal.

La correction du cristal se base sur certains paramètres comme l'inclinaison, la rotation et le déplacement selon l'axe du tube  $z$ . Pour une correction efficace des déformations, la distance de répétition est divisée en six segments. La correction est effectuée indépendamment dans les six

segments. Pour éviter une fausse minimisation des valeurs des différents paramètres, il est nécessaire de commencer les cycles d'itération à partir de valeurs qui sont proches des vraies. Pour cela, les calculs sont réalisés à partir de la TF de la distance de répétition entière limitée à une basse résolution (1<sup>er</sup> anneau de thon) puis à haute résolution (TF entière). A partir des valeurs approximatives déterminées, les calculs se basent sur la TF des six segments. Enfin, les valeurs des trois paramètres de chacun des six segments, sont ramenés à une moyenne deux par deux, pour obtenir une distance de répétition divisée en trois. Les déformations du cristal sont corrigées sur les trois segments qui sont, par la suite, combinés en une distance de répétition entière.

### K.5 La moyenne des données et le calcul des cartes de projection.

La reconstruction 3D permet d'obtenir une structure 3D moyenne du cristal représentée par un ensemble de cartes de projection empilées les unes sur les autres. Pour générer ces cartes, la densité d'électron fournie par chaque ordre de Bessel (n) de la moyenne, en fonction de la distance radiale à partir de l'axe du tube, doit être calculée par une TF inverse.

## L. La chromatographie d'affinité sur une colonne agarose-Red120.

Pour ce type de chromatographie d'affinité, la phase stationnaire est de l'agarose sur lequel est greffé un groupement triazine ou réactif Red120 (Figure 60). Habituellement, l'effecteur greffé est un substrat, un ligand ou un anticorps. Dans ce cas, l'effecteur correspond à un inhibiteur de l'ATPase calcium qui se lie au site catalytique [130, 149]. L'élution peut être réalisée de deux façons :

- La compétition avec un nucléotide non hydrolysable (AMP-PNP ou ADP).
- Un tampon de force ionique différente de celle ayant permis le dépôt sur la colonne (KCl ou NaCl).

Différents milieux ont été choisis afin de stabiliser préférentiellement les formes  $E_1Ca_2$ ,  $E_2H_3TG$ ,  $E_2H_3VO_4$  et EP de l'ATPase calcium (native ou marquée au FITC) solubilisée en  $C_{12}E_8$  (0,5 %) :

- $E_1Ca_2$  : 20 mM MOPS-Tris pH 7, 1 mM  $Mg^{2+}$ , 20 % glycérol (poids/vol.) et 8 mM  $Ca^{2+}$ .
- $E_2H_3TG$  : 20 mM MOPS-Tris pH 7, 1 mM  $Mg^{2+}$ , 20 % glycérol (poids/vol.), 5 mM EGTA et 1,5 mole TG / mole ATPase.

- $E_2H_3VO_4$  : 20 mM MOPS-Tris pH7, 1 mM  $Mg^{2+}$ , 20 % glycérol (poids/vol.), 1 mM EGTA, 1,5 moles TG / mole ATPase et 50  $\mu M$   $VO_4$ .
- EP : La phosphorylation a été réalisée comme décrit plus haut et détaillée dans Chap. III A.1.2a. Puis, les vésicules ont été centrifugées et le culot a été suspendu dans le tampon de solubilisation en présence de 1 mM EGTA et 1,5 moles TG / mole ATPase.

La colonne de chromatographie est une seringue de 1 ml qui a été remplie avec 0,8 ml de résine agarose-Red120 (SIGMA R0503 type 30000-CL). La colonne a été lavée avec 5 ml d'eau et équilibrée avec le tampon de solubilisation (0,5 %  $C_{12}E_8$ ). Après le dépôt (2,5 ml), la colonne a été lavée avec 4 ml de tampon de solubilisation (0,1 %  $C_{12}E_8$ ). Les fractions récupérées lors de l'éluion des protéines ont un volume de 0,25 ml.

L'ATPase calcium contient 13 tryptophanes dont la plupart sont à l'interface entre les têtes polaires et les chaînes aliphatiques des lipides. Le spectre d'émission de la protéine, pour une excitation à 295 nm, présente un maximum à 330 nm, caractéristique des tryptophanes. Ainsi, la quantité de protéine contenue dans chaque fraction a été déterminée en mesurant soit la fluorescence intrinsèque de l'ATPase calcium native ou de la FITC-ATPase, soit la fluorescence du FITC lié à la Ca-ATPase.

## M. La trypsinisation de la FITC-ATPase.

La FITC-ATPase (1 mg/ml) a été digérée par la trypsine (0,02 mg/ml) pendant 30 s, 2, 5 et 10 min à 20°C. La digestion est effectuée dans un tampon MOPS-NaOH, pH 6,6, 5 mM  $Mg^{2+}$ , 20 % glycérol et 100  $\mu M$   $Ca^{2+}$  pour  $E_1Ca_2$ , 5 mM EGTA et 1,5 mole TG / mole ATPase pour  $E_2H_3TG$  ou 5 mM EGTA, 1,5 mole TG / mole ATPase et 50  $\mu M$   $VO_4$  pour  $E_2H_3VO_4$  ou 5 mM EGTA, 1,5 mole TG / mole ATPase et 1 mM  $décaVO_4$  pour  $E_2H_3décaVO_4$ . Le dérivé  $E_2H_3P$  stable a été formé et digéré dans un tampon qui contenait 5 mM EGTA, 5 mM  $Mg^{2+}$  et 10 mM Pi. Le dérivé EP stable a été formé dans le même tampon que celui utilisé pour la digestion avec 10mM AcP, 5 mM EGTA et 1,5 mole TG / mole ATPase. La formation du dérivé EP dans ces conditions expérimentales (pH 6,6 et 20 % glycérol), a été contrôlée en suivant la fluorescence du FITC comme décrit plus haut.



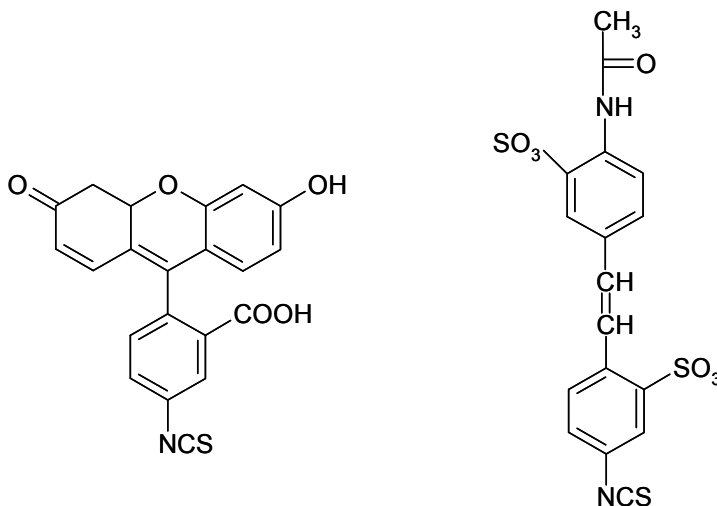
## Chapitre III - résultats

### A. La formation d'un dérivé phosphorylé covalent stable de l'ATPase calcium marquée par le FITC.

#### A.1 La formation d'un intermédiaire catalytique à bas niveau de fluorescence de l'ATPase calcium marquée par le FITC.

##### A.1.1 Le marquage de l'ATPase calcium par le FITC.

En 1980, Pick et Karlish ont mis en évidence que l'ATPase calcium pouvait être marqué de façon spécifique et covalente par une sonde fluorescente [106], le FITC (fluorescein-4-isothiocyanate, Figure 22A). Cette sonde modifie la **Lys515** déprotonée, située dans le domaine de liaison du nucléotide. L'entrée du site étant moins accessible, l'ATPase calcium modifiée par le FITC (FITC-ATPase) ne peut plus être phosphorylée par l'ATP. Néanmoins, elle peut toujours réagir avec des pseudosubstrats comme le paranitrophénylphosphate (pNPP) ou l'acétylphosphate (AcP) [106 - 107]. Enfin, la FITC-ATPase peut encore être phosphorylée par l'orthophosphate Pi à partir de la forme  $E_2H_3$ .



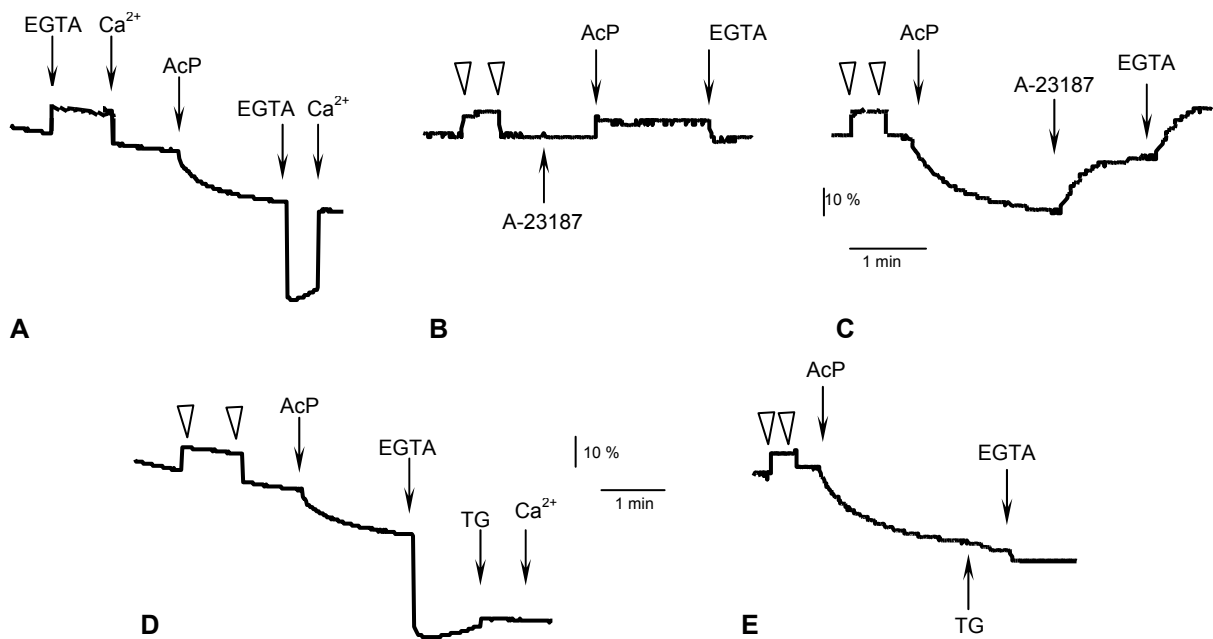
**Figure 22** - Les structures développées du FITC et du SITS.

##### A.1.2 La caractérisation des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase- $Ca^{2+}$ , par les changements de l'intensité de fluorescence du FITC lié à la protéine.

L'intensité de fluorescence du FITC liée à l'ATPase- $Ca^{2+}$ , varie en fonction de la conformation de la protéine [107 - 108]. L'étude de ces variations permet de caractériser les intermédiaires conformationnels qui apparaissent au cours du cycle catalytique.

**a) La formation de l'espèce à bas niveau de fluorescence en présence d'AcP.**

L'addition d'EGTA sur des vésicules de RS, provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence de 10 % par rapport à l'intensité initiale (Figure 23). Cette variation caractérise la transconformation  $E_1Ca_2$  vers la forme  $E_2H_3$ . L'addition de calcium permet le retour à la forme  $E_1Ca_2$  et de ce fait à l'état de fluorescence initial [107]. Sous la forme  $E_1Ca_2$ , la FITC-ATPase est mise en présence d'AcP, ce qui induit une décroissance de l'intensité de fluorescence du FITC, d'environ 20 % par rapport à l'intensité initiale (Figure 23A). Si les vésicules de RS sont incubées en absence de calcium libre (milieu EGTA), nécessaire à la phosphorylation, alors l'addition d'AcP ne produit pas d'effet. Des expériences de  $^{45}Ca^{2+}$  ont démontré qu'en présence d'AcP, la FITC-ATPase est toujours capable de transporter et d'accumuler du calcium dans les vésicules de RS [108]. La chélation du calcium extravésiculaire par l'addition d'EGTA après la charge active des vésicules, induit une forte diminution de l'intensité de fluorescence du FITC de 50 % par rapport à l'intensité initiale (Figure 23A).

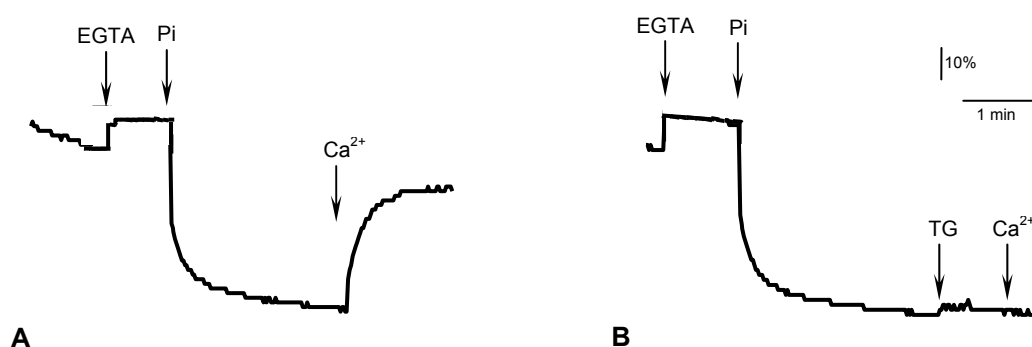


**Figure 23 - La formation du dérivé à bas niveau de fluorescence à partir d'AcP en présence de  $Ca^{2+}$**  – La cuvette contient un tampon 50 mM MOPS-Tris (pH 7, 20°C), 0,1 M KCl, 5 mM  $MgCl_2$  et des vésicules de RS (1 mg/ml FITC-ATPase). Pour contrôle interne, une addition de 90  $\mu$ M EGTA suivie de 100  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  ( $\nabla\nabla$ ). La phosphorylation s'effectue par addition de 10 mM d'AcP, (A) 5 mM EGTA et 5 mM  $Ca^{2+}$ , (B, C) 50  $\mu$ g/ml ionophore A-23187, (D, E) 5 mM EGTA, 12  $\mu$ M thapsigargine (TG) et (D) 5 mM  $Ca^{2+}$ .

Cette nouvelle conformation de l'enzyme apparaît comme une espèce caractérisée par un **bas niveau de fluorescence**. L'addition de calcium permet à la FITC-ATPase de reprendre son cycle catalytique (Figure 23A). Cette nouvelle espèce à bas niveau de fluorescence est donc sensible à la présence de calcium extravésiculaire. L'addition de ionophore calcique (A-23187) avant ou après celle de l'AcP abolit complètement la formation de l'espèce à bas niveau de fluorescence (Figures 23B et C). Ainsi, la formation de l'espèce à bas niveau de fluorescence par l'addition d'EGTA en présence d'AcP, est liée à la présence d'un gradient calcique à travers la membrane des vésicules de RS.

### b) La formation de l'espèce à bas niveau de fluorescence en présence de Pi.

L'addition d'EGTA sur des vésicules préchargées passivement en calcium, provoque la formation d'un gradient transmembranaire de calcium, ainsi qu'une augmentation de l'intensité de fluorescence de 10 % par rapport à l'intensité initiale (Figure 24). Cette variation caractérise la transconformation  $E_1Ca_2$  vers la forme  $E_2H_3$ . L'addition de phosphate inorganique sur la forme  $E_2H_3$ , induit une décroissance de l'intensité de fluorescence de 35 % (Figure 24). Nous observons que l'amplitude du signal est moins importante que celle obtenue par l'addition d'AcP (Figure 23A). La nouvelle espèce formée est sensible à la présence de calcium extravésiculaire. En effet, l'addition de calcium permet le retour à l'intensité de fluorescence de la forme  $E_1Ca_2$  (Figure 24A). Il est donc également possible d'obtenir le dérivé à bas niveau de fluorescence par l'addition de phosphate inorganique en présence d'un gradient calcique à travers la membrane des vésicules.



**Figure 24: La formation du dérivé à bas niveau de fluorescence à partir de phosphate inorganique Pi en présence d'EGTA** – La cuvette contient un tampon 50 mM MOPS-Tris (pH 7, 20°C), 0,1 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> et des vésicules de RS (1 mg/ml ATPase-FITC), préalablement préchargées en calcium pendant 1 heure à 20 mg/ml d'ATPase-FITC en présence de 5 mM Ca<sup>2+</sup>. Le gradient de calcium à travers la membrane des vésicules est initié par l'addition de 5 mM EGTA. (A) addition de 10 mM Pi suivie de 5 mM Ca<sup>2+</sup>. (B) addition de 12 μM thapsigargine (TG) puis de 5 mM Ca<sup>2+</sup>.

### c) La stabilisation de l'espèce à bas niveau de fluorescence par la thapsigargine.

Pick a décrit ce dérivé à bas niveau de fluorescence comme étant instable au cours du temps ( $t_{1/2} \approx 200$  s) [107]. Cette instabilité est due en partie, à une trop faible concentration en EGTA, laissant une concentration extravésiculaire en calcium libre encore trop importante. En 2001, de nouvelles études ont été menées sur cet intermédiaire inhabituel de la FITC-ATPase [108]. L'espèce à bas niveau de fluorescence, obtenue en présence d'AcP ou de phosphate inorganique, puis par chélation du calcium extravésiculaire par de l'EGTA, est stabilisée par une plus forte concentration en EGTA et surtout par la **thapsigargine** (Figure 23D), un inhibiteur spécifique des SERCA [64 -65]. L'addition de calcium sur l'espèce à bas niveau de fluorescence stabilisée par la thapsigargine, ne produit plus d'effet (Figure 23D et 24B). Par contre, l'addition de thapsigargine avant celle de l'EGTA ne permet pas de former l'espèce à bas niveau de fluorescence (Figure 23E).

## A.2 L'espèce à bas niveau de fluorescence est une forme phosphorylée covalente de la FITC-ATPase.

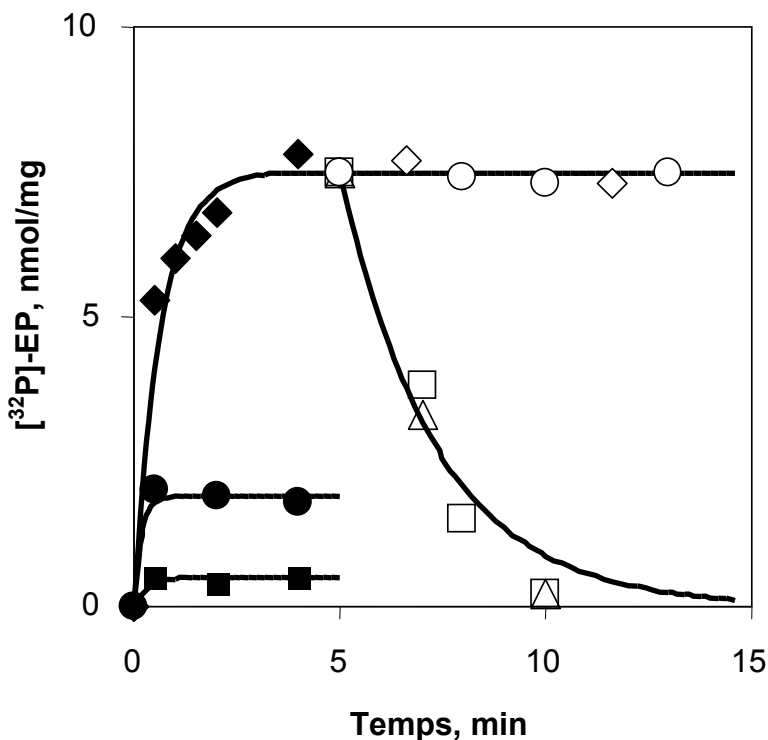
La caractérisation de l'espèce à bas niveau de fluorescence est réalisée à l'aide, soit d'AcP radiomarqué [ $^{32}\text{P}$ ]AcP en présence de calcium extravésiculaire qui est accumulé activement, soit de phosphate inorganique radioactif [ $^{32}\text{P}$ ]Pi à partir de vésicules préchargées passivement en calcium.

### A.2.1 La phosphorylation de la FITC-ATPase par le [ $^{32}\text{P}$ ]AcP en présence de calcium.

Après l'addition de [ $^{32}\text{P}$ ]AcP sur des vésicules en présence de calcium (temps zéro), nous observons une accumulation de phosphoenzyme au cours du temps (Figure 25, losange plein). Le taux maximal de phosphorylation, obtenu dans ces conditions, est de 8 nmol/mg de protéine (Figure 25, losange plein). Ce taux correspond à 100 % de FITC-ATPase phosphorylée. Le taux de phosphorylation est réduit à 2 nmol/mg de protéine en présence de ionophore A-23187 (Figure 25, cercle plein). Dans ces conditions où les ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  pompent du calcium sans qu'il soit accumulé dans les vésicules, les protéines se répartissent entre les formes phosphorylées et non phosphorylées. L'accumulation maximale de FITC-ATPases phosphorylées est donc liée à la formation d'un gradient calcique, qui permet de bloquer les protéines à l'état phosphorylé. Enfin, le taux de phosphorylation est de 0,5 nmol/mg de protéine en milieu EGTA (Figure 25, carré plein), ce

qui confirme que la présence de calcium est nécessaire pour une phosphorylation maximale de la FITC-ATPase.

Après la phosphorylation complète de toutes les FITC-ATPases ( $t \approx 2$  min), l'addition de l'ionophore A-23187, qui permet la dissipation du gradient calcique formé, provoque une déphosphorylation rapide des protéines (Figure 25, triangle vide). L'addition d'EGTA, qui permet d'obtenir le dérivé à bas niveau de fluorescence, n'induit pas de déphosphorylation (Figure 25, cercle vide). L'addition d'EGTA puis de thapsigargine permet aussi de garder un niveau de phosphorylation élevé (Figure 25, losange vide). Enfin, l'addition de thapsigargine puis d'EGTA provoque une chute très rapide du niveau de phosphoenzyme (Figure 25, carré vide).

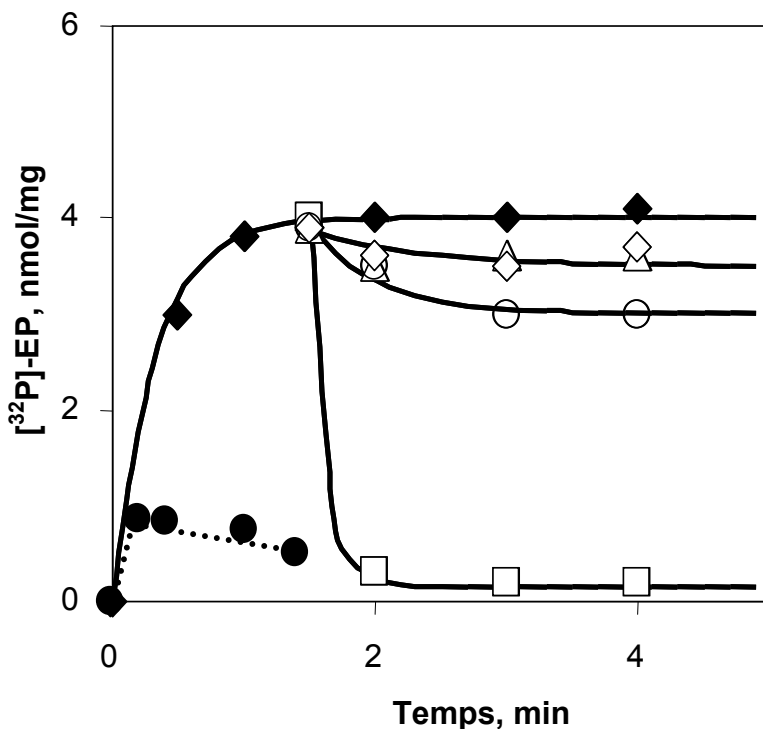


**Figure 25 - La stabilité du dérivé phosphorylé obtenu à partir de  $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$  en présence de calcium** – La phosphorylation est effectuée en présence de calcium : losange plein, calcium et A-23187 : cercle plein et EGTA : carré plein. Après la charge en calcium, nous avons ajouté A-23187 : triangle vide, EGTA : cercles vide, EGTA puis TG : losange vide ou TG puis EGTA : carré vide.

#### A.2.2 La phosphorylation de la FITC-ATPase par le $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ .

Champeil et ses collaborateurs [108] ont décrit qu'après l'addition de  $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$  sur des vésicules préchargées en calcium et en présence d'EGTA (temps zéro), ils observaient une accumulation de phosphoenzyme au cours du temps (Figure 26 losange plein). Le taux maximal de phosphorylation, obtenu dans ces conditions, est de 4 nmol/mg de protéine (Figure 26, losange plein). Le taux est plus bas que celui obtenu lors de la phosphorylation par le  $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$ . Cette différence est probablement due à la perméabilité de certaines vésicules, qui en perdant leur calcium intravésiculaire ne peuvent plus

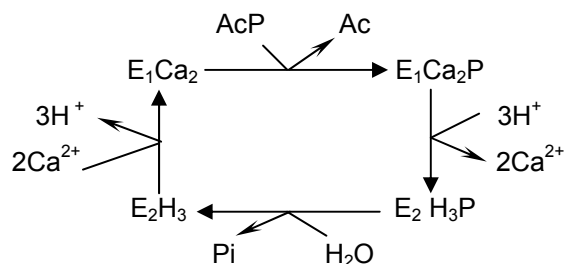
être phosphorylées de façon maximale. Néanmoins, le taux est supérieur à celui obtenu dans les mêmes conditions à partir d'ATPases natives ( $\approx 1$  nmol/mg, Figure 26, cercle plein). L'ATPase native phosphorylée est instable au cours du temps (Figure 26, cercle plein), contrairement à la FITC-ATPase phosphorylée dont le niveau reste élevé sur plusieurs minutes (Figure 26A, losange plein). L'addition de phosphate inorganique froid ne diminue pas le niveau de phosphoenzyme (Figure 26, cercle vide). Cette stabilité démontre que le dérivé phosphorylé obtenu n'est pas en équilibre rapide avec une forme non phosphorylée et du phosphate inorganique (Schéma 4). L'addition de thapsigargine n'induit pas de déphosphorylation de la FITC-ATPase (Figure 26, triangle vide). L'addition de calcium sur l'enzyme non stabilisé par la thapsigargine, fait chuter très rapidement le niveau de phosphoenzyme (Figure 26, carré vide).



**Figure 26 - La stabilité du dérivé phosphorylé obtenu à partir de vésicules préchargées en calcium et de [<sup>32</sup>P]Pi en présence d'EGTA –** Après la phosphorylation, nous avons soit rien ajouté : losange plein, soit ajouté du calcium : carré vide, Pi froid : cercle vide, TG : triangle vide ou A-23187 : losange vide. La phosphorylation de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> native est représentée par les cercles pleins.

Les résultats des expériences de fluorescence (cf. A.1) et de phosphorylation par le [<sup>32</sup>P]AcP ou le [<sup>32</sup>P]Pi, nous permettent de conclure que (i) la décroissance de l'intensité de fluorescence du FITC après l'addition d'AcP, caractérise l'accumulation de phosphoenzyme, concomitante à l'accumulation de calcium dans les vésicules (ii) la décroissance de l'intensité de fluorescence du FITC après l'addition de phosphate inorganique, caractérise l'accumulation de phosphoenzyme (iii) la chélation du calcium extravésiculaire par l'EGTA permet la formation d'un dérivé à bas niveau de fluorescence, qui correspond à une forme **phosphorylée covalente de la FITC-ATPase (EP)**.

**Schéma 4 :** Le cycle catalytique du transport du calcium par l'ATPase calcium de type PIIA en présence d'AcP.



## B. Le dérivé phosphorylé covalent stable ne peut pas être obtenu lorsque l'ATPase calcium est marquée par le SITS.

Afin de mieux comprendre le rôle du FITC dans la formation de cet intermédiaire à bas niveau de fluorescence, nous nous sommes intéressés à une autre sonde fluorescente qui possède le même réactif thycyanate, le SITS (acide 4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène disulfonique, Figure 22B).

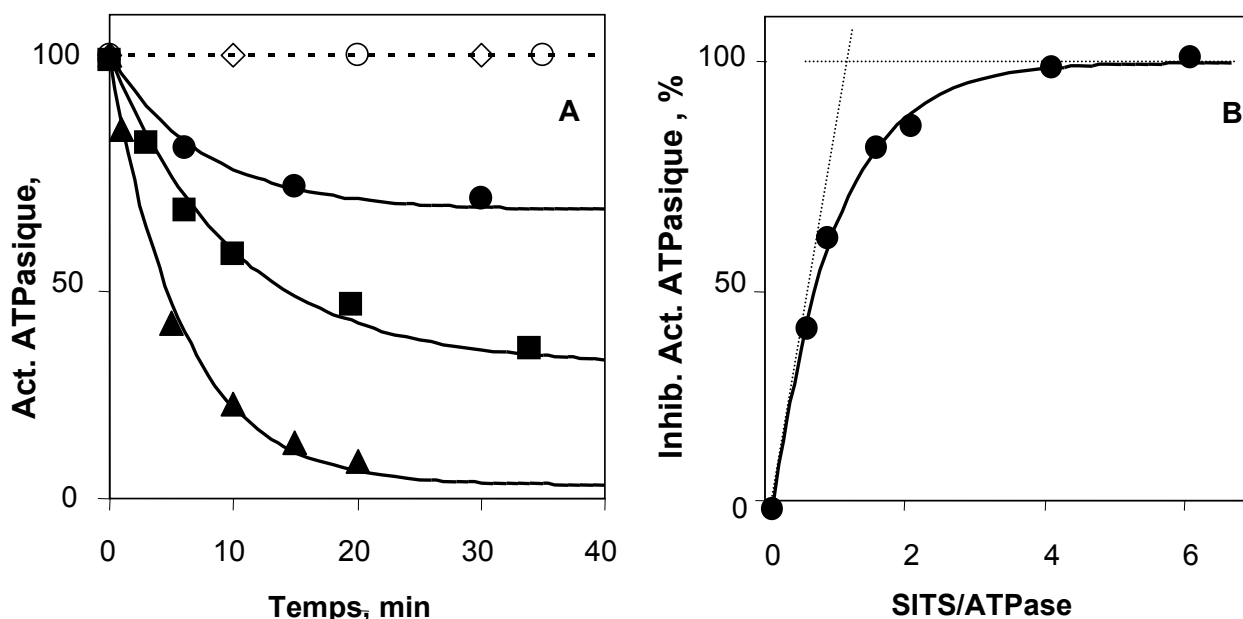
### B.1 Le marquage de l'ATPase calcium par le SITS.

Le SITS a été utilisé pour inhiber, *in vivo* ou *in vitro*, l'activité ATPasique de la Na,K-ATPase [109 - 110]. Cette inhibition de la Na,K-ATPase est dû à la modification spécifique et covalente par le SITS de la Lys501, située dans le domaine de fixation du nucléotide [123]. Cette Lys501, qui appartient à la séquence consensus **KGAXR** des ATPases de type PII (cf. introduction), est équivalente à la Lys515 de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>.

#### B.1.1 L'inactivation de l'ATPase calcium par le SITS.

L'incubation de vésicules de RS en présence de SITS provoque une rapide et complète inactivation de l'activité ATPasique de l'ATPase calcium (Figure 27A, symboles pleins). Cette inhibition dépend du temps d'incubation et du rapport SITS/ATPase. Nous avons contrôlé que l'incubation de l'ATPase calcium dans les mêmes conditions mais en absence de SITS, ne modifiait pas son activité ATPasique (Figure 27A, ronds vides). L'inactivation de l'enzyme par le SITS est réduite en présence d'ADP (données non présentées). Ce phénomène de protection nous indique que le SITS doit interagir avec le domaine de fixation du nucléotide de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>. Le pseudosubstrat pNPP réagit toujours avec l'enzyme inhibée par le SITS (Figure 27A, losanges vides), ce qui suggère que le SITS n'interagit pas avec le domaine de phosphorylation. L'incubation d'une mole d'ATPase

avec différentes quantités de SITS, permet de déterminer une stœchiométrie SITS/ATPase de 1:1 (mole/mole) pour obtenir 100 % d'inhibition (Figure 27B).



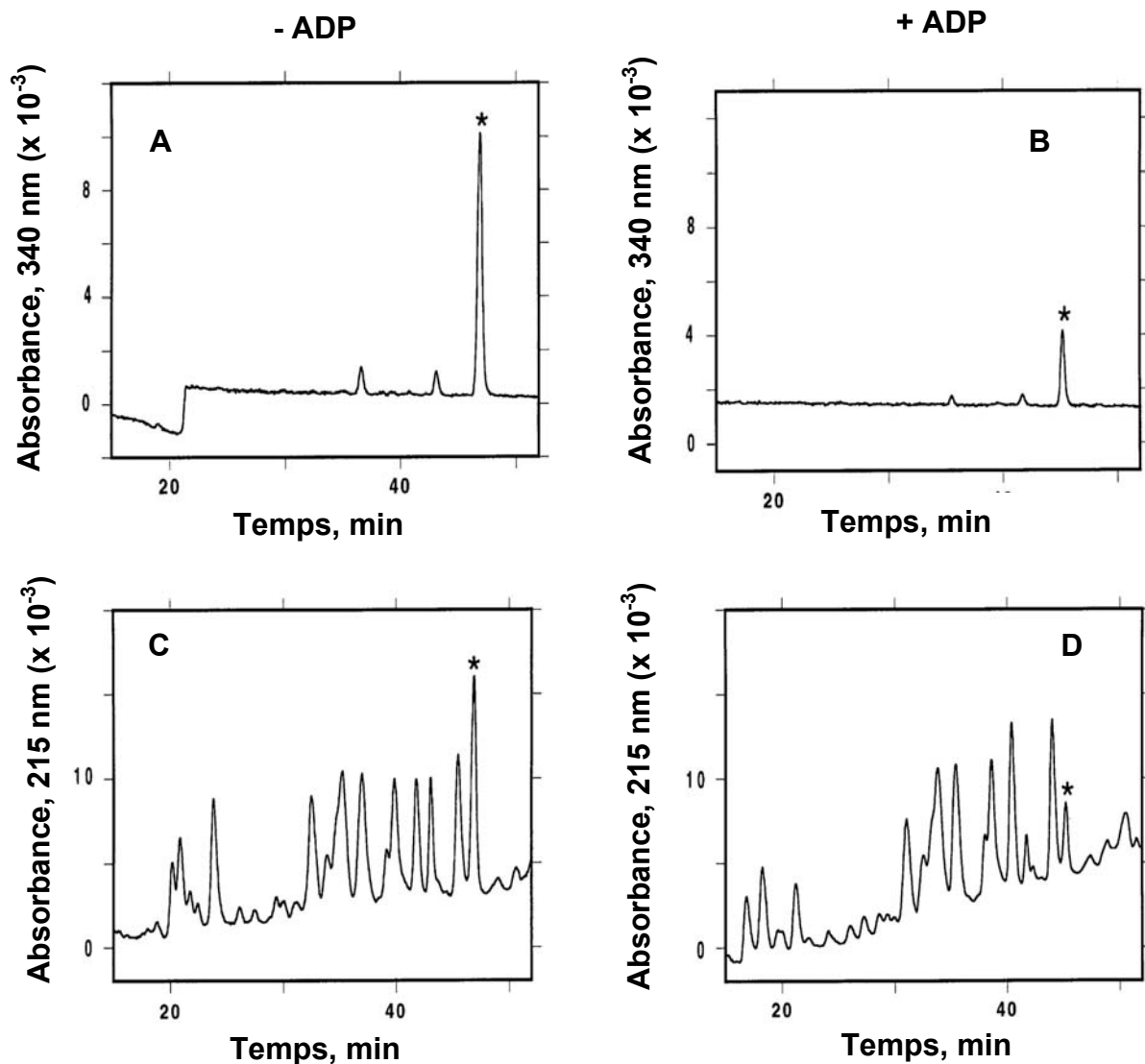
**Figure 27 - L'inactivation de l'activité ATPasique de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> par le SITS** – (A) La protéine est incubée à 1 mg/ml (pH 9) en présence de 5 μM: cercle plein, 15 μM: carré plein et 40 μM de SITS: triangle plein. Les losanges vides correspondent l'activité ATPasique de l'enzyme incubée dans le même milieu en absence de SITS. Les cercles vides correspondent à l'activité pNPPasique après l'inactivation totale de l'enzyme par le SITS. (B) Le pourcentage d'inhibition de l'activité ATPasique de la Ca-ATPase en fonction du rapport SITS/ATPase (mole/mole) après 1h d'incubation.

### B.1.2 L'ATPase calcium est marquée de façon covalente et spécifique par le SITS.

L'ATPase calcium incubée en présence de SITS (stœchiométrie 1:1 mole/mole) avec ou sans d'ADP, est digérée par la trypsine. Les fragments peptidiques obtenus sont séparés et analysés par chromatographie liquide (HPLC) sur une colonne C<sub>4</sub> (phase inverse). Deux chromatogrammes sont acquis à 215 nm et 340 nm pour chaque condition expérimentale, afin d'identifier la présence respectivement d'acides aminés et de SITS (Figure 28). En effet, le SITS présente une bande d'absorption avec un maximum à 340 nm (Figure 21A). Nous avons vérifié qu'aucun pic à 340 nm n'était présent lorsque l'ATPase calcium est incubée dans les mêmes conditions, mais en absence de SITS. Les chromatogrammes de la protéine incubée en présence de SITS puis digérée par la trypsine montrent un pic à 215 nm qui correspond au pic majoritaire à 340 nm (Figures 28A et C ; symbole \*). Ces deux pics à 215 nm et 340 nm, sont moins intenses lorsque l'incubation est effectuée en présence d'ADP (Figures 28B et D). L'effet protecteur de l'ADP confirme celui observé dans les



expériences d'inhibition de l'activité ATPasique par le SITS. Afin de déterminer le résidu de l'ATPase calcium qui a été modifié par le SITS, la fraction qui montre une absorption à 340 nm a été isolée et la séquence du fragment peptidique marqué a été déterminée. Les acides aminés détectés à chaque cycle sont présentés dans le tableau 2 et correspondent à la région Met512-Arg524 de la protéine. Le résidu 515, qui est une lysine, n'a pas été détectée, ce qui montre que le SITS réagit de façon covalente et spécifique avec cette Lys515, produisant un résidu lysine modifié non reconnu lors du séquençage.



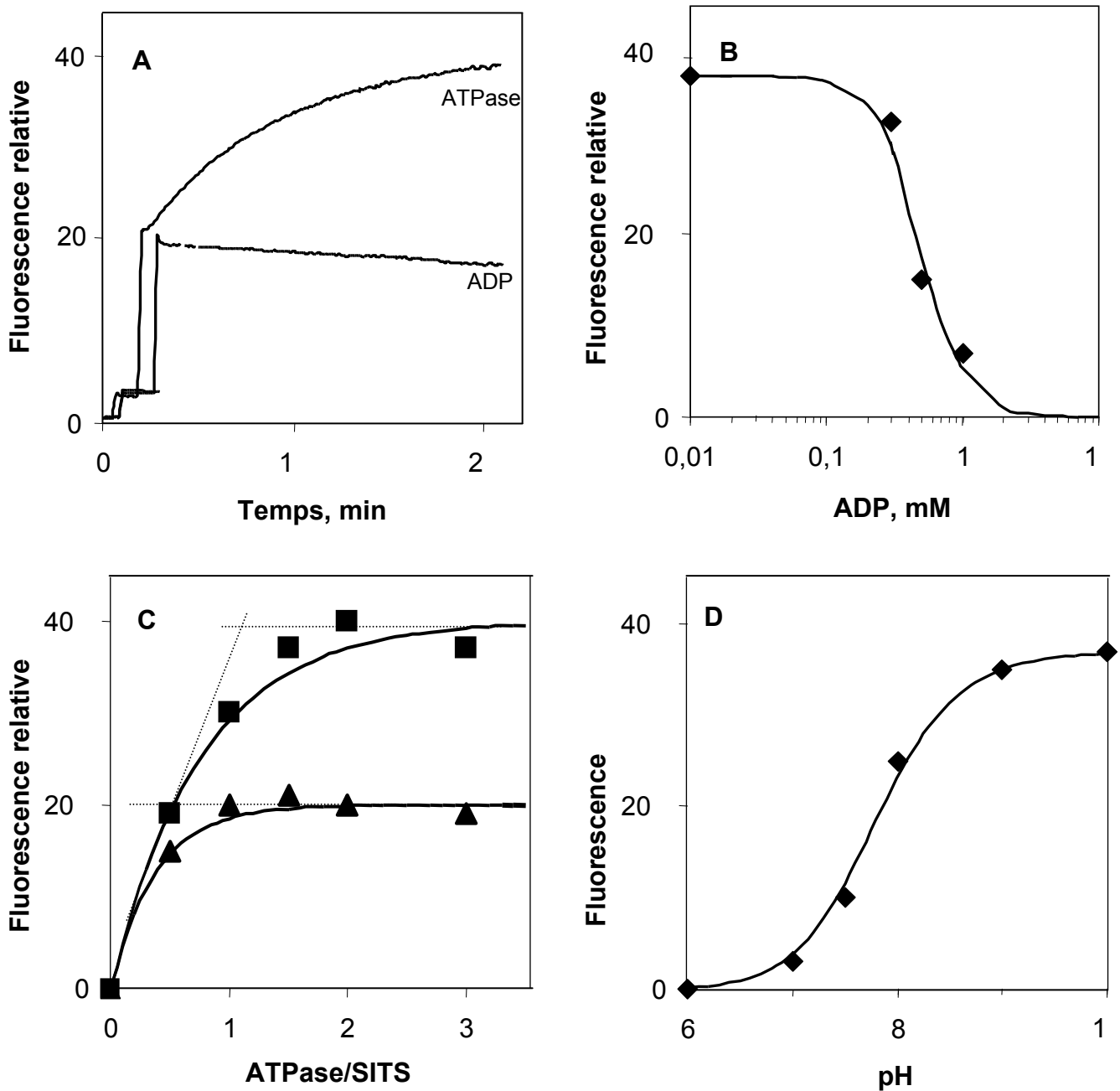
**Figure 28** - Les chromatogrammes HPLC des fragments peptidiques de la SITS-ATPase à 215 et 340 nm – L'ATPase est incubée en présence de SITS (stœchiométrie de 1:1 mole/mole) avec (A, C) ou sans ADP (B, D). Les fragments peptidiques obtenus par digestion à la trypsine sont séparés par HPLC en phase inverse (colonne C<sub>4</sub>) avec un débit de 0,3 ml/min et un gradient linéaire d'acétonitrile. Le pic marqué du symbole \* indique la présence de SITS.

Tableau 2 : Le séquençage du peptide marqué par le SITS.

Cycle	Résidu	N° résidu
1	Met	512
2	Phe	513
3	Val	514
4	X	515
5	Gly	516
6	Ala	517
7	Pro	518
8	Glu	519
9	Gly	520
10	Val	521
11	Iso	522
12	Asn	523
13	Arg	524

### B.1.3 Le marquage de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> est suivi par les changements de fluorescence du SITS.

La fixation du SITS sur l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> peut être suivie par les changements de sa fluorescence (Figure 29). Une exaltation de la fluorescence du SITS est observée en présence d'ATPase-Ca<sup>2+</sup> (Figure 29A, ATPase). La cinétique observée correspond à celle observée pour l'inhibition de l'activité ATPasique (Figure 27A). Aucun changement de l'intensité de fluorescence du SITS n'est observé en présence d'ATPase-Ca<sup>2+</sup> et d'ADP (Figure 29A, ADP). Cet effet protecteur de l'ADP confirme celui observé précédemment (cf. B.1.1 et B.1.2). Une protection de 50 % est observée pour une concentration de 0,4 mM d'ADP (Figure 29B). Cette concentration est proche de celle déterminée pour la protection de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> par l'ATP lors sa modification par le FITC [132]. La figure 29C permet d'observer un effet de saturation pour le marquage de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> en fonction du rapport SITS/ATPase (Figure 29C, carré plein : 5 µM SITS, triangle plein : 10 µM SITS). Nous trouvons une stœchiométrie de marquage 1:1 (mole/mole). L'intensité de fluorescence du SITS, à une concentration fixe, ne varie pas en fonction du pH (Figure 21B). Cependant, l'amplitude des changements de l'intensité de fluorescence du SITS en présence d'ATPase-Ca<sup>2+</sup> dépend du pH (Figure 29D). L'état de protonation de la Lys515, avec laquelle le SITS réagit, est donc important et un pK de 7,8 a été déduit. Le SITS modifie la Lys515 à l'état déprotonée.

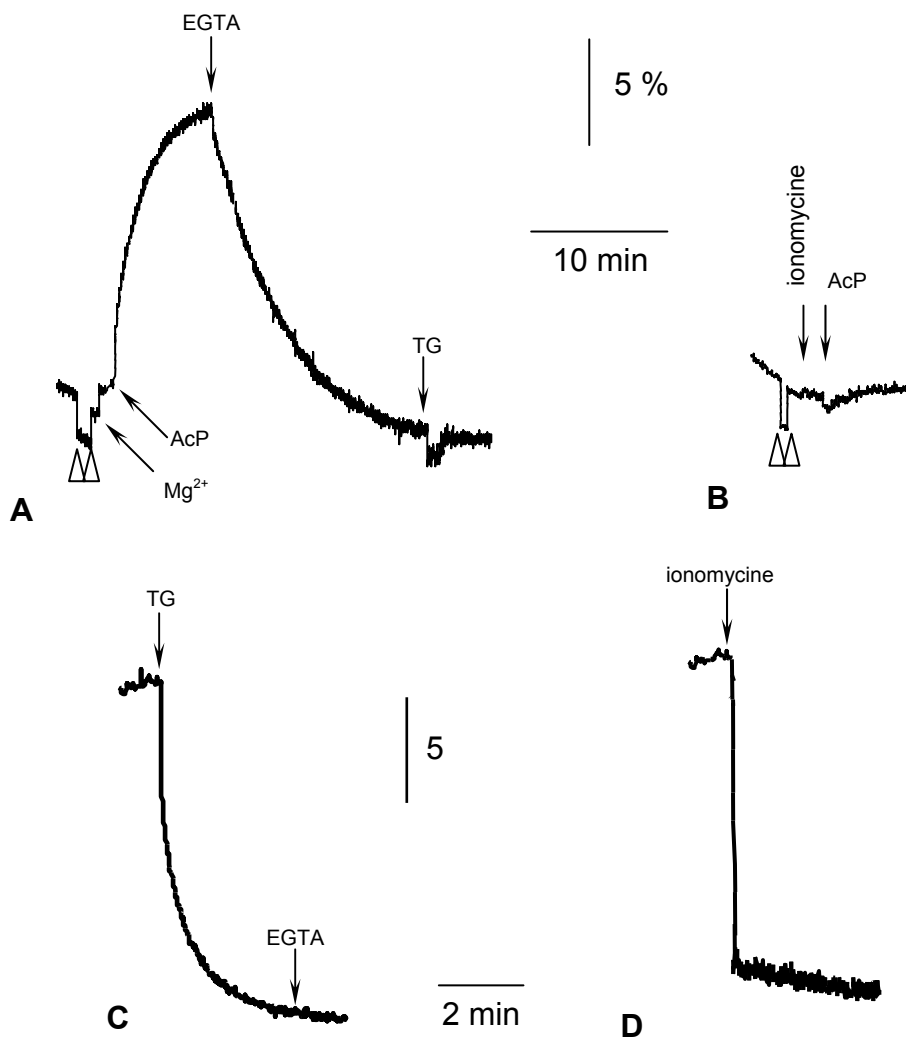


**Figure 29** - La modification de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> par le SITS suivie par les changements de la fluorescence du SITS – (A) Les changements de l'intensité de fluorescence du SITS en présence d'ATPase et d'ADP. Cette exaltation de la fluorescence du SITS au cours de la modification de l'enzyme, est fonction (B) de la concentration en ADP, (C) du rapport ATPase/SITS et (D) du pH.

## B.2 La caractérisation des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ marquée par le SITS.

### B.2.1 Les changements de l'intensité de fluorescence du SITS lié à la protéine.

L'intensité de fluorescence du SITS liée à l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , varie avec la fixation de différents ligands. L'étude de ces variations permet de caractériser les intermédiaires réactionnels qui apparaissent au cours du cycle catalytique.



**Figure 30 - Les changements de la fluorescence du SITS lié à la protéine aux cours du cycle catalytique** – La cuvette contient un tampon 50 mM MOPS-Tris (pH 7, 20°C), 0,1 M KCl, et 1 mg/ml de vésicules de RS marquées par le SITS. (A) 90  $\mu\text{M}$  EGTA suivie de 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $\nabla\nabla$ ), puis 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . La phosphorylation s'effectue par addition de 10 mM d'AcP, puis addition de 5 mM EGTA et 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (B) 10  $\mu\text{M}$  thapsigargine (TG) et 5 mM EGTA, (C) 50  $\mu\text{M}$  ionomycine.

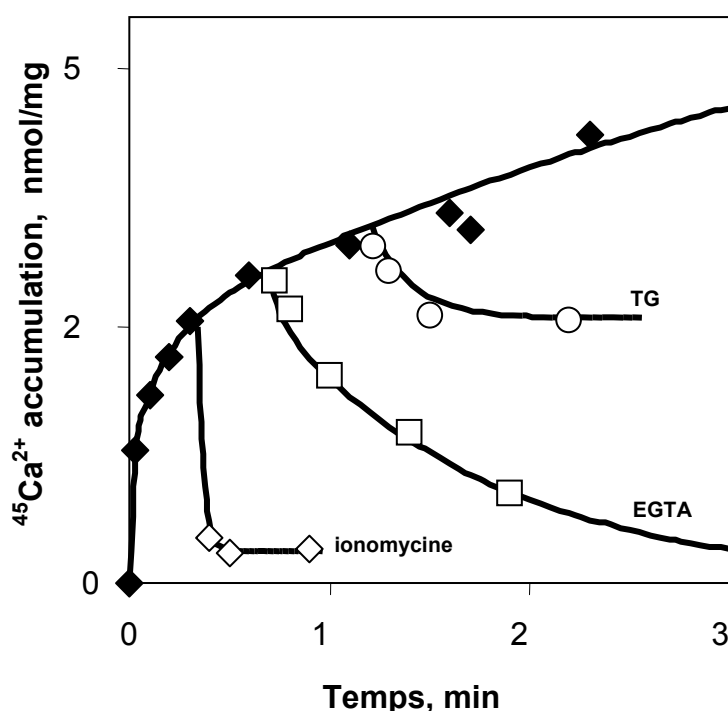
L'addition d'EGTA sur des vésicules de RS, provoque une diminution de l'intensité de fluorescence de 4 % par rapport à l'intensité initiale (Figures 30A). Cette variation caractérise la transconformation  $E_1Ca_2$  vers la forme  $E_2H_3$ . L'addition de calcium permet le retour à la forme  $E_1Ca_2$  et donc au signal de départ. L'addition de magnésium provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence de 2 % et correspond à la fixation du  $Mg^{2+}$  au site nucléotidique. Ce niveau de fluorescence caractérise la forme  $E_1Ca_2Mg$  (Figures 30A). L'addition d'AcP induit une augmentation de l'intensité de fluorescence du FITC d'environ 10 % par rapport à l'intensité initiale (Figure 30A). La présence d'un ionophore calcique, l'ionomycine, réduit dramatiquement l'amplitude du signal (Figure 30B), la formation d'un gradient calcique est donc importante. La chélation du calcium extravésiculaire par l'addition d'EGTA, induit une décroissance lente de l'intensité de fluorescence de 15 % (Figure 30A,  $t_{1/2} \approx 5$  min). Le signal revient au niveau de la forme  $E_2H_3$ . L'addition de thapsigargine ne produit pas d'effet. La décroissance du signal est plus rapide lorsque la thapsigargine est ajoutée en premier suivie de l'addition de l'EGTA (Figure 30C,  $t_{1/2} \approx 1$  min). L'addition d'ionomycine induit une chute brutale de l'intensité de fluorescence du SITS, encore plus rapide que les deux précédentes (Figure 30D).

### B.2.2 Le transport et l'accumulation de $^{45}Ca^{2+}$ par la SITS-ATPase.

Nous avons mesuré l'accumulation du  $^{45}Ca^{2+}$  en présence d'AcP, à partir de vésicules dont les protéines ont été marquées par le SITS (Figure 31). Dès les premières secondes (30 s), nous observons que 13 nmoles de  $^{45}Ca^{2+}$  sont liées par mg de protéine, ce qui correspond à l'occupation rapide des sites de haute affinité pour le calcium (Figure 31, losanges pleins). Puis, nous observons une augmentation lente du taux de  $^{45}Ca^{2+}$  au cours du temps, ce qui correspond à une accumulation du calcium dans les vésicules (Figure 31, losange plein).

Cette cinétique est proche de celle déterminée à partir d'ATPases- $Ca^{2+}$  non modifiée (résultat non présenté). En présence d'AcP, la SITS-ATPase est donc toujours capable de transporter et accumuler du calcium dans les vésicules, qui sont restées étanches après le marquage. L'addition de ionomycine permet la sortie rapide du  $^{45}Ca^{2+}$  accumulé dans les vésicules (Figure 31, losange vide). Il reste un résiduel de 4 nmoles de  $^{45}Ca^{2+}$  par mg de protéine encore liées à la SITS-ATPase. Les additions d'EGTA (Figure 31, carrés vides) ou de thapsigargine (Figure 31, cercles vides) induisent

également une libération du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  accumulé. Néanmoins, la sortie du calcium est plus importante en présence d'EGTA. La cinétique de dissipation du gradient de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  par l'addition de ionomycine ( $t_{1/2} \leq 0,5$  min), ne correspond pas à celle induit par l'addition d'EGTA ( $t_{1/2} \approx 10$  min) ou de thapsigargine ( $t_{1/2} \approx 2$  min). Dans un cas, le calcium accumulé est libéré rapidement *via* l'ionophore inséré dans la bicouche lipidique, dans l'autre cas, le calcium accumulé est libéré plus lentement *via* la SITS-ATPase. Enfin, le calcium libéré par la présence de thapsigargine ( $\approx 10$  nmol/mg) correspond uniquement au calcium lié à la protéine.

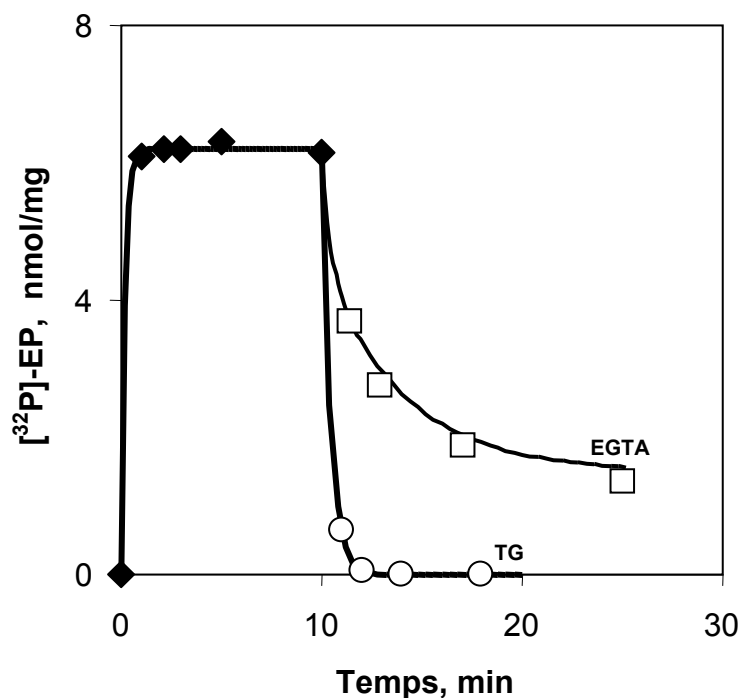


**Figure 31** - La cinétique d'accumulation et de libération de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  par la SITS-ATPase en présence d'AcP – losange plein : cinétique d'accumulation du calcium, losange vide : 0,01 mg/ml ionomycine, carré vide : 5 mM EGTA et cercle vide : 15  $\mu\text{M}$  TG.

### B.2.3. La phosphorylation de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ marquée par le SITS à partir de $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$ en présence de calcium.

Après l'addition de  $[^{32}\text{P}]\text{AcP}$  (temps zéro), nous observons une accumulation rapide de phosphoenzyme au cours du temps ( $t_{1/2} \leq 0,5$  min). Le taux maximal de phosphorylation, obtenu dans ces conditions, est de 6 nmoles/mg de protéine (Figure 32, losanges pleins). La majorité des SITS-ATPases sont phosphorylées ( $>75\%$ ). Après la phosphorylation, l'addition d'EGTA (Figure 32, carrés vides) ou de thapsigargine (Figure 32, cercles vides) induit une déphosphorylation des protéines. La chute du taux de phosphoenzyme est plus rapide après l'addition de thapsigargine ( $t_{1/2} \leq 1$  min) qu'après celle de l'EGTA. Dans ce dernier cas, la cinétique de déphosphorylation n'est pas

monoexponentielle. Nous observons une première déphosphorylation rapide de 2 nmol/mg de protéine ( $t_{1/2} \leq 1$  min), puis une deuxième plus lente avec une vitesse similaire à celle observée pour la libération du calcium induite par l'EGTA ( $t_{1/2} \approx 7$  min). Il semble donc que deux types de dérivé phosphorylé, c'est à dire  $E_1Ca_2P$  et  $E_2H_3P$ , coexistent dans des proportions un tiers, deux tiers.



**Figure 32 - La cinétique de phosphorylation à partir de SITS-ATPase en présence de [<sup>32</sup>P]AcP** – La phosphorylation est effectuée à partir de vésicule de SR dont les protéines sont marquées par le SITS (1 mg/ml) et en présence de calcium et [<sup>32</sup>P]AcP. Après la phosphorylation complète, nous avons ajouté 5 mM EGTA : carrés vides ou 12  $\mu$ M thapsigargine : cercles vides.

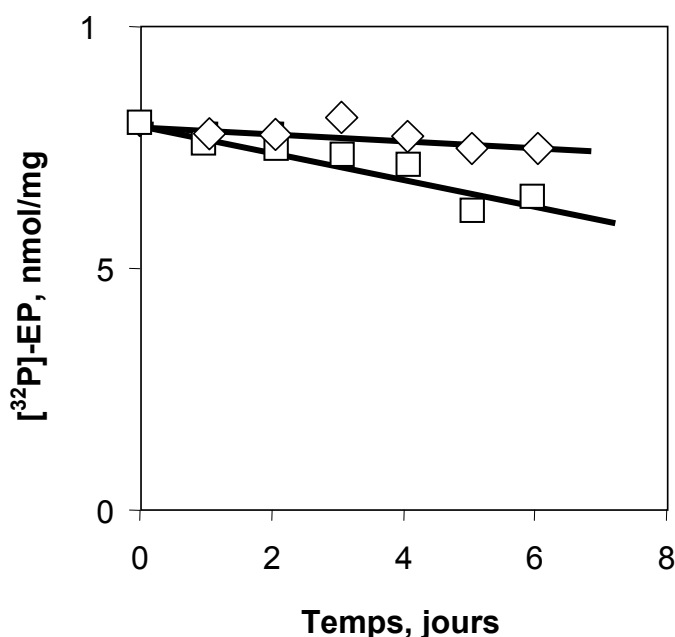
Nous pouvons en conclure que (i) l'augmentation de l'intensité de fluorescence du SITS de 10 % après l'addition d'AcP sur la forme  $E_1Ca_2Mg$  (Figure 30A), caractérise l'accumulation de phosphoenzyme, concomitante au transport et à l'accumulation du calcium dans les vésicules (Figure 31), (ii) la décroissance du signal de fluorescence après les additions d'EGTA ou de thapsigargine (Figure 30A), correspond à une déphosphorylation de la SITS-ATPase (Figure 32), concomitante à la libération du calcium lié et/ou accumulé (Figure 31), (iii) aucun dérivé phosphorylé covalent stable EP ne peut être obtenu à partir de SITS-ATPase, dans les conditions qui permettent de l'obtenir à partir de FITC-ATPase. Ces résultats suggèrent donc que le FITC participe directement à la stabilisation du dérivé phosphorylé par interaction avec des acides aminés de la protéine.

## C. La cristallogénèse du dérivé phosphorylé covalent stable.

### C.1 La stabilité du dérivé phosphorylé covalent sur plusieurs jours.

Nous avons démontré que le dérivé EP formé à partir de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  modifiée par le FITC est stable sur quelques minutes (Figure 25 et 26). Pour entreprendre sa cristallisation, nous devons déterminer sa stabilité sur une plus longue période (> 24 h).

En présence de 5 mM EGTA et de 12  $\mu\text{M}$  thapsigargine, le dérivé EP est stable sur plusieurs jours (Figure 33, carrés vides). Le décavanadate a été décrite comme agent cristallisant de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  [90]. Nous avons vérifié que la présence de décavanadate, à une concentration qui permet la cristallisation de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , n'induisait pas de déphosphorylation. Ainsi, le taux de phosphoenzyme en présence de 5 mM EGTA, de 12  $\mu\text{M}$  thapsigargine et de 5 mM décavanadate (déca $\text{VO}_4$ ), reste à un niveau élevé sur plusieurs jours (Figure 33, losanges vides).



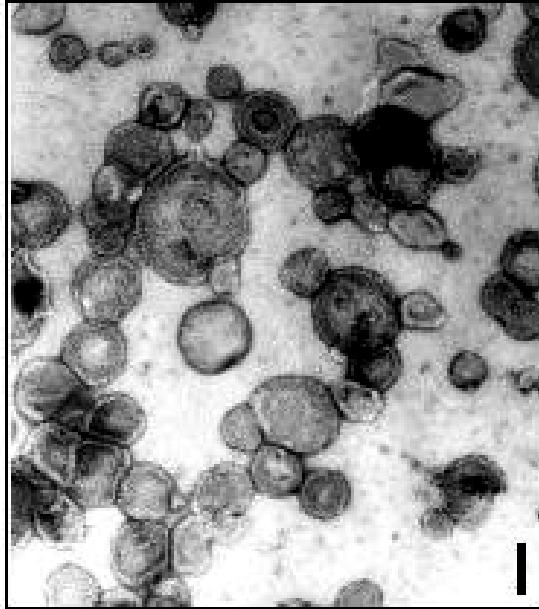
**Figure 33 - La stabilité du dérivé phosphorylé obtenu à partir de [<sup>32</sup>P]AcP** – Après la phosphorylation à 1 mg/ml de protéine ( $\approx$  2 min), nous avons ajouté 5 mM EGTA et 12  $\mu\text{M}$  TG : carré vide ou 5 mM EGTA, 12  $\mu\text{M}$  TG et 5 mM déca $\text{VO}_4$  : losange vide. Puis nous avons laissé incuber à 4°C.

### C.2 La formation de cristaux 2D de type vésiculaire du dérivé EP.

Nous avons observé et étudié par microscopie électronique en coloration négative, l'effet du décavanadate sur le dérivé EP stabilisé par la thapsigargine. Pour la formation du dérivé EP, nous avons choisi la phosphorylation par l'AcP en présence de calcium, pour s'assurer que 100 % des FITC-ATPases sont phosphorylées (cf. A.2.1). Dès les premières minutes d'incubation à 4°C en

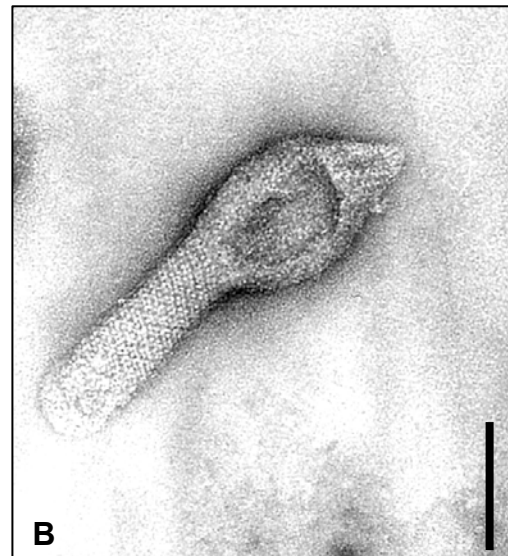
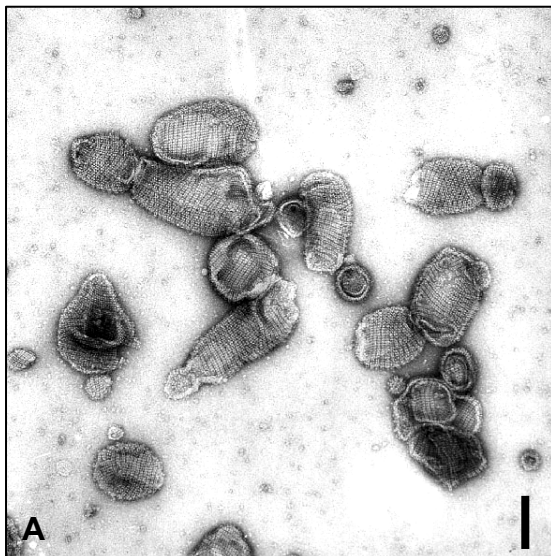


présence de décavanadate, nous avons observé la formation de cristaux bidimensionnels (2D) de type vésiculaire. Plus de 90 % des vésicules présentent une surface cristalline après 1 h d'incubation (Figure 34).



**Figure 34** - Photographies de cristaux 2D de la Ca-ATPase sous la forme EP, obtenues par microscopie électronique en coloration négative - Des vésicules à 3 mg/ml ont été incubées en présence de 5 mM décavanadate, à 4°C.

Après plusieurs heures d'incubation à 4°C, les cristaux présentent une forme plus allongée (Figure 35A, B), similaires aux cristaux de la forme  $E_2H_3VO_4$  [90]. Aucune évolution de ces cristaux n'a été observée par la suite.



**Figure 35** - Photographies de cristaux 2D de l'ATPase- $Ca^{2+}$  sous la forme EP, obtenues par microscopie électronique en coloration négative - Des vésicules à 3 mg/ml ont été incubées en présence de 5 mM décavanadate, à 4°C pendant (A) 24 h et (B) 48 h. La barre correspond à 100 nm.

### **C.3 La formation de longs tubes cristallins du dérivé EP.**

Les cristaux 2D de type vésiculaire sont de trop petite taille pour permettre une analyse d'images. Afin d'obtenir de plus grands cristaux, nous avons cherché à fusionner les vésicules de RS. En 1992, Varga et Martonosi ont décrit une méthode de fusion de vésicules de RS qui nécessite la présence de forte concentration en calcium et différents produits chimiques comme le DMSO [106, 111]. Il existe une technique de fusion décrite pour les liposomes qui consiste à leur faire subir une succession de cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide [112 – 114]. Nous avons choisi cette technique qui évite une exposition prolongée du dérivé EP à des solvants organiques, au calcium ou à des détergents également décrits comme fusogènes.

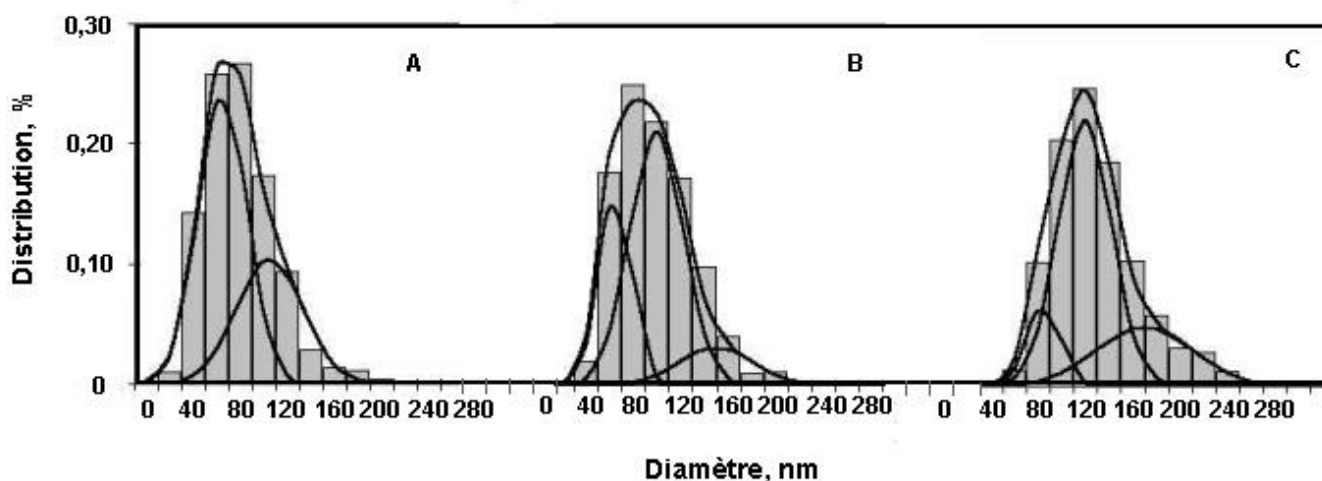
#### **C.3.1 La fusion des vésicules de RS.**

Plusieurs études ont été effectuées sur la fusion de liposomes induite par des cycles de congélation/décongélation [112 – 114]. Les effets des cycles sont différents (fragmentation ou fusion) selon le type de liposomes (multilamellaire, soniqués), leur composition en lipides et les conditions du milieu (force ionique, pH et présence de saccharose) [114]. Le nombre de cycle et la concentration en lipides interviennent aussi sur l'efficacité de la fusion [112]. Ainsi, la fusion des liposomes est plus efficace avec une concentration élevée en lipides ( $\approx 20$  mg/ml). Pour des liposomes constitués uniquement de phosphatidylcholine, la fusion est optimale pour un nombre de cycle compris entre trois et cinq [113]. Il n'existe aucune étude exhaustive sur la fusion de protéoliposomes par des cycles de congélation/décongélation. Nous avons donc étudié les effets de ce processus sur des vésicules de SR natif.

##### **a) La recherche des conditions optimales de fusion des vésicules de RS.**

Nous avons fait subir trois cycles de congélation/décongélation à deux préparations de concentrations protéiques différentes (30 et 10 mg/ml). Les vésicules ont été ensuite incubées à 4°C pendant 1, 24, 48 et 72 h. Les analyses morphométriques des vésicules de ces deux préparations, à partir d'images prises par microscopie électronique en coloration négative, ont été comparées à celles réalisées sur deux solutions témoins de même concentrations et qui n'ont pas subi les cycles de congélation/décongélation. Nous avons d'abord contrôlé que l'activité ATPasique de la Ca-ATPase n'était pas modifiée après les cycles de congélation/décongélation. Ce contrôle nous a permis de nous

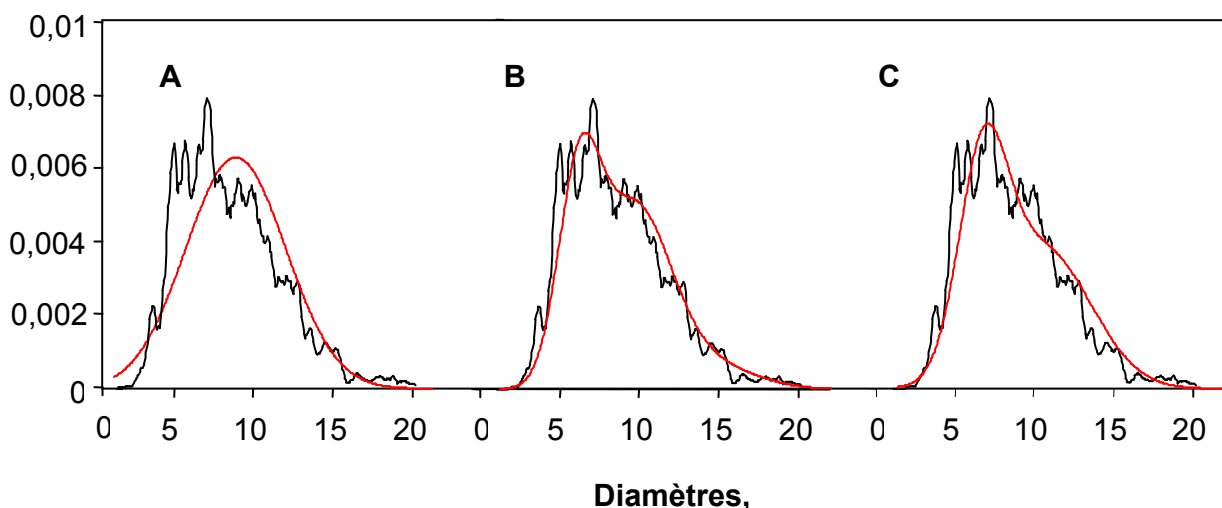
assurer qu'après ce traitement, la Ca-ATPase n'est pas endommagée, que l'intégralité de la membrane des vésicules est toujours préservée et qu'aucune réorientation des protéines ne s'est produite.



**Figure 36** - Les distributions des vésicules de RS en fonction de leur diamètre – (A) témoin, (B) 30 mg/ml et (C) + décaVO<sub>4</sub>. Chaque figure contient l'histogramme de distribution des diamètres selon les données expérimentales (gris), la décomposition en sous-population et la somme des sous-populations (noir).

### b) L'analyse statistique des diamètres des vésicules de SR.

Nous avons mesuré le diamètre de plus de 1300 vésicules. Au-delà des 1300 vésicules traitées, la distribution des vésicules en fonction de leurs diamètres ne varie plus de façon significative, quelles que soient les conditions expérimentales et le temps d'incubation à 4°C. Les vésicules témoins (10 ou 30 mg/ml) possèdent un diamètre compris entre 15 et 200 nm avec un maximum à 80 nm au temps zéro (Figure 36A). Toutefois, l'examen de ces données expérimentales révèle une distribution asymétrique. Nous ne pouvons donc pas décrire l'histogramme par une loi normale simple (ou loi de Gauss Laplace). De même, toutes les distributions observées dans les différentes conditions expérimentales ne sont pas Gaussiennes (données non présentées). Ainsi, il a été nécessaire de les décomposer en une somme cumulée de distributions de sous-populations de vésicules (Figure 37). Toutes les sous-populations ont été individualisées selon leur diamètre moyen ( $d$ ), l'écart type ( $\sigma$ ) et leur pourcentage normalisé (sachant que 100 % correspond au nombre total de vésicules comptées). Ce type d'analyse a été effectué pour toutes les conditions expérimentales et selon le temps d'incubation à 4°C.

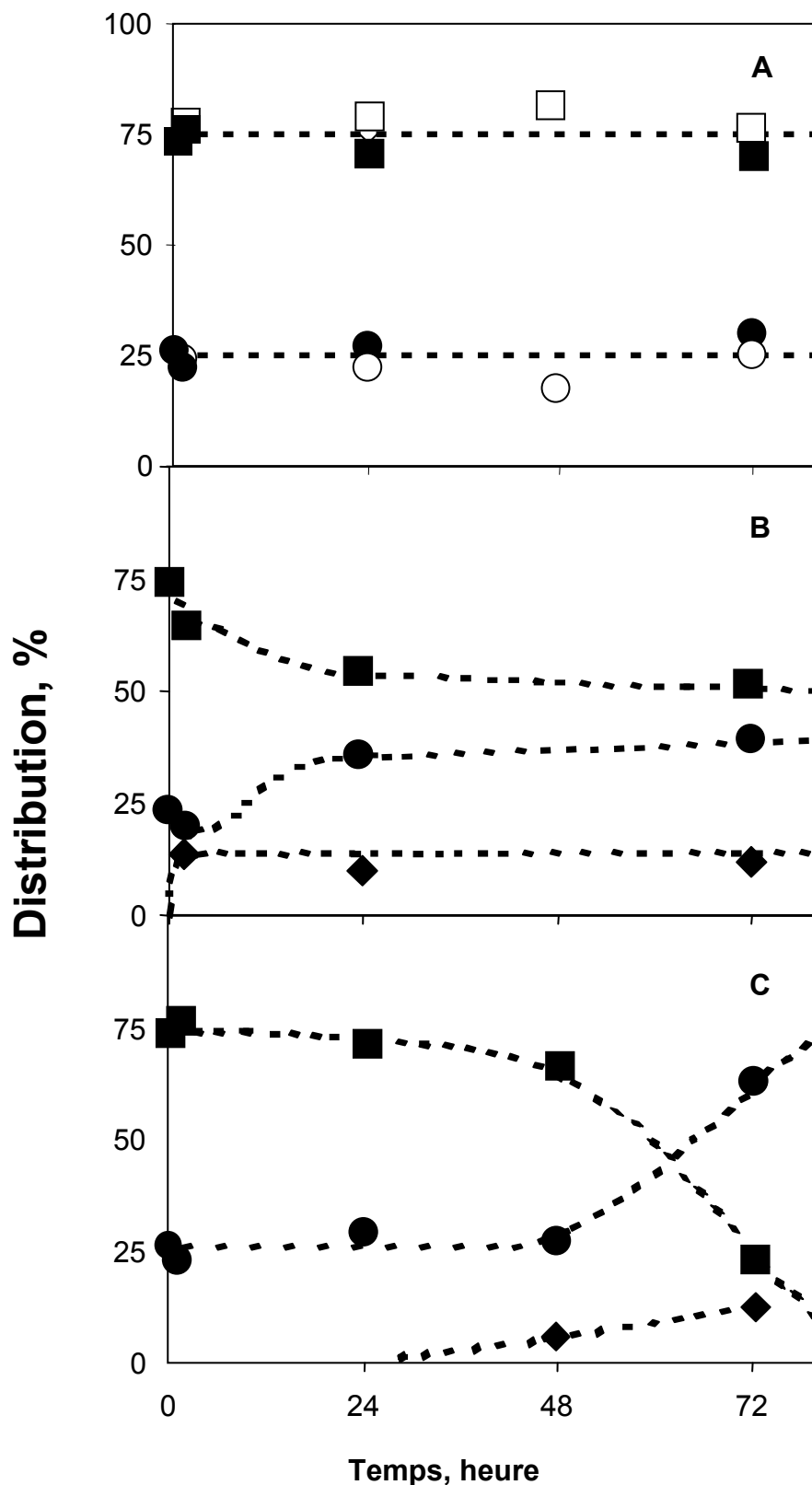


**Figure 37 - Un exemple d'étude statistique de la distribution des diamètres des vésicules de RS** – L'étude statistique d'une solution à 30 mg/ml qui a subi trois cycles de congélation/décongélation et qui a été incubée 24 h à 4°C. **(A)** une sous-population **(B)** deux sous-populations et **(C)** trois sous-populations. Le trait noir : données expérimentales, trait rouge : données théoriques.

Nous avons trouvé deux sous-populations de vésicules pour la solution témoin au temps zéro (10 et 30mg/ml, Figure 35A). Un nombre plus important de sous-populations ne permet pas d'améliorer de façon significative l'ajustement. Les diamètres moyens des deux sous-populations sont  $d = 65 \text{ nm} \pm 18$  (petit diamètre) pour 75 % de la totalité des vésicules,  $d = 105 \text{ nm} \pm 23$  (moyen diamètre) pour 25 % de la population totale (Tableau 3). Aucun changement significatif du nombre de sous-populations de vésicules et du pourcentage de vésicules de chaque sous-populations, n'a été observé après 72h d'incubation à 4°C (Figure 38A).

Par contre, une troisième sous-population de vésicules apparaît, dont le diamètre moyen est de  $145 \text{ nm} \pm 36$  (grand diamètre), après les trois cycles de congélation/décongélation. L'apparition de cette troisième sous-population s'accompagne d'une redistribution des populations des vésicules à petit et moyen diamètres (Figure 38B et C). Ainsi, les petits, moyens et grands diamètres représentent respectivement 36, 54 et 10 % de la totalité des vésicules après 24 h d'incubation pour la solution à 30 mg/ml (Tableau 3). La vitesse d'apparition des vésicules à grand diamètre est dépendante de la concentration protéique. A 30 mg/ml, celles-ci apparaissent après une heure d'incubation à 4°C (Figure 38B, losange plein), alors qu'à 10 mg/ml, il est nécessaire d'incuber au moins 48 h après les trois cycles de congélation/décongélation (Figure 38C, losange plein). Enfin, aucune évolution n'est observée dans la distribution des vésicules après 24 h d'incubation à 30 mg/ml (Figure 38B). A 10

mg/ml, la distribution des différentes sous-populations évolue jusqu'à 72 h d'incubation à 4°C (Figure 38C). Ainsi comme pour les liposomes, la vitesse et l'efficacité de la fusion des vésicules dépendent de la concentration en matériel.



**c) La fusion des vésicules de RS est améliorée en présence de décavanadate.**

Nous avons fait subir trois cycles congélation/décongélation à une solution de vésicules de RS à 30 mg/ml, après une incubation pendant une heure à 4°C, la préparation a été diluée à 3 mg/ml avec une solution de cristallisation qui contient du décavanadate. Cette dilution est due aux contraintes expérimentales de cristallogenèse. En effet, la solution de protéine à 30 mg/ml est dans un milieu pH 7,2, 0,3 M saccharose, 0,1 mM calcium, 10 mM KCl et la cristallisation de la ATPase-Ca<sup>2+</sup> s'effectue dans un autre milieu qui contient un tampon pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,5 mM EGTA, 30 µM thapsigargine (ATPase/thapsigargine = 1 mole/mole) et 5 mM décavanadate. De plus, la solution mère de décavanadate est préparée à une concentration de 50 mM à pH 6,5, nous effectuons donc une dilution au 1/10.

Après incubation à 4°C pendant 24 h, la présence de décavanadate permet d'obtenir 90 % des vésicules cristallines et améliore la rapidité ainsi que l'efficacité de la fusion des vésicules de RS. Les vésicules à petits, moyens et grands diamètres représentent respectivement 15, 61 et 24 % des vésicules totales après 24 h d'incubation à 4°C (Tableau 3). Cependant, aucun tube cristallin n'a été observé au bout d'une semaine d'incubation à 4°C.

**Tableau 3 :** Distribution des populations de vésicules de SR selon les conditions expérimentales.

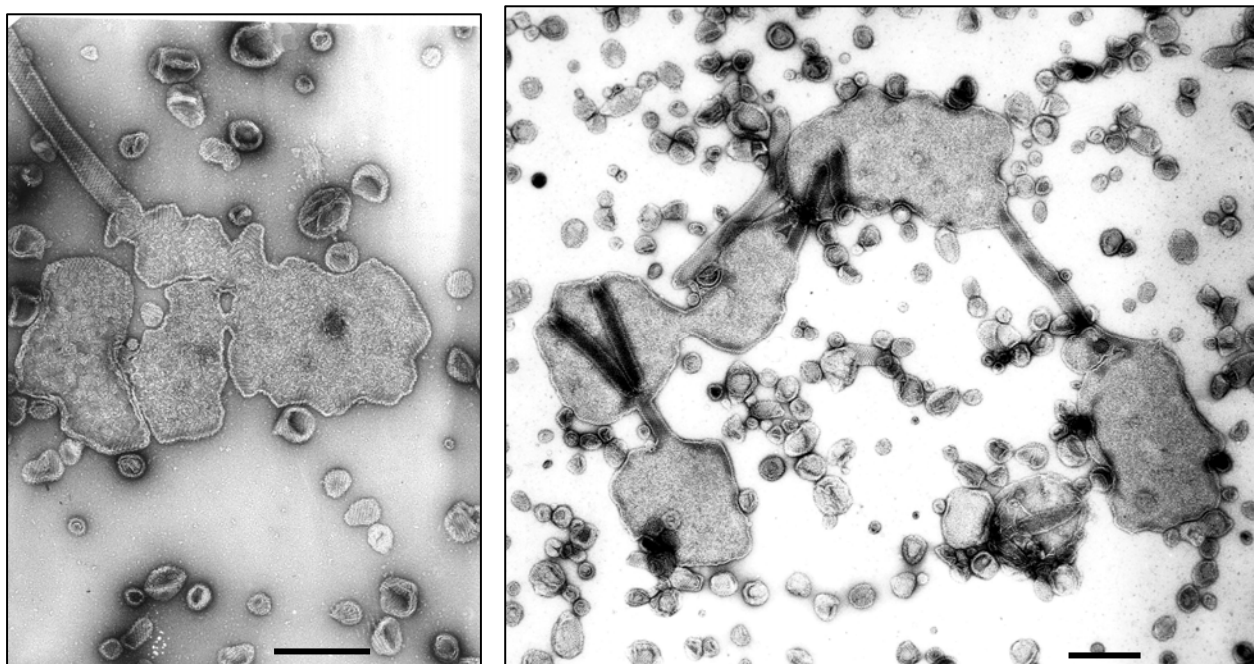
incubation 24h	petit diamètre (65 nm)	moyen diamètre (105 nm)	grand diamètre (145 nm)
témoin	75 %	25 %	----
30 mg/ml	36 %	54 %	10 %
3 mg/ml + décaVO <sub>4</sub>	15 %	61 %	24 %

**C.3.2 La formation de longs tubes cristallins du dérivé EP stable.**

**a) La formation de longs tubes cristallins de la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.**

La formation de plus grandes vésicules par le processus de fusion, ne suffit pas pour former des tubes cristallins. Différentes concentrations en décavanadate ont été testées. L'augmentation de

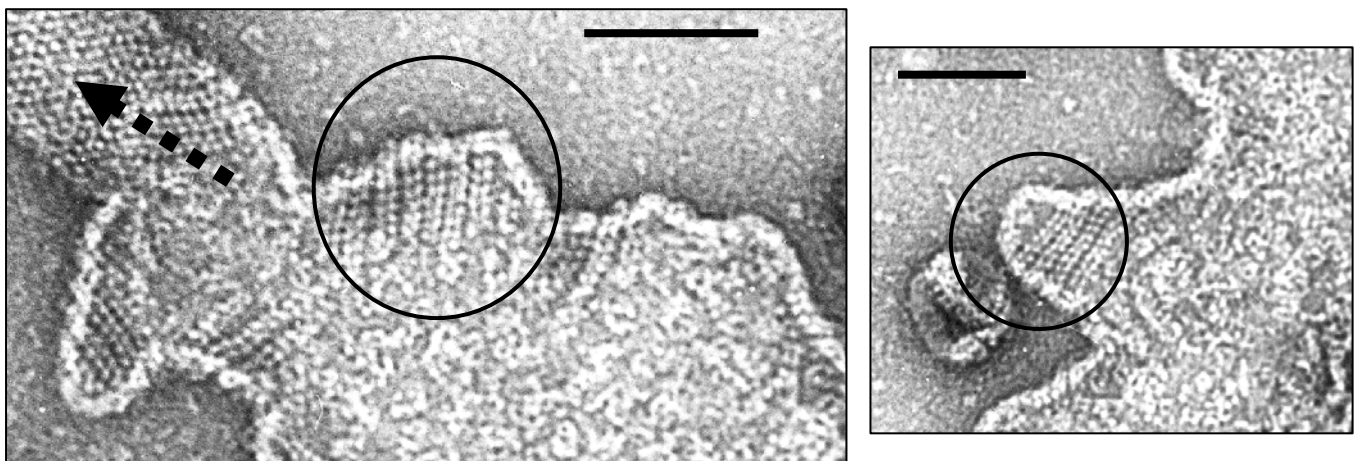
la concentration en décavanadate à 15 mM pour 3 mg/ml de protéine, permet d'observer par microscopie électronique en coloration négative, la formation de plaques après incubation 24 h à 4°C (Figure 39). Le diamètre de ces plaques peut atteindre plusieurs microns. A plus fort grossissement (Figure 40), nous observons que les bords des plaques sont cristallins et que la partie centrale semble être plus riche en lipide qu'en ATPases. Et surtout, nous observons que de longs tubes cristallins poussent à partir de ces plaques au bout de 24 h (Figure 39). Ces plaques proviennent de la fusion de vésicules, dont la membrane est probablement endommagée par la formation de glace pendant la congélation [150]. Ainsi, les bicouches partiellement fragmentées se rassemblent au moment de la décongélation lente et de nouvelles vésicules se forment avec un diamètre différent. Cependant, la présence d'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , qui possède un domaine extramembranaire volumineux, doit réduire l'efficacité de la fusion. Ces têtes cytoplasmiques protubérantes dirigées vers l'extérieur de la vésicule de SR, limitent le contact entre les bicouches lipidiques. La présence de décavanadate améliore la rapidité ainsi que l'efficacité de la fusion des vésicules de RS. Le contact indispensable entre deux vésicules est favorisé par l'agrégation et la ségrégation d'ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  induites par le décavanadate. Les vésicules cristallines fusionnées forment ainsi des plaques, dont les bords cristallins constituent un réservoir d'ATPases pontées de façon réversible par le décavanadate, pour la croissance de longs tubes.



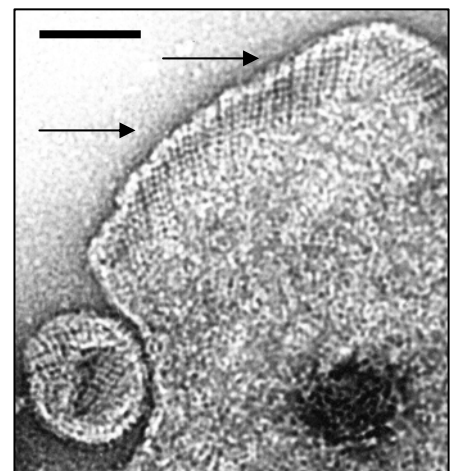
**Figure 39 - Différents exemples de formation de plaques cristallines à partir de vésicules de RS** – Les photographies ont été obtenues par microscopie électronique en coloration négative. La barre correspond à 400 nm.

**b) La formation de longs tubes cristallins du dérivé EP stable.**

Nous avons essayé d'obtenir de longs tubes cristallins du dérivé EP stable. Pour cela, nous avons d'abord phosphorylé la FITC-ATPase à 1mg/ml en présence d'AcP et de calcium, ce qui nous permet de contrôler sa formation en suivant les changements de fluorescence du FITC (cf. A.1.2). Le dérivé EP est obtenu après les additions de 5 mM EGTA et 12  $\mu$ M thapsigargine. Puis, nous avons concentré le dérivé EP par ultracentrifugation et resuspendu le culot à 30mg/ml. Afin de s'assurer de la stabilité du dérivé EP (cf. C.1), les concentrations en EGTA et en thapsigargine ont été gardées constantes. Nous avons fait subir à cette nouvelle préparation trois cycles de congélation/décongélation. Après une incubation à 4°C pendant une heure, la solution a été diluée à 3 mg/ml avec une solution de cristallisation qui contient une forte concentration en décavanadate (15 mM final), en gardant toujours les concentrations en EGTA et en thapsigargine constantes. Bien que les vésicules soient cristallines, aucun tube n'a été observé après une semaine d'incubation à 4°C.



**Figure 40 - Grossissement des bords des plaques cristallines** – Les ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  apparaissent sous forme de ronds blancs sur ces photographies, obtenues par microscopie électronique en coloration négative. Les cercles et les flèches indiquent les zones cristallines des plaques. La grosse flèche en pointillée indique la direction de poussée du tube. La barre correspond à 100 nm.

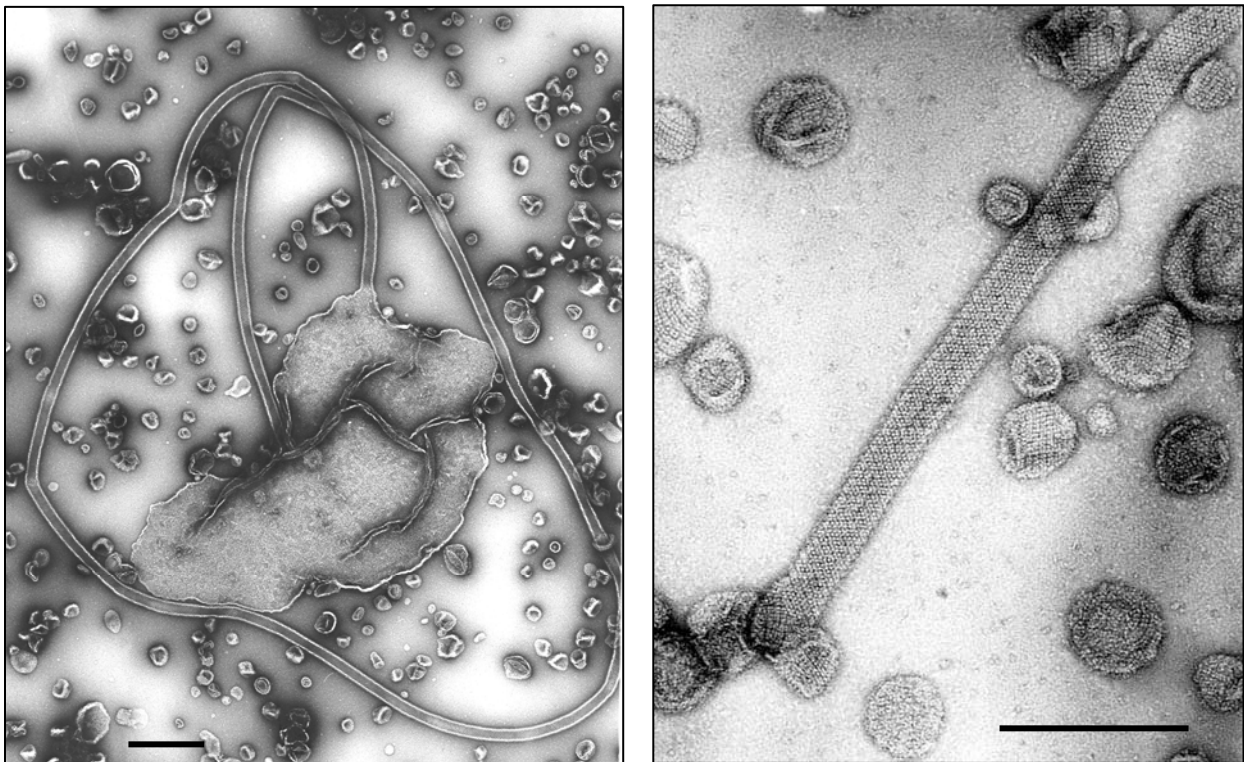




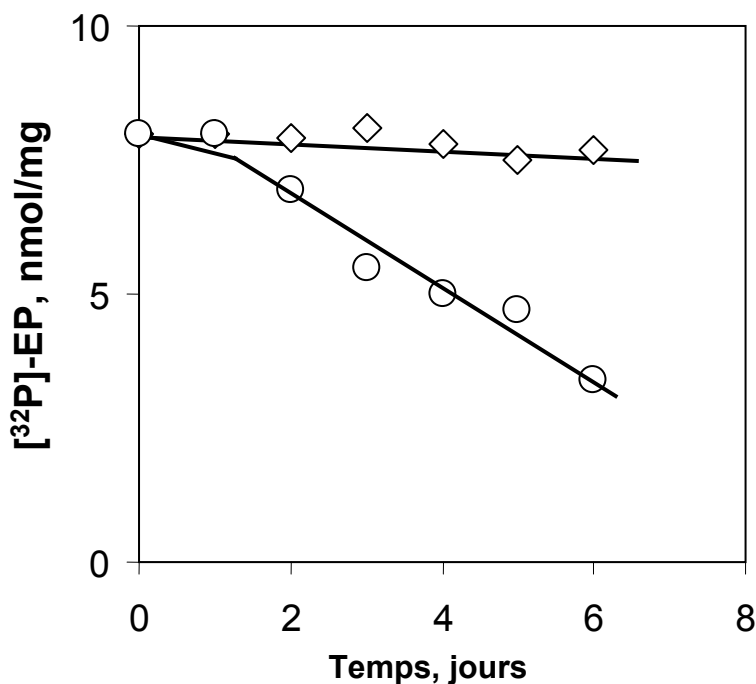
## Résultats

En modifiant la concentration en EGTA de la solution de cristallisation de 5 mM à 0,5 mM, nous observons par microscopie électronique en coloration négative, la formation de plaques identiques à celles observées pour la forme  $E_2H_3VO_4$  après incubation 24h à 4°C. Et surtout, nous observons que de longs tubes cristallins poussent à partir de ces plaques (Figure 41). Le diamètre des tubes varie entre 60 et 115 nm et leur longueur peut atteindre une dizaine de micron.

Nous avons démontré que le dérivé EP était stable sur plusieurs jours en présence de décavanadate et 5 mM EGTA (Figure 33, carré vide). La figure 42 montre que le dérivé EP est aussi stable dans les conditions qui permettent d'obtenir de nombreux tubes cristallins (Figure 42, cercle vide).



**Figure 41** - Différents tubes cristallins de la FITC-ATPase sous la forme EP – Les photographies ont été obtenus par microscopie électronique en coloration négative - La barre correspond à 200 nm.



**Figure 42 - La stabilité du dérivé EP obtenu à partir de [<sup>32</sup>P]AcP –** Conditions d'obtention des vésicules cristallines : losanges vides ou conditions d'obtention des tubes cristallins : cercles vides.

**c) L'optimisation de la cristallogenèse du dérivé EP stable.**

Dans le but d'optimiser la formation des tubes cristallins, nous avons fait varier plusieurs paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température ainsi que les concentrations en KCl, magnésium, EGTA et décavanadate de la solution de cristallogenèse.

Comme il a été décrit précédemment pour la formation de cristaux de la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> [90], nous avons observé que la formation des cristaux du dérivé EP est peu sensible à une variation de pH comprise entre 6,9 et 7,5. Nous avons choisi de nous placer à pH 7,2 pour la suite des études des conditions physico-chimiques de cristallogenèse.

La formation des tubes du dérivé EP ne s'observe que pour une température d'incubation de 4°C. Cette dépendance à la température peut s'expliquer soit par une agitation thermique défavorable pour la cristallisation de la Ca-ATPase, soit par la dépolymérisation du décavanadate en populations. En effet, il a été décrit que cette dernière prend plusieurs jours à 4°C, alors qu'elle est plus rapide à 25°C [115].

Martonosi et ses collaborateurs ont montré que la cristallogenèse de la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> ne nécessite pas la présence de KCl [90], ce que nous observons également pour le dérivé EP stable. Par contre, Buhle et ses collaborateurs considèrent que la concentration optimale en KCl pour obtenir

des tubes cristallins de la forme  $E_2H_3VO_4$ , est comprise entre 25 et 250 mM [116]. Nous n'avons pas d'explication pour cette divergence des observations.

En 1983, Dux et Martonosi ont démontré que la présence de magnésium n'est pas indispensable mais favorise la cristallogénèse de la forme  $E_2H_3VO_4$  [90]. Dans nos conditions, la présence de magnésium est indispensable pour obtenir les tubes du dérivé EP stable. Nous n'observons que quelques vésicules cristallines en absence de magnésium et aucun tube n'est observé avec une forte concentration ( $> 15$  mM). La concentration optimale en magnésium pour obtenir de longs tubes ordonnés du dérivé EP stable est de 5 mM.

Dux et Martonosi en 1983 ont montré qu'une variation de la concentration en EGTA (0,5 - 5 mM) n'affecte pas ou peu la formation de vésicules cristallines de la forme  $E_2H_3VO_4$  [90]. Aucune étude sur les effets de la concentration en EGTA n'a été réalisée sur la formation des tubes cristallins. Dans nos conditions, aucun tube du dérivé EP stable n'a été observé avec une concentration en EGTA supérieure à 2,5 mM. La concentration optimale en EGTA pour obtenir le nombre le plus important de tubes cristallins du dérivé EP stable est de 0,5 mM (0,5 à 5 mM testés).

Comme pour la forme  $E_2H_3VO_4$ , la formation de cristaux de type vésiculaire du dérivé EP stable est rapide et s'observe à faible concentration en décavanadate [115]. Néanmoins, la formation des tubes cristallins du dérivé EP stable comme du  $E_2H_3VO_4$  à partir des vésicules de SR, nécessite la présence d'une forte concentration en décavanadate (15 mM pour 3 mg/ml de protéine). Le rapport décavanadate / protéine semble être important pour la fusion des vésicules de SR en plaques ainsi que la formation de tube.

## **D. L'analyse d'images de tubes du dérivé EP stable.**

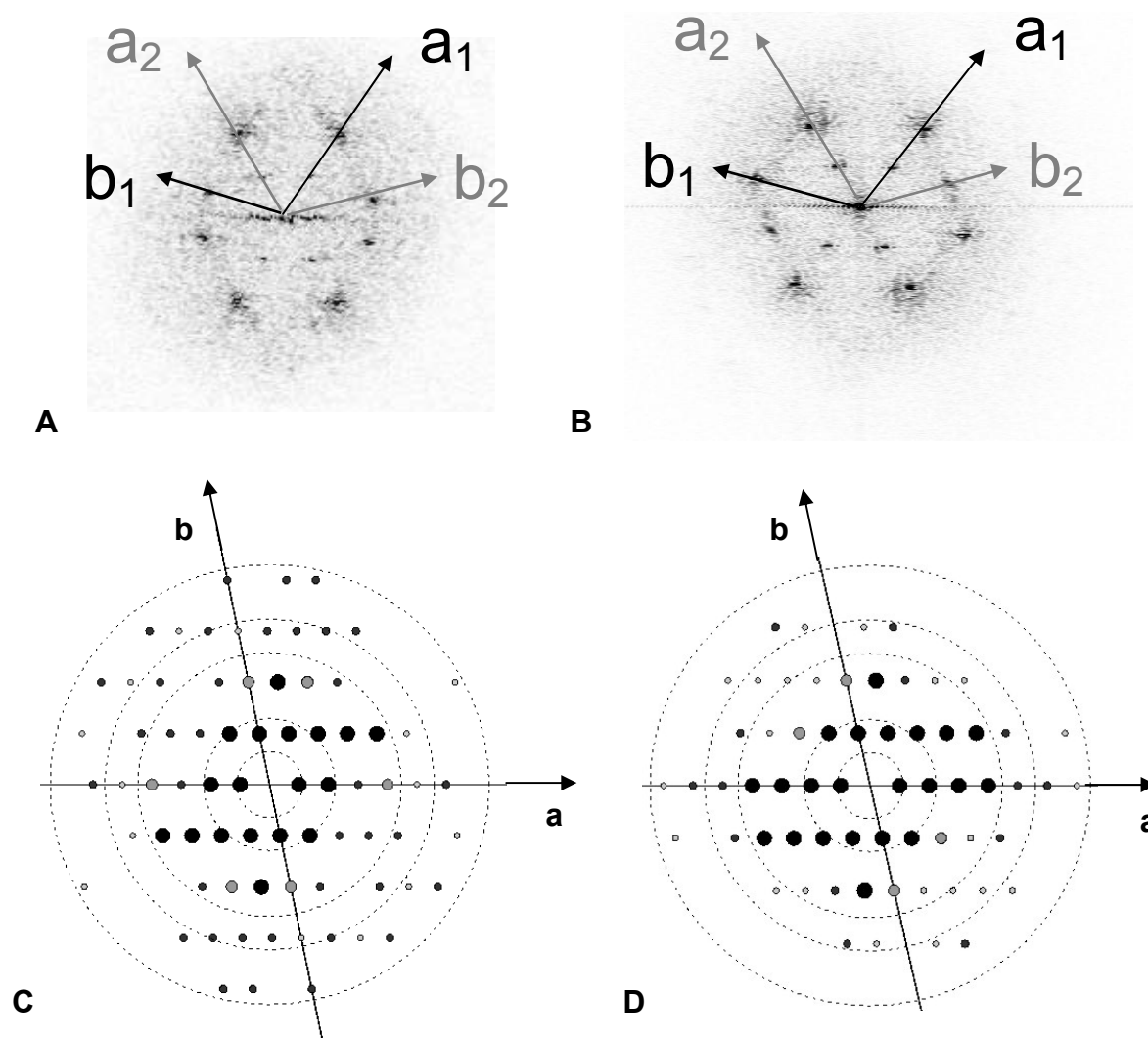
### **D.1 L'analyse d'images à partir de clichés de microscopie électronique de cristaux en coloration négative.**

L'analyse d'images a été effectuée à partir de clichés, obtenus par microscopie électronique en coloration négative, de tubes cristallins du dérivé EP stable et de la forme  $E_2H_3VO_4$ . Les tubes analysés ont été obtenus après 24 à 48 h d'incubation à 4°C.

La première étape du processus d'analyse d'images des cristaux 2D, est le choix au banc optique et la digitalisation des meilleurs clichés. Puis, l'analyse d'images en coloration négative, se résume aux opérations de base suivantes: l'indexation du réseau du cristal après transformation de Fourier (TF) des images numériques, le filtrage de l'image bruitée en appliquant un masque autour de chaque spot de diffraction, la correction des distorsions du cristal, la mise à une origine de phase commune de toutes les images pour permettre le calcul d'une moyenne. Les cartes de projection sont obtenues en utilisant la TF inverse de cette moyenne. La résolution des cartes dépend de celle à laquelle les spots de diffraction peuvent être déterminés (cf. matériels et méthodes).

### **a) La sélection des clichés au banc optique.**

La sélection a été réalisée à partir de plus de 100 négatifs. Les meilleurs clichés, environ une vingtaine, ont été sélectionnés au banc optique en regardant leur diagramme de diffraction et leur astigmatisme (cf. matériels et méthodes). Le diagramme de diffraction est une maille de taches lumineuses, des spots de diffraction, sur un fond plus faible qui correspond au bruit (Figure 43A et C). Les diagrammes de tubes aplatis en coloration négative apparaissent comme ceux de deux feuillets cristallins plans superposés (Figure 44). Ils ne présentent pas une symétrie miroir parfaite probablement due à une déformation de la face du cristal qui repose sur le film de carbone [91]. Une fois que les meilleurs négatifs sont identifiés, l'information qui y est contenue sous forme de densité optique, doit être transformée en fichier numérique. Pour cela, les clichés sont digitalisés sur un microdensitomètre à tambour (cf. matériels et méthodes). Des balayages à haute résolution ont été réalisés avec un pas de digitalisation de 5  $\mu\text{m}$  générant ainsi une résolution 1600 dpi (dot per inch). L'histogramme de l'image digitalisée en 256 niveaux de gris, doit être le mieux centré possible par rapport au deux extrêmes blanc et noir. Les images numérisées sont ensuite analysées en utilisant plusieurs programmes informatiques (MRC package) dérivés de ceux utilisés pour la cristallographie aux rayons X (CCP4).



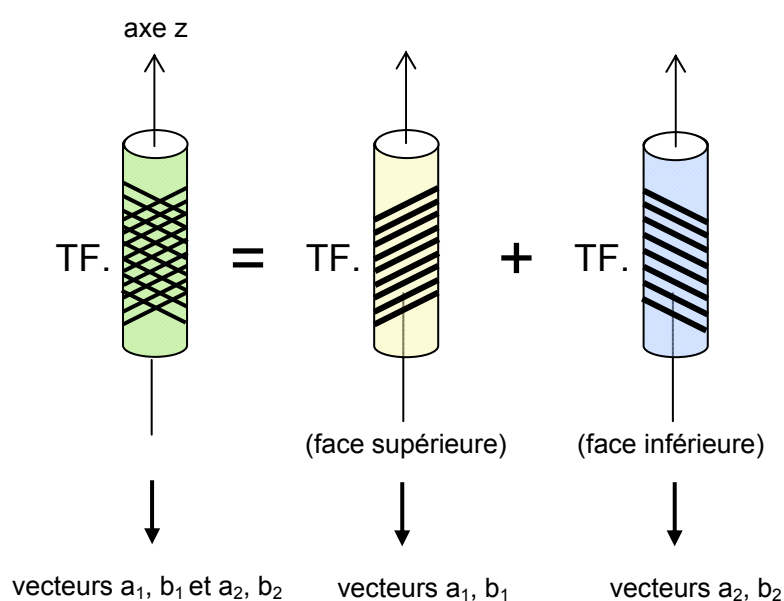
**Figure 43 - Les TF brutes et les diagrammes de diffractions après moyenne, des tubes de la forme  $E_2H_3VO_4$  et du dérivé EP – (A, C)  $E_2H_3VO_4$ . (B, D) dérivé EP. Les cercles en pointillés représentent les résolutions suivantes: 100 Å, 50 Å, 25 Å, 20 Å et 10 Å. Plus le spot de diffraction moyenné est intense, plus le diamètre du cercle est important (intensité  $I_{Q1} > I_{Q2} > I_{Q3} \dots$ ).**

### b) La digitalisation des clichés.

Une fois que les meilleurs négatifs sont identifiés, l'information qui y est contenue sous forme de densité optique, doit être transformée en fichier numérique. Pour cela, les clichés sont digitalisés sur un microdensitomètre à tambour (cf. matériels et méthodes). Des balayages à haute résolution ont été réalisés avec un pas de digitalisation de 5  $\mu\text{m}$  générant ainsi une résolution 1600 dpi (dot per inch). L'histogramme de l'image digitalisée en 256 niveaux de gris, doit être le mieux centré possible par rapport au deux extrêmes blanc et noir. Les images numérisées sont ensuite analysées en utilisant plusieurs programmes informatiques (MRC package) dérivés de ceux utilisés pour la cristallographie aux rayons X (CCP4).

**c) L'indexation des réseaux cristallins.**

La ou les meilleures zones du tube cristallin sont découpées et insérées dans une boîte de dimensions appropriées pour les calculs (nombre de pixel égal à une puissance de 2). C'est cette nouvelle image qui est traitée. La TF des différentes images permet de voir des spots de diffraction qui proviennent des faces supérieure et inférieure des tubes cristallins aplatis (Figure 43A et C). Ainsi, le diagramme de diffraction d'un tube cristallin comporte deux réseaux réciproques (indexables en  $a_1, b_1$  ;  $a_2, b_2$ ). Les spots de diffractions de chaque face atteignent une résolution de l'ordre de 40 Å.



**Figure 44 - L'arrangement des molécules d'ATPases, en une hélice droite, sur des tubes aplatis.**

— Arrangement cristallin d'ATPases

L'indexation de plus de 45 feuillettes, pour chacune des deux formes cristallines de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  étudiées, a été effectuée à l'aide du programme SPECTRA [117]. L'indexation permet une mesure précise des paramètres de maille ( $a$ ,  $b$  et  $\gamma$ ), ainsi qu'une estimation de la résolution globale de chaque image. La moyenne des paramètres de maille des deux formes cristallines (dérivé EP stable et  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$ ) est décrite dans le tableau 4. L'indexation permet aussi d'isoler les facteurs de structure qui vont permettre la reconstruction des cartes de projection. Avant de générer une carte de projection, il est nécessaire d'identifier et de séparer les composants du signal et du bruit dans la TF des images (cf. matériels et méthodes). De plus, un cristal n'est jamais parfait, il contient toujours un certain désordre de position et d'orientation du réseau. Ces irrégularités induisent un élargissement des spots de diffraction par rapport à la forme théorique. Un processus de filtrage et de corrections

des déformations du cristal permet d'affiner et d'agrandir la liste des paramètres ( $h, k, A, \phi$ ) de chaque image traitée. Enfin, la dernière correction à appliquer aux données est la prise en compte de l'aberration sphérique du microscope ( $C_s$ ) qui génère une fonction de transfert de contraste (CTF) qui est à l'origine de la disparition de certains spots de diffraction et à l'inversion des phases d'autres.

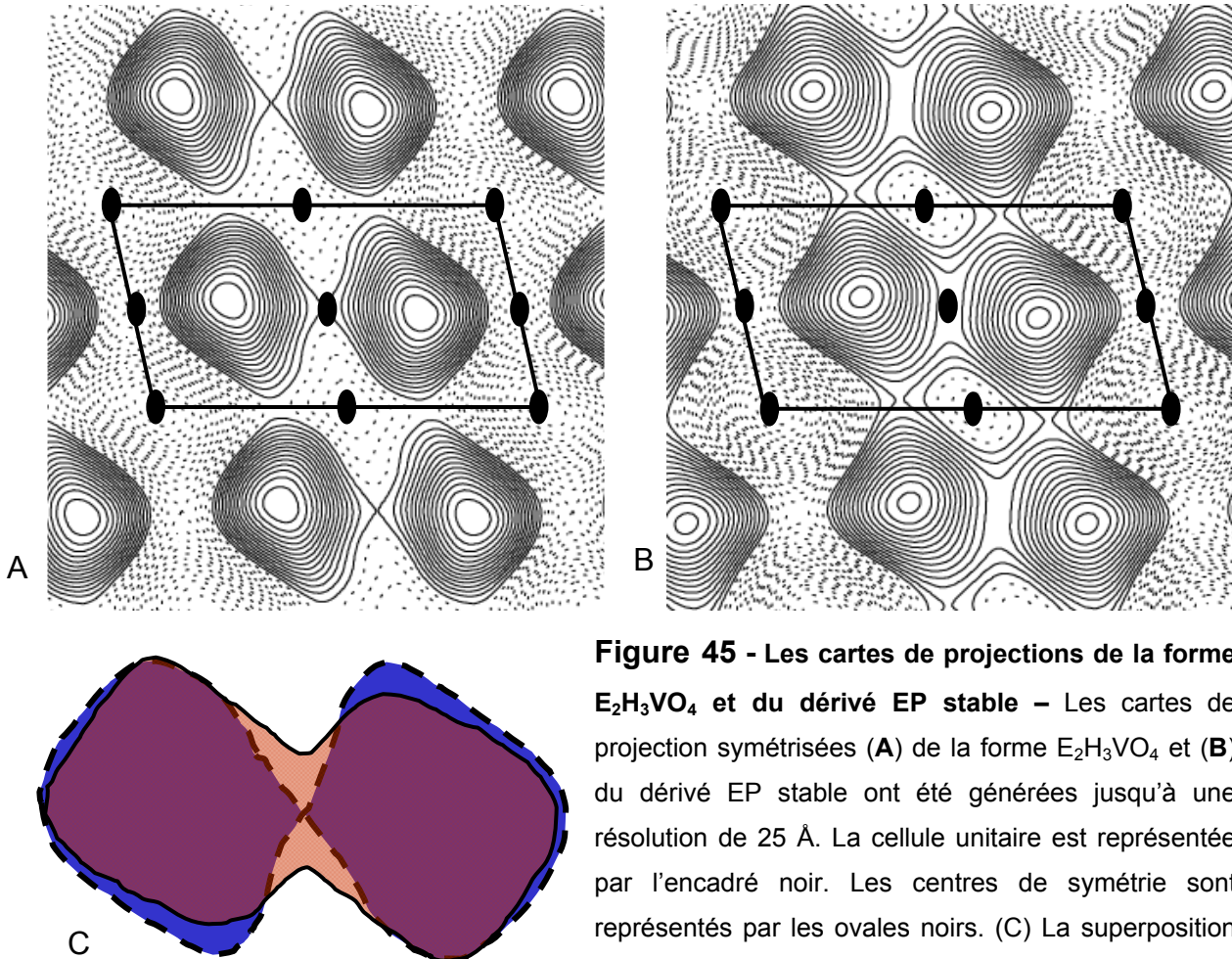
### **d) La recherche des symétries et la génération des cartes de projections.**

Les groupes plans auxquels appartiennent les deux cristaux (dérivé EP stable et  $E_2H_3VO_4$ ) ont été déterminés à l'aide du programme ALLSPACE [118]. Le cristal du dérivé EP possède un groupe plan  $p2$ , comme celui de la forme  $E_2H_3VO_4$  (tableau 3). C'est l'un des groupes plans les plus simples, puisqu'il comporte un seul axe de symétrie perpendiculaire au plan de la membrane, caractéristique de la formation de dimère. Ce type de symétrie plan nous indique que les phases ( $\phi$ ) de chaque spot de diffraction doivent être égales à  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ .

Après le filtrage et les corrections des déformations du cristal (cf. matériel et méthodes), nous avons finalement sélectionné 11 images pour  $E_2H_3VO_4$  et 12 pour le dérivé EP stable, afin d'effectuer une moyenne des facteurs de structure ( $h, k, A, \phi$ ). Les figures 43B et D représentent les diagrammes de diffraction de l'image moyennée des deux formes. Nous avons obtenu quelques spots de diffraction allant jusqu'à une résolution de 15 Å. Cependant, les cartes de projection finales symétrisées (phases  $\phi$  à  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ ) des deux formes de l'enzyme étudiées, ont été générées jusqu'à une résolution de 25 Å. Jusqu'à cette résolution les spots sont tous présents et de bonne qualité (IQ4, amplitude du signal 4 fois supérieur à celui du bruit de fond [124]). Au-delà de cette résolution, les spots de diffractions sont de moins bonne qualité, ils ne sont pas tous présents et les résiduels de phase (déviations par rapport à la phase théorique) sont supérieurs à  $45^\circ$  (tableau 3), ce qui nous ne permet pas d'avoir des cartes de projection fiables [124].

Dans les deux cartes de projection (Figures 45A et B), nous observons à l'intérieur de la maille cristalline (lignes noires) une paire de densité antiparallèle centrée sur un axe de symétrie d'ordre deux (ovale noir) et qui représente le dimère de Ca-ATPase. Comme précédemment décrit par Taylor [91], la protéine sous la forme  $E_2H_3VO_4$  possède une forme en poire avec un domaine central dense (Figure 45A). L'aspect du dérivé EP est proche de celui de la forme  $E_2H_3VO_4$  avec cependant un

domaine central plus ovale (Figure 45B). La superposition des contours extérieurs des deux formes indique des contacts intermoléculaires plus serrés entre les dimères du dérivé EP (Figure 45C).



**Figure 45 - Les cartes de projections de la forme  $E_2H_3VO_4$  et du dérivé EP stable** – Les cartes de projection symétrisées (A) de la forme  $E_2H_3VO_4$  et (B) du dérivé EP stable ont été générées jusqu'à une résolution de 25 Å. La cellule unitaire est représentée par l'encadré noir. Les centres de symétrie sont représentés par les ovales noirs. (C) La superposition des courbes d'isodensité électronique extérieures des dimères du dérivé EP (violet) et de la forme  $E_2H_3VO_4$

Les différences structurales entre  $E_2H_3VO_4$  et EP font intervenir des mouvements de domaines beaucoup plus subtils qu'entre les formes  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$ . La résolution à laquelle sont générées les cartes de projection ne permet pas de voir ces mouvements fins. De plus, du fait que nous n'observons qu'une projection, les mouvements des hélices transmembranaires et des domaines extramembranaires, comprenant le domaine catalytique, sont peu ou pas visibles. La détermination des changements de conformation nécessite une structure 3D.

Il existe deux approches possibles. La première est la collecte d'une série d'images inclinées qui donnent une série de projection. Cependant, la résolution est limitée suivant l'axe z par le cône manquant. De plus, le diamètre des tubes n'est pas constant, ce qui oblige à prendre une série



d'images du même tube. Cette contrainte risque d'endommager le tube après plusieurs irradiations et de rendre les données inexploitable. La deuxième approche est l'utilisation de la cryomicroscopie électronique. Cette technique permet d'observer les tubes sans agent contrastant, non aplatis et sans changement drastique du milieu.

**Tableau 4** : Les paramètres des cristaux tubulaires des formes EP et E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

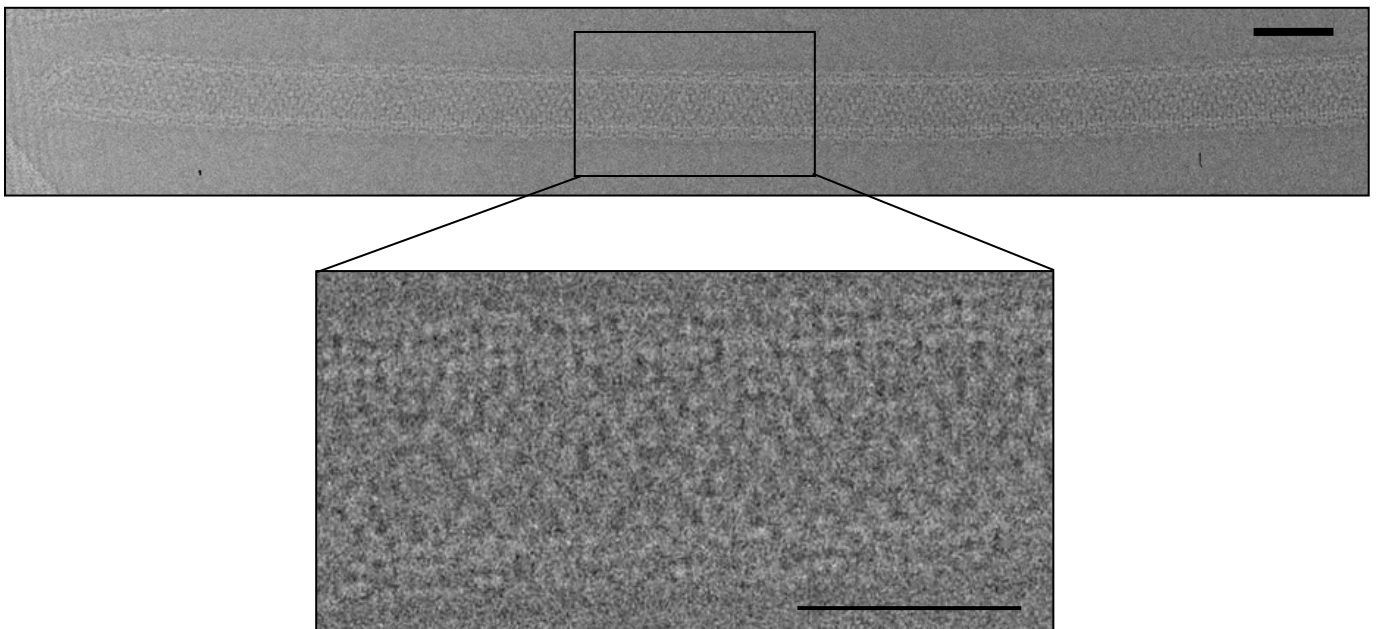
	EP		E <sub>2</sub> H <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	
<b>Groupe plan</b>	<i>p</i> 2			
<b>Nombre de tubes</b>	10		9	
<b>Nombre d'images</b> indexation moyenne	52 12		48 11	
<b>Paramètres de maille</b>	a = 112 Å ± 1,5 b = 61 Å ± 1 γ = 77,2° ± 1		a = 112 Å ± 1,5 b = 63 Å ± 1 γ = 78,4° ± 1	
<b>Défocalisation</b>	1,5 à 3,2 μm			
<b>Nombres de spots</b>	<b>IQ4</b>	<b>IQ6</b>	<b>IQ4</b>	<b>IQ6</b>
120 – 25 Å	20/22 (90,9 %)	22/22 (100 %)	21/22 (95,5 %)	21/22 (95,5 %)
24,9 – 10 Å	26/58 (44,8 %)	38/58 (65,5 %)	35/58 (60,3 %)	42/58 (72,4 %)
<b>Résiduel de phase</b> (IQ6)	20,9°		21°	

## D.2 L'analyse d'images à partir de clichés de cristaux obtenus par cryomicroscopie électronique.

La cryomicroscopie électronique nécessite la congélation ultrarapide en film mince de l'échantillon. Elle est réalisée en plongeant rapidement une grille de microscope électronique, sur laquelle est déposé l'échantillon, dans de l'éthane liquide refroidi à la température de l'azote liquide. Ainsi, l'eau contenue dans l'échantillon n'a pas le temps de cristalliser et est transformée en glace amorphe (eau vitreuse). Cette congélation ultrarapide permet à la fois de conserver la conformation native de la protéine dans son milieu, contrairement à la coloration négative qui déshydrate l'échantillon, et d'éviter d'aplatir les tubes. Pour une reconstruction 3D, l'avantage d'un tube congelé

est la distribution de la protéine le long et autour du tube dans une orientation différente et prévisible par rapport à sa voisine. L'analyse d'images a été effectuée à partir de clichés, réalisées par cryomicroscopie électronique (Philips 200FEG à New York), de tubes cristallins du dérivé EP stable formé comme décrit précédemment et obtenu après une nuit d'incubation à 4°C en présence de décavanadate (Figure 46).

La TF d'une image d'un cristal hélicoïdal obtenue par cryomicroscopie électronique, produit une série de spots plus ou moins allongés placés sur des lignes équidistantes plutôt que des spots ponctuels. Ces lignes sont perpendiculaires à l'axe z du tube. L'espacement entre les lignes est dépendant du pas de l'hélice. La reconstruction 3D à partir d'une structure hélicoïdale se résume aux opérations de base suivantes : la détermination de la distance de répétition cristalline, l'identification des lignes contenant les spots de diffraction, la correction des distorsions du cristal découpé en distance de répétition, les informations collectées sont mises à une origine de phase commune et ramenées à une moyenne. La structure 3D est obtenue en utilisant la TF inverse de cette moyenne. La résolution de la structure finale dépend de la résolution à laquelle les lignes de diffraction peuvent être déterminées.



**Figure 46** - Le photographie d'un tube de la forme EP stable, obtenu par cryomicroscopie électronique – La barre correspond à 50 nm.

### **a) La sélection des clichés au banc optique.**

Comme pour la précédente analyse d'image, la première étape est le choix des meilleurs clichés. La sélection a été réalisée sur un total de plus de 400 négatifs et seulement 10 % ont été retenus. Les critères sont plus stricts qu'en coloration négative. La majorité des clichés diffractent mais nous n'avons retenu que ceux dont les spots de diffraction décrivent une ligne la plus fine, ce qui indique que le tube n'est pas aplati. De plus, nous avons choisi les images de tubes dont les lignes étaient symétriques par rapport au méridien (axe vertical), ce qui nous indiquait que les deux faces du tube possèdent une distribution identique de molécules d'ATPase-Ca<sup>2+</sup>.

### **b) La digitalisation des clichés.**

La digitalisation est réalisée sur microdensitomètre à plat Zeiss (cf. matériels et méthodes). Les clichés sont positionnés de telle sorte que l'axe de balayage soit perpendiculaire à l'axe de tube. En effet, cette orientation conditionne la symétrie de positionnement des spots de diffraction sur une même ligne. Le pas de digitalisation est 7 µm, ce qui correspond à 1,36 Å sur le cliché, étant donné que tous les clichés ont été acquis à un grandissement de 50.000. L'histogramme de l'image digitalisée doit être centré par rapport aux 256 niveaux de gris.

### **c) Le choix et la préparation des images de tubes à analyser.**

L'un des problèmes rencontrés dans l'analyse d'images de tube cristallins obtenus en cryomicroscopie, est le changement du pas de l'hélice entre les tubes. Nous avons donc analysé les tubes et recherché ceux qui possèdent le même diamètre et surtout la même symétrie hélicoïdale. Cependant, le pas de l'hélice peut aussi varier sur la longueur d'un même tube. Ainsi, nous avons découpé un tube en plusieurs segments dont les dimensions correspondent à une distance de répétition (cf. D.2d).

Nous avons trouvé trois familles de tubes avec des rayons de 35 nm ± 0,1, 27 nm ± 0,1 et 22 nm ± 0,1. La famille avec un rayon de 27 nm ± 0,1 qui représente plus d'une vingtaine de tubes, a été utilisée pour l'analyse d'image. Les deux autres familles de tubes n'ont pas été utilisées car soit le nombre de tubes n'était pas suffisant pour une reconstruction 3D, soit les "lignes de diffractions" étaient trop proches rendant l'indexation difficile.

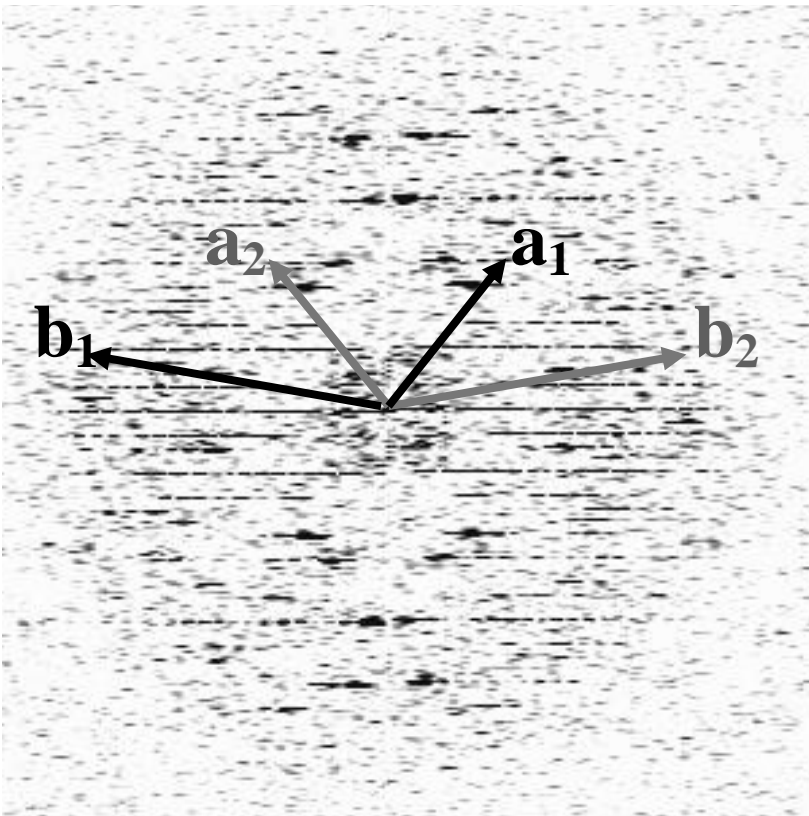
Le premier traitement est réalisé dans l'espace réel (image digitalisée) afin de centrer correctement le tube et de corriger une éventuelle inclinaison. Le but de ce traitement est de faire correspondre exactement les spots de diffraction des deux faces sur une même ligne dans la TF.

### d) La distance de répétition hélicoïdale.

Un deuxième type de traitement vise à déterminer la distance de répétition du tube. Les distances de répétition observées sur les différents tubes ont une longueur qui varie entre 860 et 989 pixels (1169 Å à 1345 Å). C'est un segment du tube, correspondant à un nombre entier de distance de répétition, qui est insérée dans une boîte dont les dimensions sont 512 X 1024 (pixels) et qui est maintenant considérée comme l'image à traiter. Les images de tubes analysées possèdent entre une et trois distances de répétition.

### e) l'indexation du cristal hélicoïdal.

La TF des différentes images permet de voir les spots de diffraction qui proviennent de la face supérieure et inférieure des tubes cristallins (Figure 47).



**Figure 47 - La TF de l'image d'un tube cristallin de la forme EP stable, obtenu par cryomicroscopie électronique.** La TF d'une image d'un cristal hélicoïdal obtenue par cryomicroscopie électronique, produit une série de spots plus ou moins allongés placés sur des lignes équidistantes. Sur cette TF, les spots de diffraction qui proviennent de la face supérieure ( $a_1, b_1$ ) et inférieure des tubes cristallins, sont visibles ( $a_2, b_2$ )

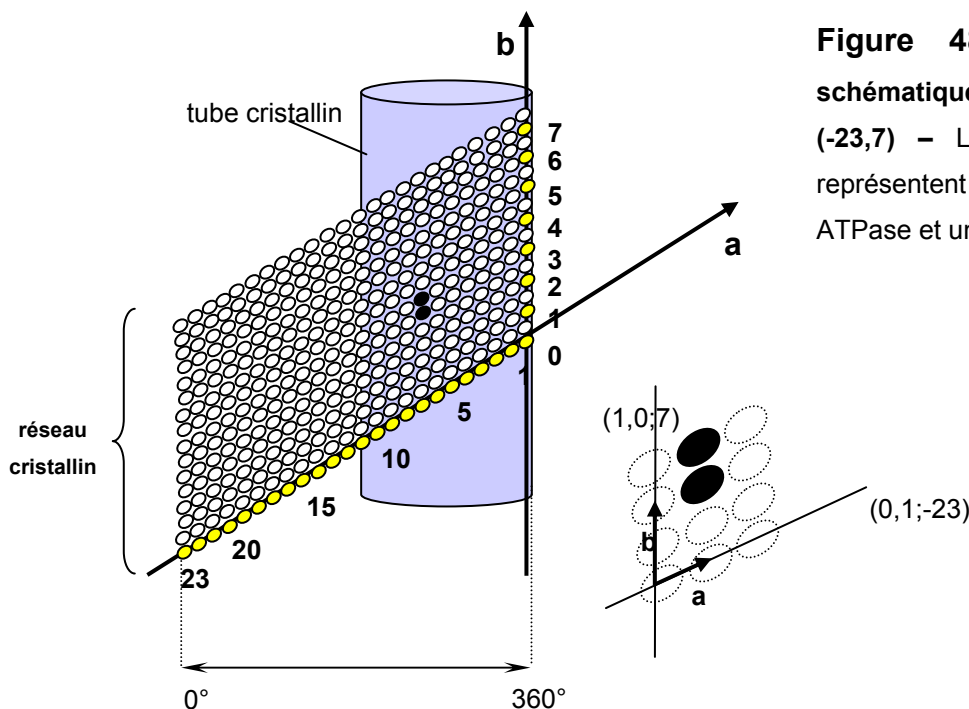
En générale, les clichés diffractent tous jusqu'à 25 Å de résolution avec quelques clichés qui diffractent jusqu'à 15 Å (sans traitement d'images). Chaque ligne, décrite par les spots de diffraction, est définie par une fonction de Bessel. Cette fonction représente graphiquement un pic qui oscille suivant une fonction sinusoïdale atténuée (comme par exemple les vagues obtenues lorsqu'un caillou est jeté au milieu d'un étang). Chaque ligne, de coordonnées (h,k) sur le réseau réciproque (a,b), possède une amplitude (A) et une phase ( $\phi$ ) qui varie de façon prévisible. De plus, chaque ligne est définie sur la TF d'un tube, par l'ordre de la fonction de Bessel (n) et le numéro de la ligne (l), tous deux exprimés en pixel. La caractérisation des ordres de Bessel (n) des lignes de coordonnées (0,1) et (1,0), nous permet d'identifier trois types de symétrie hélicoïdale : -23,7, -22,7 et -21,6. La suite de l'analyse d'image a été effectuée sur les 14 tubes de la famille -23,7 (Figure 48) dont la loi est  $I = 250n + 576m$  (cf. matériels et méthodes).

Après la caractérisation de n et l des lignes de coordonnées (0,1) et (1,0), l'identification des autres lignes est permise grâce aux relations suivantes (Figure 49) :

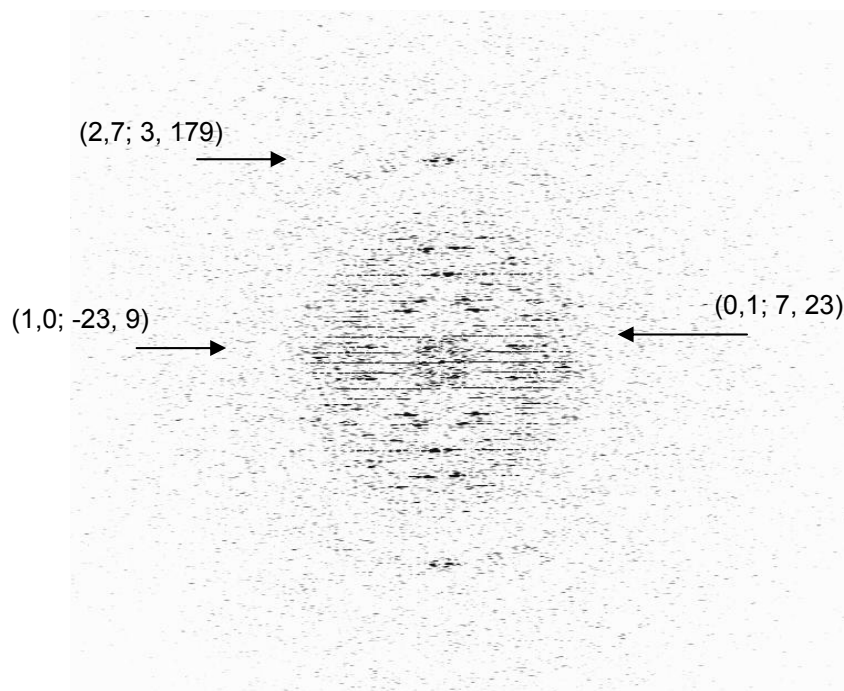
$$n_{(a,b)} = n_{(1,0)} \times a + n_{(0,1)} \times b$$

$$l_{(a,b)} = l_{(1,0)} \times a + l_{(0,1)} \times b$$

Ex. : pour le groupe -23,7 ;  $n_{(2,7)} = -23 \times 2 + 7 \times 7 = 3$



**Figure 48 - Une représentation schématique d'une symétrie hélicoïdale (-23,7) - Les cercles jaunes et noirs représentent respectivement une Ca-ATPase et un dimère d'ATPases.**



**Figure 49** - L'indexation de la TF de l'image d'un tube cristallin (-23,7) de la forme EP stable, obtenu par cryomicroscopie électronique – Sur cette TF, nous pouvons observer les spots de diffractions de coordonnées (2,7) avec  $n = 3$  et  $l = 179$  et correspond à une résolution  $\sim 15 \text{ \AA}$ .

Néanmoins, la déformation du cristal induit un déplacement de quelques pixels de certaines lignes. Une série de programmes permet de diviser la distance de répétition en fragments de taille identique, afin de détecter et de corriger par des opérations de torsion, d'étirement et d'inclinaison, les déformations du cristal (cf. matériels et méthodes). Ce traitement améliore sensiblement le rapport de signal/bruit le long des lignes, en replaçant tous les spots sur les mêmes pixels. Enfin, la dernière correction à appliquer aux données est la prise en compte de la fonction de transfert de contraste (CTF), lié à l'aberration de sphéricité du microscope (cf. matériels et méthodes).

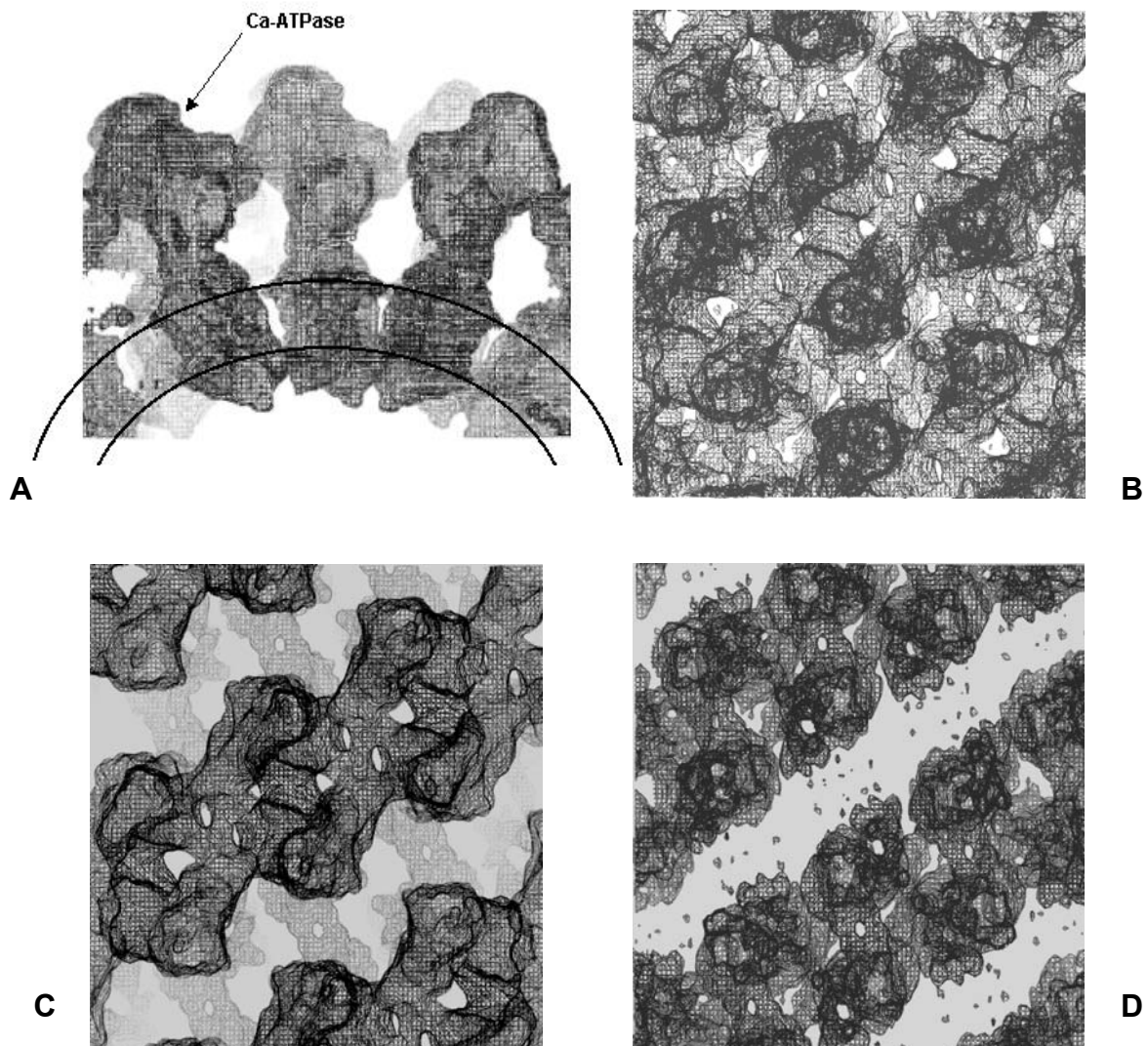
#### f) La reconstruction 3D.

Nous avons utilisé 21 distances de répétition après correction pour effectuer la moyenne. Les cartes de projection ont été générées à une résolution de  $8 \text{ \AA}$ . Au-delà de cette résolution, tous les spots de diffractions ne sont pas présents et les résiduels de phase sont proches de  $45^\circ$  (tableau 5), ce qui nous ne permet pas d'avoir des cartes fiables.

**Tableau 5** : Résiduel de phase et nombre de spots en fonction de la résolution.

Résolution	40 Å	30 Å	20 Å	14 Å	10 Å	8 Å	7 Å
Résiduel phase	2,35°	3,86°	10,86°	26,01°	37,78°	43,26°	44,89°
Nbre de spots	288/288 (100 %)	412/412 (100 %)	1622/1622 (100 %)	4308/4310 (99,9 %)	11192/11198 (99,9 %)	16312/16325 (99,9 %)	15231/15242 (99,9 %)

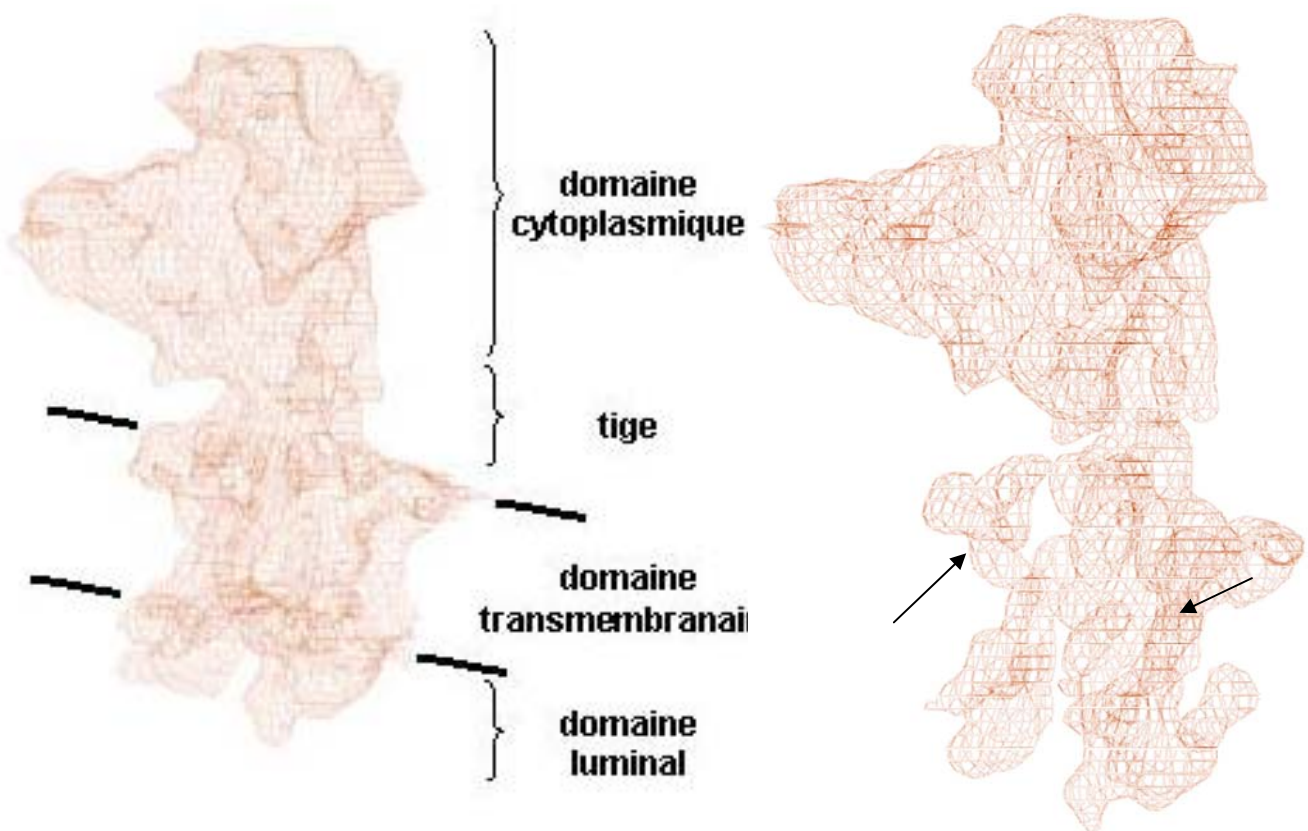
A partir de ces cartes de projections, qui correspondent à des sections perpendiculaires au plan de la membrane, une reconstruction 3D du tube cristallin a été réalisée (Figure 50). La section transversale du tube nous permet de localiser la membrane (Figure 50A, demi-cercle noir), dans laquelle sont ancrées les molécules d'ATPase sous la forme EP. La carte de projection (vue de dessus) du tube entier est complexe à décrire (Fig. 50B), nous avons donc séparé la partie supérieure du tube (Figure 50C), c'est à dire les domaines extramembranaires, de la partie inférieure qui correspond aux domaines transmembranaire et luminal de l'ATPase (Fig. 50D).



**Figure 50 - La reconstruction 3D du cristal tubulaire du dérivé EP stable - (A)** Une section transversale du tube. Les demi cercles représentent les deux feuillets de la membrane **(B)** La projection du tube entier avec une vue de dessus. **(C)** La projection de la partie supérieure du tube. **(D)** La projection de la partie inférieure du tube.

La partie extramembranaire est comparable aux cartes de projection générées à partir d'images de coloration négative (Figure 45). Les ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  forment un arrangement linéaire de dimère "tête-bêche", représenté sur la carte par une paire de densité antiparallèle centrée sur un axe de symétrie d'ordre 2. L'observation de la partie inférieure permet d'identifier des zones de contact à l'intérieur d'un dimère, entre les molécules d'ATPases. Ces contacts intramoléculaires ont été décrit par Taylor et Martonosi pour la forme  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  [92]. Il semble que ces interactions caractérisent la formation de tube cristallin avec un arrangement particulier des protéines.

Il est relativement facile d'individualiser les ATPases à partir de la reconstruction 3D du tube. Nous avons obtenu la structure 3D du dérivé EP à 8 Å de résolution, qui présente une large partie cytoplasmique (Figure 51A), connecté au domaine transmembranaire par une tige plus étroite (stalk). Le tiers inférieur de la structure correspond au domaine transmembranaire et au petit domaine situé du côté de luminal. A cette résolution, la majorité des hélices transmembranaires sont identifiables par une densité en forme de "manchon" (Figure 51B, flèches noires).



**Figure 51** - La structure 3D du dérivé EP à 8 Å de résolution – Les flèches indiquent les densités électroniques correspondant aux hélices transmembranaires.



## E. L'analyse structurale du dérivé EP stable.

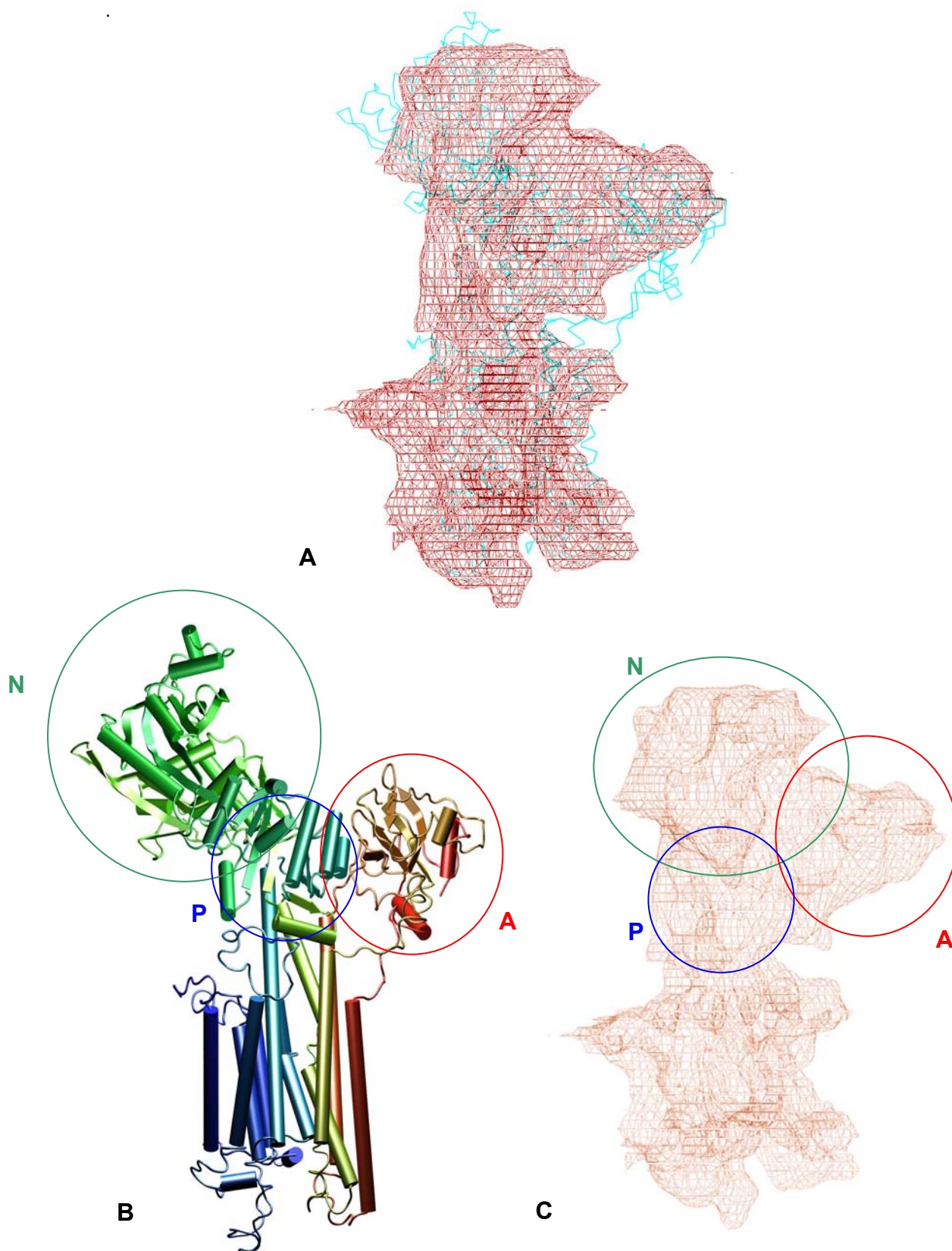
Afin de caractériser cette première structure du dérivé EP, nous l'avons comparé aux structures existantes. En effet, il existe deux structures atomiques  $E_1Ca_2$  (1EUL PDB) et  $E_2H_3TG$  (1IWO PDB), ainsi qu'une structure 3D de  $E_2H_3VO_4$  obtenue par cryomicroscopie électronique [95, 102 - 103].

Un programme informatique (URO) développé par Jorge Navaza [133], permet une superposition optimale soit d'une structure atomique déterminée par diffraction des rayons X avec une structure 3D obtenue par cryomicroscopie électronique, soit de deux structures 3D obtenues par cryomicroscopie électronique. La minimisation s'effectue dans l'espace réciproque, ce qui permet de traiter des grands volumes et de choisir la résolution à laquelle nous voulons travailler [133]. Le traitement informatique nous donne une valeur de corrélation croisée entre les deux structures étudiées (Tableau 6). Les chiffres montrent des différences importantes que nous avons analysées en comparant les structures deux par deux.

**Tableau 6:** Paramètres de corrélation croisée entre la structure 3D de la forme EP et les autres structures existantes.

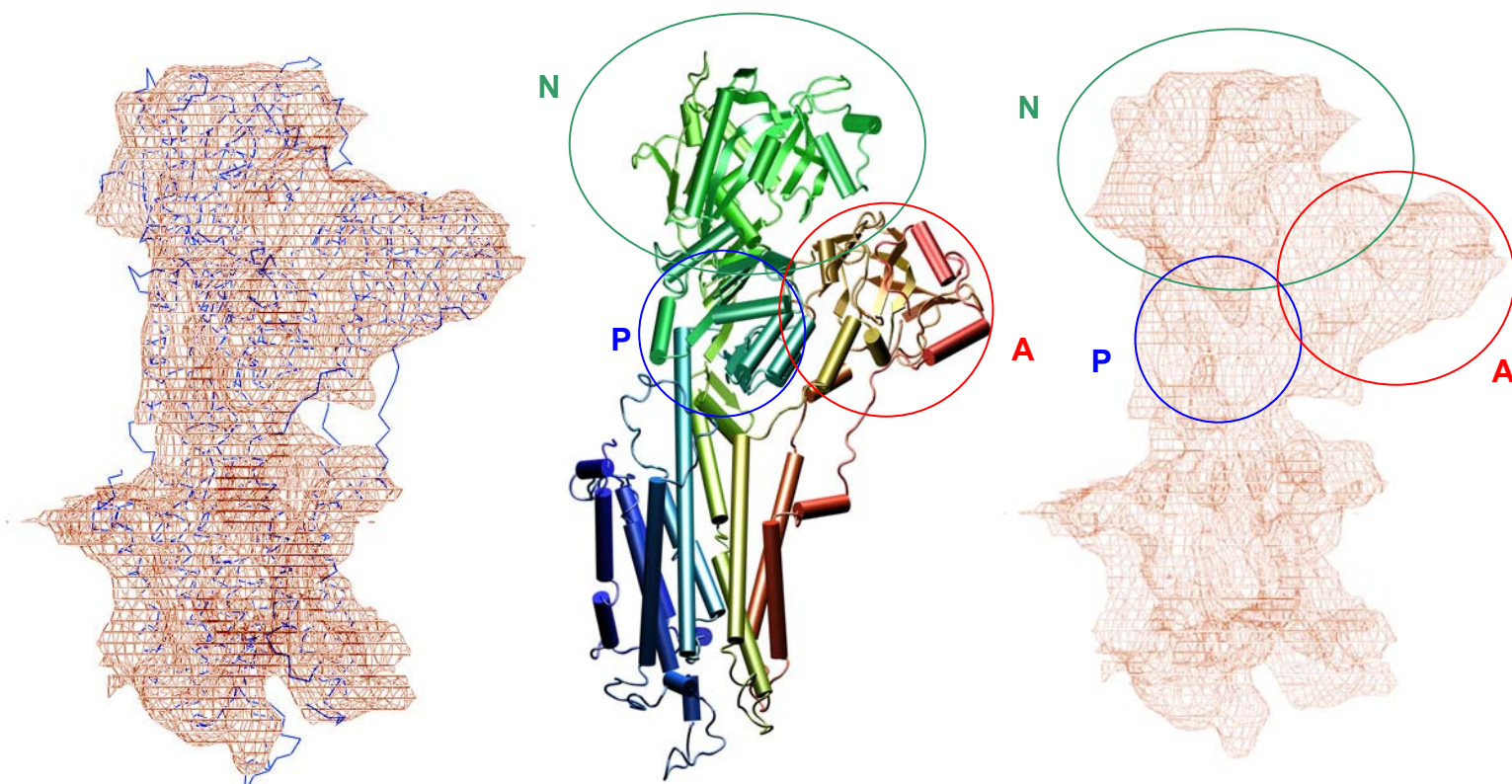
Structure	Corrélation (%)
$E_1Ca_2$	69.1
$E_2H_3TG$	86.6
$E_2H_3VO_4$	95.6

- **$E_1Ca_2$  (1EUL) vs EP** : Visuellement, les différences entre les deux structures sont importantes (Figure 52A). La valeur de corrélation croisée entre les deux structures n'est en effet que de 69 % (Table 6).  $E_1Ca_2$  correspond à la conformation dite "ouverte" avec les domaines N et A dirigés vers l'extérieur de la protéine (Figure 52B). Le dérivé EP correspond à la conformation dite "fermée" comme décrit précédemment pour les formes  $E_2H_3VO_4$  et  $E_2H_3TG$  [102 - 103]. Cette superposition nous permet de localiser les domaines A, N et P sur la structure du dérivé EP (Figure 52C).



**Figure 52 - La comparaison entre E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> et EP – (A)** La superposition optimale des structures 3D de E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> (1EUL, bleu) et EP (rouge). **(B)** Structure atomique de E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub>. **(C)** Structure de EP à 8 Å de résolution. Les domaines extramembranaires marqués N, A et P correspondent respectivement aux domaines Nucléotidique, Actuator et de Phosphorylation.

• **E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG (1WIO) vs EP** : La superposition des deux structures (Figure 53A), nous donne une valeur de corrélation croisée de 86.6 % (Table 6), ce qui est en accord avec la "fermeture" des domaines A, N et P [103]. La superposition des deux structures permet de confirmer la localisation des différents domaines extramembranaires dans les densités électroniques de EP (Figure 53B, C). La recherche visuelle des différences nous permet de constater, notamment, que le domaine N est orienté différemment, il semble être plus proche du domaine P dans la forme E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG. Cette différence peut traduire l'effet de la présence d'un phosphate lié de façon covalente à l'Asp351 pour le dérivé EP. De même, les connections entre le domaine A et les segments transmembranaires M1 – M3 sont localisées de façon différente. Comme il est décrit plus tard, cette région constitue l'entrée des sites hautes affinités pour le calcium [129]. Cette différence peut révéler une accessibilité différente des sites hautes affinités entre E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG et EP. Cependant, la basse résolution de la structure 3D de EP ne nous permet de caractériser des mouvements fin dans ces régions.



**Figure 53 - La comparaison entre E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG et EP** – (A) La superposition optimale des structures 3D de E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG (1EUL, bleu) et EP (rouge). (B) Structure atomique de E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG. (C) Structure de EP à 8 Å de résolution. Les domaines extramembranaires marqués **N**, **A** et **P** correspondent respectivement aux domaines Nucléotidique, Actuator et de Phosphorylation.

- **$E_2H_3VO_4$  vs EP** : Les structures 3D des formes  $E_2H_3VO_4$  (bleu) et EP (rouge) ont été générées à la même résolution de 8 Å (Figures 54 - 55). Comme avec les cartes de projection en coloration négative (cf. D.1), nous observons un aspect général très proche. La superposition des deux structures nous donne une valeur de corrélation croisée d'environ 96 % (Table 6). Nous considérons que la différence entre les deux structures est significative, puisque la superposition d'une structure sur elle-même par le programme URO, donne une valeur de corrélation croisée de 100 %. Nous avons donc cherché à identifier visuellement les régions de la Ca-ATPase qui ont changées entre les deux formes de l'enzyme (Figures 54 - 55).

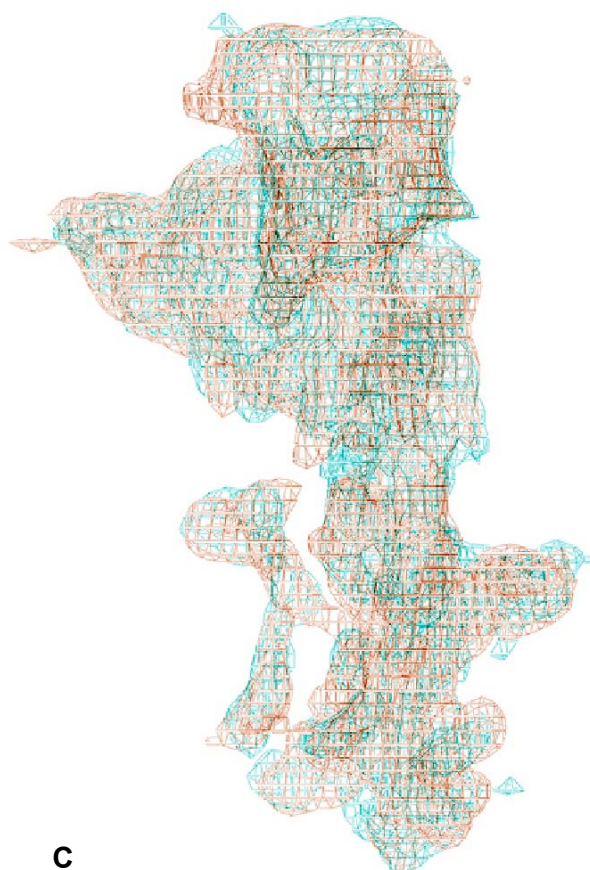
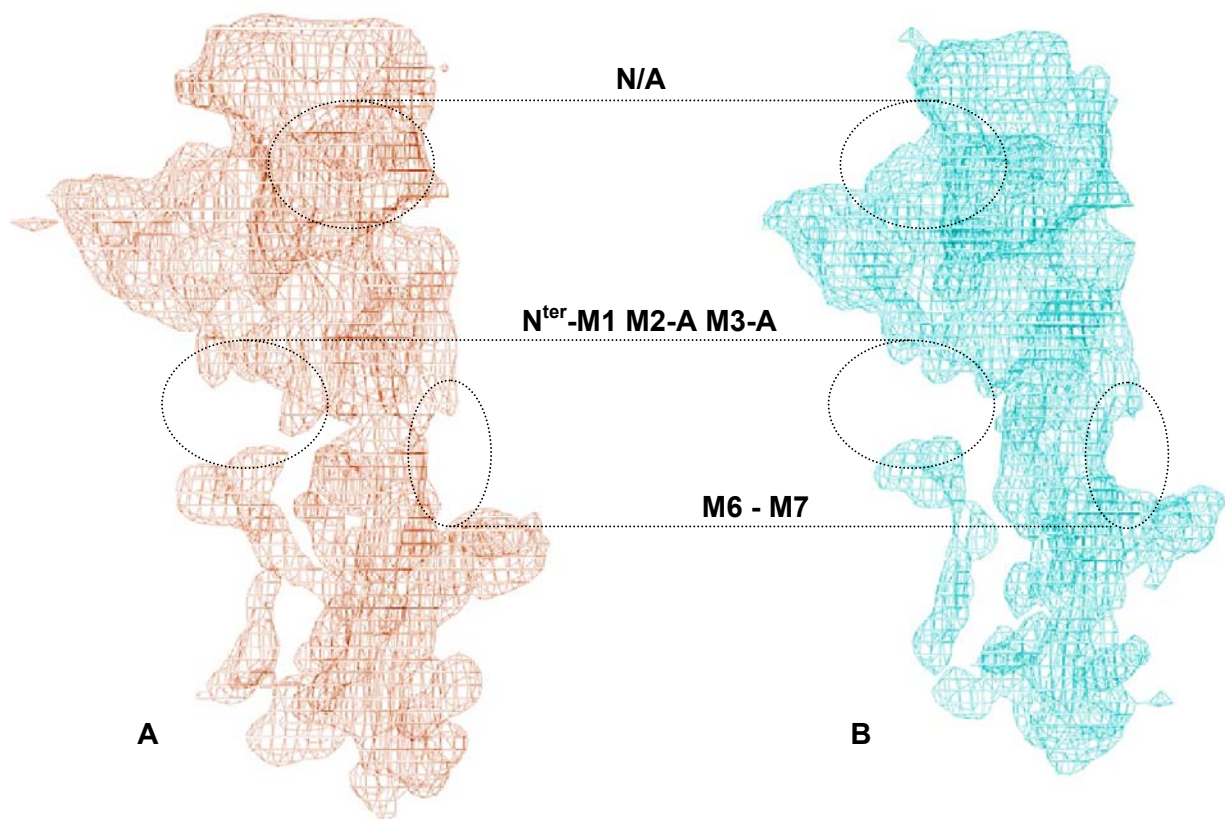
### - Interaction/contact entre les domaines N et A.

Nous observons certaines modifications, notamment au niveau de l'interface des domaines N et A (Figure 54, N/A). La différence observée peut correspondre à un mouvement de N et/ou de A, qui pourrait être lié à la stabilisation exceptionnelle du dérivé EP. En effet, cette interface est décrite par Toyoshima comme étant une région importante dans la stabilisation de la conformation "fermée" de  $E_2H_3TG$ , ceci *via* la mise en place de liaisons hydrogènes entre les deux domaines [103]. L'établissement de nouvelles liaisons hydrogènes stabilisatrices entre les domaines N et A peut être envisagé pour le dérivé EP. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que cette modification soit due à la présence du FITC, qui établirait un lien entre ces domaines.

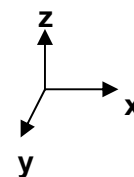
### - Connexions entre le domaine A/N<sup>ter</sup> et les segments transmembranaires (M1 – M3).

Nous observons des modifications au niveau de la région amino-terminale, qui interagit avec le domaine A, ainsi que des boucles qui relient l'hélice transmembranaire M1(N<sup>ter</sup>-M1) et les hélices transmembranaires M2 et M3 au domaine A (M2-A et M3-A, Figures 54 - 55, cercles en pointillés). Ces boucles sont décrites comme étant non structurées [102 – 103]. Les différences relevées entre  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$  pour M1, M2 et M3 seraient logiquement associées à la dissociation du calcium [103]. Dans notre cas, aucun ion calcium n'est présent dans les formes que nous comparons. Ainsi, le mouvement observé pourrait être associé à l'accessibilité des sites hautes affinités pour le calcium entre EP et  $E_2H_3VO_4$ .



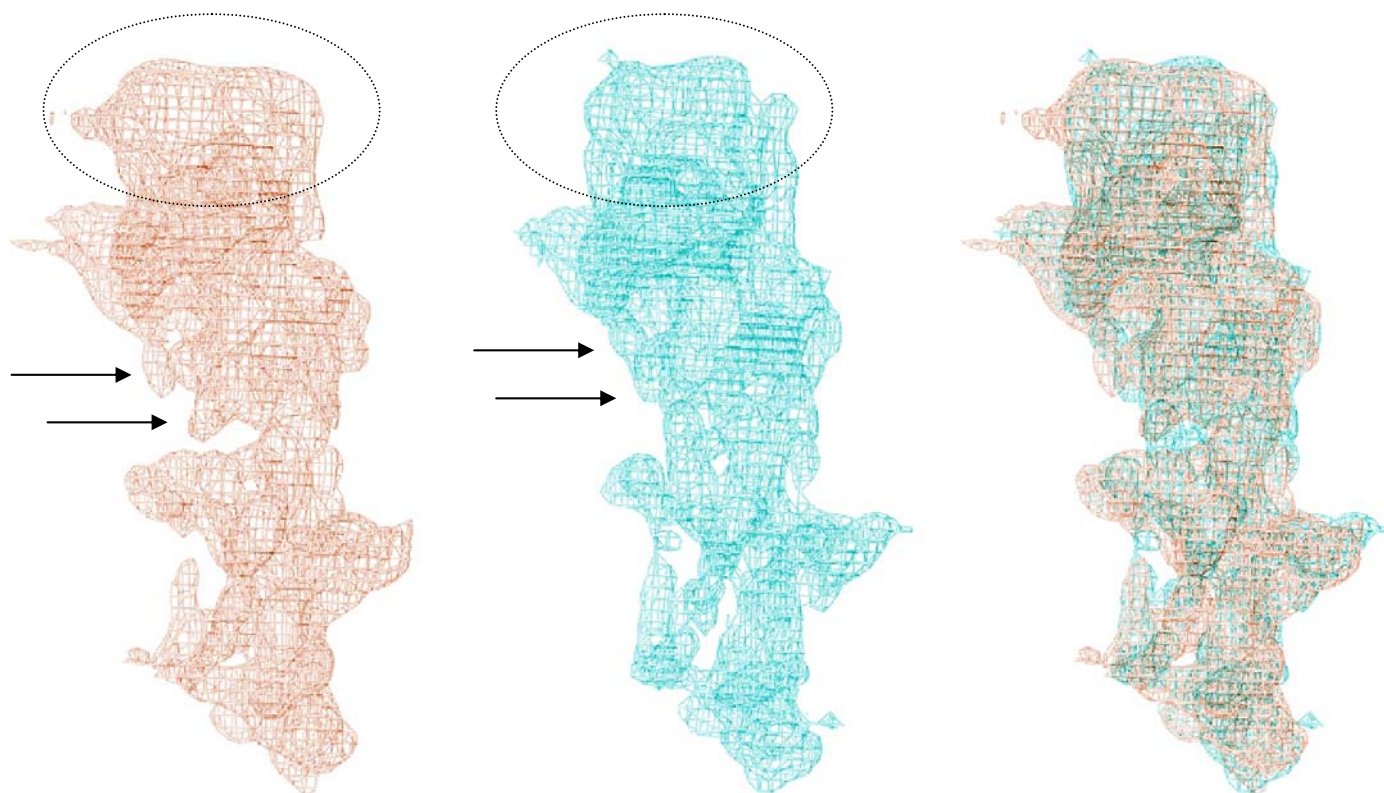


**Figure 54 - La comparaison (1) des structures 3D à 8 Å de résolution des formes  $E_2H_3VO_4$  et EP - (A) EP (B)  $E_2H_3VO_4$  et (C) la superposition des deux structures.**



- Boucle M6-M7.

La région de la Ca-ATPase qui permet de lier les mouvements du site de phosphorylation et des sites de haute affinité pour le calcium, est la région de la tige (stalk). La boucle qui relie les hélices M6 et M7 est située dans cette région charnière. Il a été proposé que le mouvement de la boucle M6-M7 puisse être lié à l'accessibilité/orientation, des sites de haute affinité pour le calcium et au mouvement de P [136]. Nous observons une modification, moins importante que les précédentes, entre les structures de EP et  $E_2H_3VO_4$  au niveau de cette région M6-M7 (Figures 54 - 55). Cette différence peut, comme les précédentes, révéler une accessibilité différente des sites de haute affinité pour le calcium entre les deux structures, ainsi que la présence d'un phosphate lié de façon covalente à l'Asp351.



**Figure 55** - La comparaison (2) des structures 3D à 8 Å de résolution des formes  $E_2H_3VO_4$  et EP – (A)  $E_2H_3VO_4$  (B) EP et (C) la superposition des deux structures.

## F. La caractérisation biochimique du dérivé EP stable.

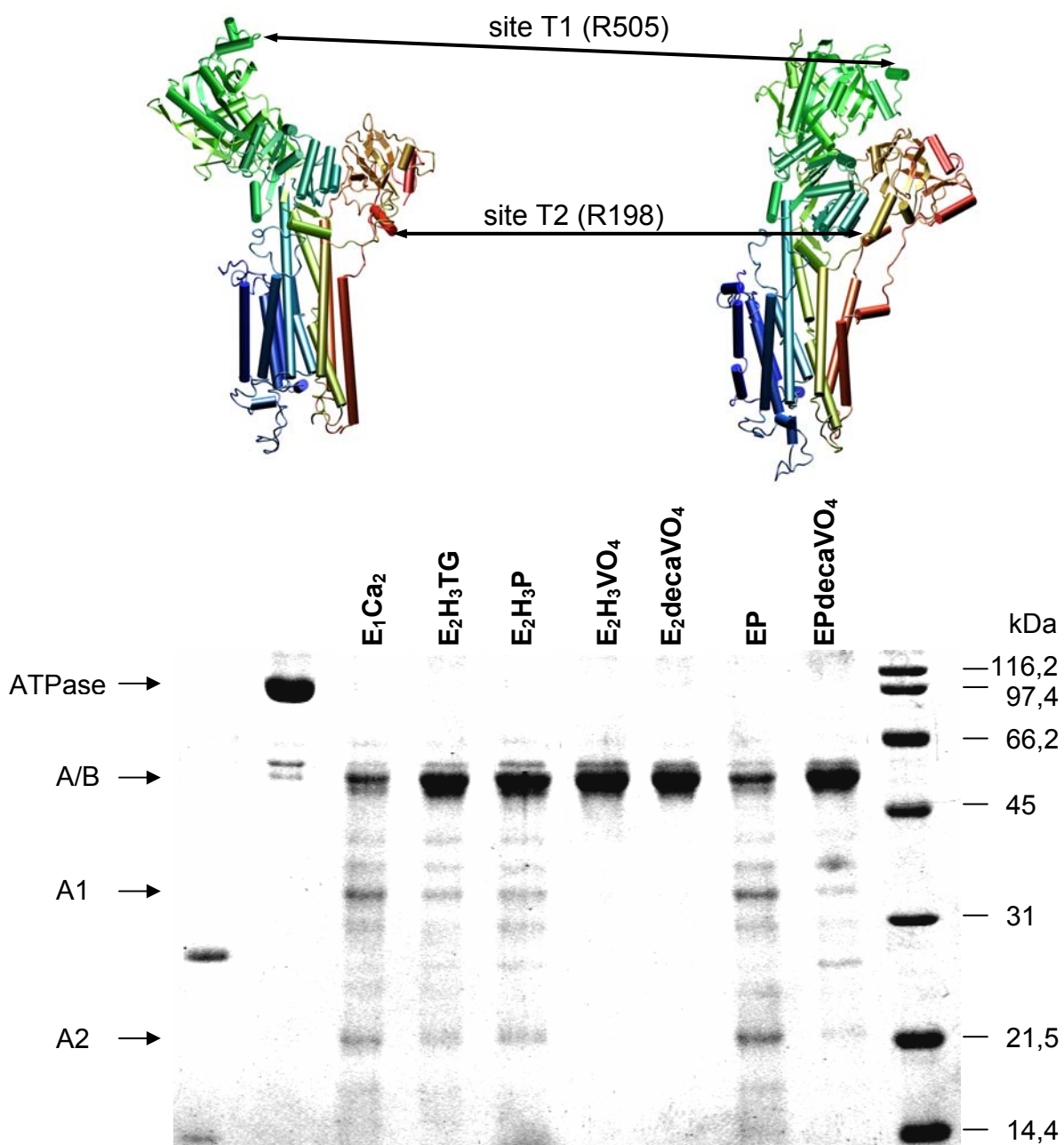
Nous avons cherché à confirmer par des méthodes biochimiques simples comme la trypsinisation et la chromatographie d'affinité, qu'il existe bien des différences entre toutes ces structures 3D de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , en particulier entre les formes  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  et EP.

### F.1 La trypsinisation des différents intermédiaires catalytiques de la FITC-ATPase.

La protéolyse ménagée a permis de démontrer la présence de deux sites de coupure à la trypsinase, situés au niveau des boucles du domaine N (site T1, Figure 56A) et du domaine A (site T2, Figure 56A) [119]. Une coupure au site T1 permet de séparer l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  en deux fragments de poids moléculaire très proche: A (52 kDa) et B (57 kDa). Une coupure au site T2, donne les fragments A1 (31 kDa) et A2 (23 kDa). La digestion trypsique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  native fût utilisée à l'origine pour mettre en évidence les changements conformationnels de l'enzyme au moment de la liaison du calcium et de la phosphorylation [119 – 120, 134 - 135]. Ainsi, il est décrit que le site T1 est toujours accessible alors que le site T2 est plus accessible pour la forme  $\text{E}_1\text{Ca}_2$ , puis  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$  à égalité avec  $\text{E}_1\text{AMP-PNP}$ ,  $\text{E}_1\text{ADP}$  [134 – 135]. Par contre, aucune coupure en T2 n'a été observée pour la forme  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  [134 – 135]. Nous avons comparé le profil de digestion trypsique de la FITC-ATPase selon sa conformation et pour un même temps d'incubation. Pour cela différents milieux ont été choisis afin de stabiliser préférentiellement les formes  $\text{E}_1\text{Ca}_2$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{P}$  et EP de la FITC-ATPase (cf. matériels et méthodes).

Nous observons que le profil électrophorétique après digestion à la trypsinase des formes  $\text{E}_1\text{Ca}_2$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  et  $\text{E}_2\text{H}_3\text{P}$  de la FITC-ATPase, possèdent des caractéristiques proches de celles décrites pour la Ca-ATPase natif [134 – 135]. Ainsi, le site T1 est toujours accessible, quelle que soit la conformation de l'enzyme (Figure 56B). Cette coupure en T1 est observée dès les premières secondes d'incubation. Par contre, l'accessibilité du site T2 dépend de la conformation de l'enzyme et donc de la position du domaine A (Figure 56A). Dans la conformation "ouverte" de la FITC-ATPase, c'est à dire la forme  $\text{E}_1\text{Ca}_2$ , la coupure en T2 est plus facile par rapport aux conformations "fermées". Aucune coupure en T2 n'a été observée pour la forme  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$ , même après 10 min d'incubation en présence de trypsinase. Nous remarquons que le profil électrophorétique, après digestion à la trypsinase,

entre les formes  $E_2H_3VO_4$  et  $E_2\text{déca}VO_4$  est identique. Par contre, nous observons une accessibilité au site T2 légèrement différente entre EP et  $EP\text{déca}VO_4$ . La présence de décavanadate, qui très rapidement pontre deux ATPases [90], semble masquer le site T2 qui pourrait être situé à l'interface entre les dimères d'ATPase.



**Figure 56-** Le profil électrophorétique de la digestion trypsique de la FITC-ATPase – La FITC-ATPase a été stabilisée sous différentes formes et incubée pendant 30 s en présence de trypsine. La digestion est arrêtée en précipitant les protéines dans un milieu acide PCA 4 %.



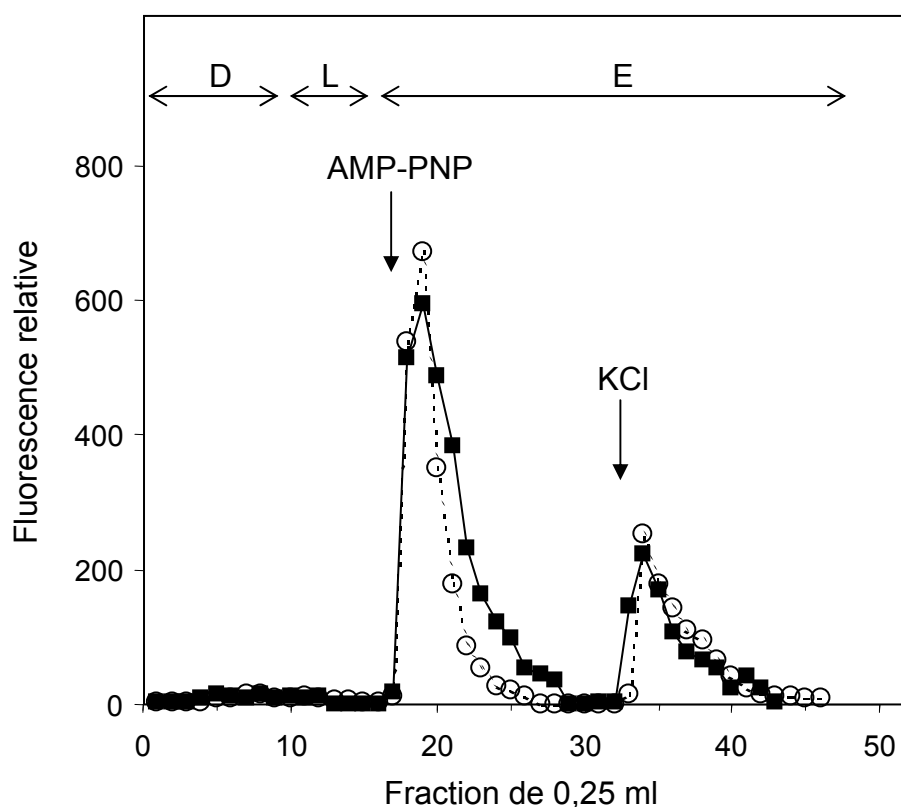
Nous pouvons conclure que (i) le profil de digestion trypsique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  native est semblable à celui de la FITC-ATPase. Nous pouvons donc corréler les comparaisons faites entre les structures des formes  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$  (native),  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  (native) et EP (FITC), avec celles faites après trypsinisation (ii) il existe des mouvements ou une réorganisation des structures secondaires du domaine A entre les formes  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$  (native),  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  (native) et EP (FITC), ce qui corroborent nos observations décrite plus haut (cf. E).

### **F.2 L'identification des différents intermédiaires catalytiques de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ native et la FITC-ATPase, par chromatographie sur une colonne Agarose-Red120.**

Pour obtenir une préparation d'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  pure, une technique de chromatographie d'affinité a été mise au point [130]. La protéine solubilisée en détergent est absorbée sur une matrice agarose-Red120. Il a été décrit que la protéine est retenue *via* des interactions entre le réactif Red120 (Figure 60) et le site catalytique de l'enzyme [130, 149]. Son élution est réalisée par compétition avec une solution de nucléotide ou avec une solution de forte concentration saline.

#### **F.2.1 Les caractéristiques générales de la chromatographie d'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ native et de la FITC-ATPase sur une colonne d'affinité Red120-agarose.**

Dans nos conditions, la majorité des ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  natives ou FITC-ATPases (>95 %) solubilisées en  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  (détergent/protéine = 2 poids/poids) en présence de calcium, sont retenues dans la colonne agarose-Red120 lors du dépôt et du lavage (Figure 57). Une solution 10 mM AMP-PNP permet l'élution de  $65\% \pm 5$  de protéine. Le passage d'une solution de 2 M KCl permet de libérer  $25\% \pm 5$  de protéine. La somme des surfaces occupées par les deux pics d'élution, représente 90 % de la totalité des protéines déposée sur la colonne. Nous retrouvons la même capacité de rétention pour la FITC-ATPase que pour l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  ( $\geq 18$  mg de protéine/ ml résine).



**Figure 57** - Comparaison des profils d'éluion de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  native et de la FITC-ATPase sur une colonne agarose-Red120 – D, L et E correspondent respectivement aux volumes déposés, de lavage puis d'éluion des protéines. Les symboles vides et pleins correspondent respectivement à l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  native et la FITC-ATPase.

### F.2.2 La chromatographie de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ native en fonction de sa conformation, sur une colonne d'affinité agarose-Red120.

Différents milieux ont été choisis afin de stabiliser préférentiellement les formes  $\text{E}_1\text{Ca}_2$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$  de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  native solubilisée en  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  (cf. matériels et méthodes). Les effets de la concentration en nucléotide (AMP-PNP et ADP) ou en sel (KCl et NaCl), sur l'éluion des différentes formes de l'enzyme, sont présentés figure 58. Les résultats de la rétention et du  $K_{0,5}$  sont présentés tableau 7.

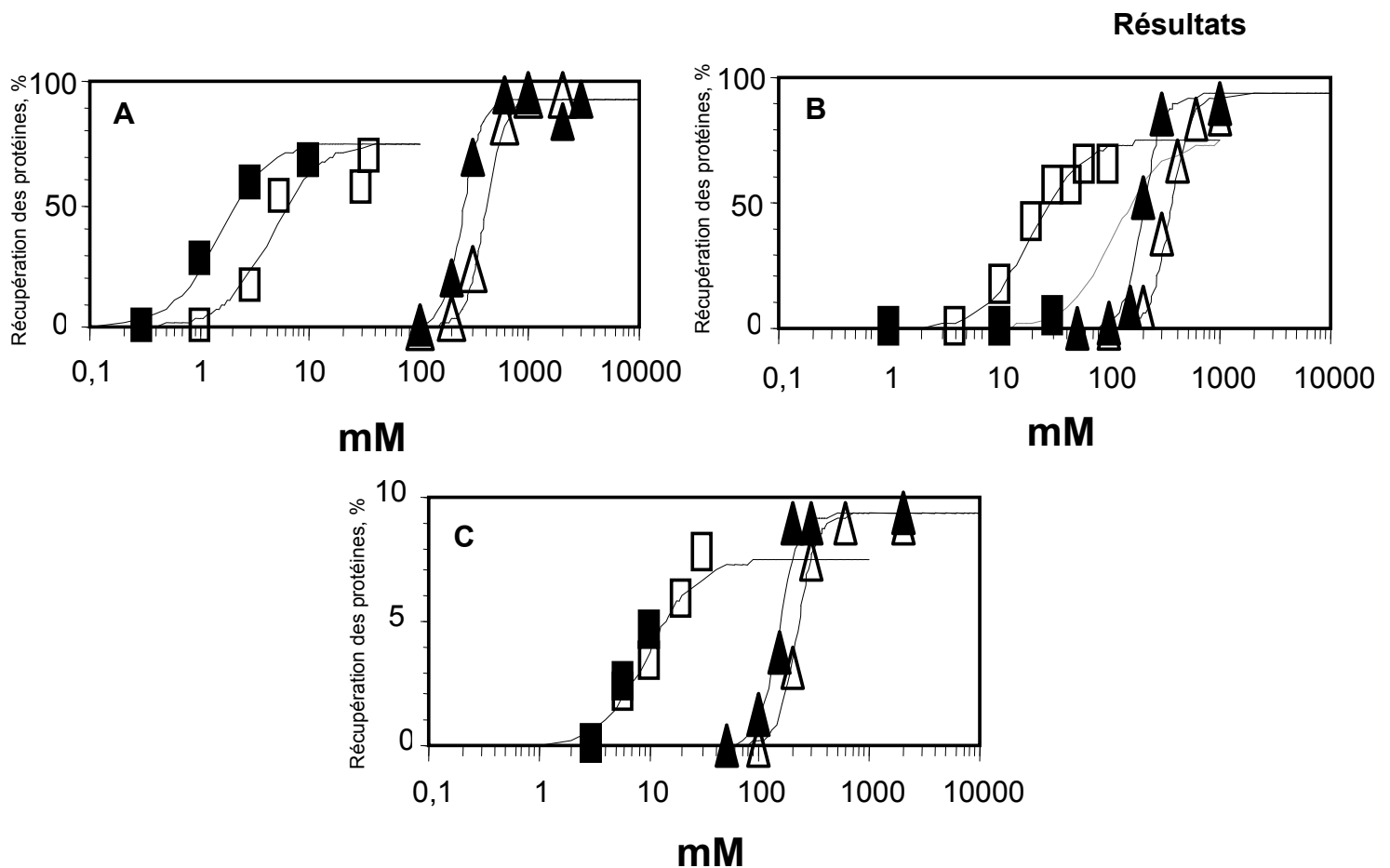
Les concentrations en AMP-PNP et ADP qui permettent l'éluion de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , sont différentes selon la conformation de l'enzyme. L'éluion de la forme  $\text{E}_1\text{Ca}_2$  est induite par les concentrations les plus basses. Nous retrouvons la différence d'affinité de la forme  $\text{E}_1\text{Ca}_2$  pour l'AMP-PNP et l'ADP avec  $[\text{AMP-PNP}]/[\text{ADP}] = 3$ . Cependant, ces concentrations sont 100 fois supérieures à celle nécessaire pour saturer les sites de fixation du nucléotide de l'enzyme. Nous retrouvons une

différence d'affinité importante pour l'AMP-PNP entre  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$  ( $[AMP-PNP]_{E_2TG} / [AMP-PNP]_{E_1Ca_2} > 66$ ). Cette différence d'affinité a nettement diminué pour l'ADP ( $[ADP]_{E_2H_3TG} / [ADP]_{E_1Ca_2} = 4,5$ ). L'élution de la forme  $E_2H_3VO_4$  est induite par des concentrations en AMP-PNP et ADP identiques. De plus, la différence d'affinité pour les nucléotides entre  $E_1Ca_2$  et  $E_2VO_4$  est moins importante qu'entre  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$  ( $[AMP-PNP]_{E_2H_3VO_4} / [AMP-PNP]_{E_1Ca_2} = 6,6$  et  $[ADP]_{E_2H_3VO_4} / [ADP]_{E_1Ca_2} = 2,2$ ). Enfin, un nHill a été estimé égal à 2, quelle que soit la conformation de la Ca-ATPase native, ce qui suggère un mécanisme coopératif avec la mise en jeu d'au moins **deux réactifs Red120**.

**Tableau 7 :** Les caractéristiques de la chromatographie d'affinité de l'ATPase- $Ca^{2+}$  native sur une colonne agarose-Red120.

	Rétention	AMP-PNP	ADP	KCl	NaCl
<b><math>E_1Ca_2</math></b>	oui	1,5 mM	4,5 mM	200 mM	400 mM
<b><math>E_2H_3TG</math></b>	oui	> 100 mM	20 mM	250 mM	350 mM
<b><math>E_2H_3VO_4</math></b>	oui	10 mM	10 mM	150 mM	220 mM

Les valeurs de  $K_{0,5}$  obtenues pour les éluions en présence de KCl et NaCl, nous indiquent que l'élution de la forme  $E_2H_3VO_4$  est induite pour une concentration plus faible en sel, suivie de  $E_2H_3TG$  et de  $E_1Ca_2$ . Nous observons que l'élution totale des protéines pour les formes  $E_1Ca_2$ ,  $E_2H_3TG$  et  $E_2H_3VO_4$  par une solution saline (KCl ou NaCl), fait intervenir un mécanisme nettement plus coopératif, avec un nHill égale à 5 ce qui suggère que plusieurs charges sont impliquées dans l'interaction entre la résine agarose-Red120 et l'ATPase- $Ca^{2+}$  native. Cette observation est en accord avec la mise en jeu d'au moins deux réactifs Red120.



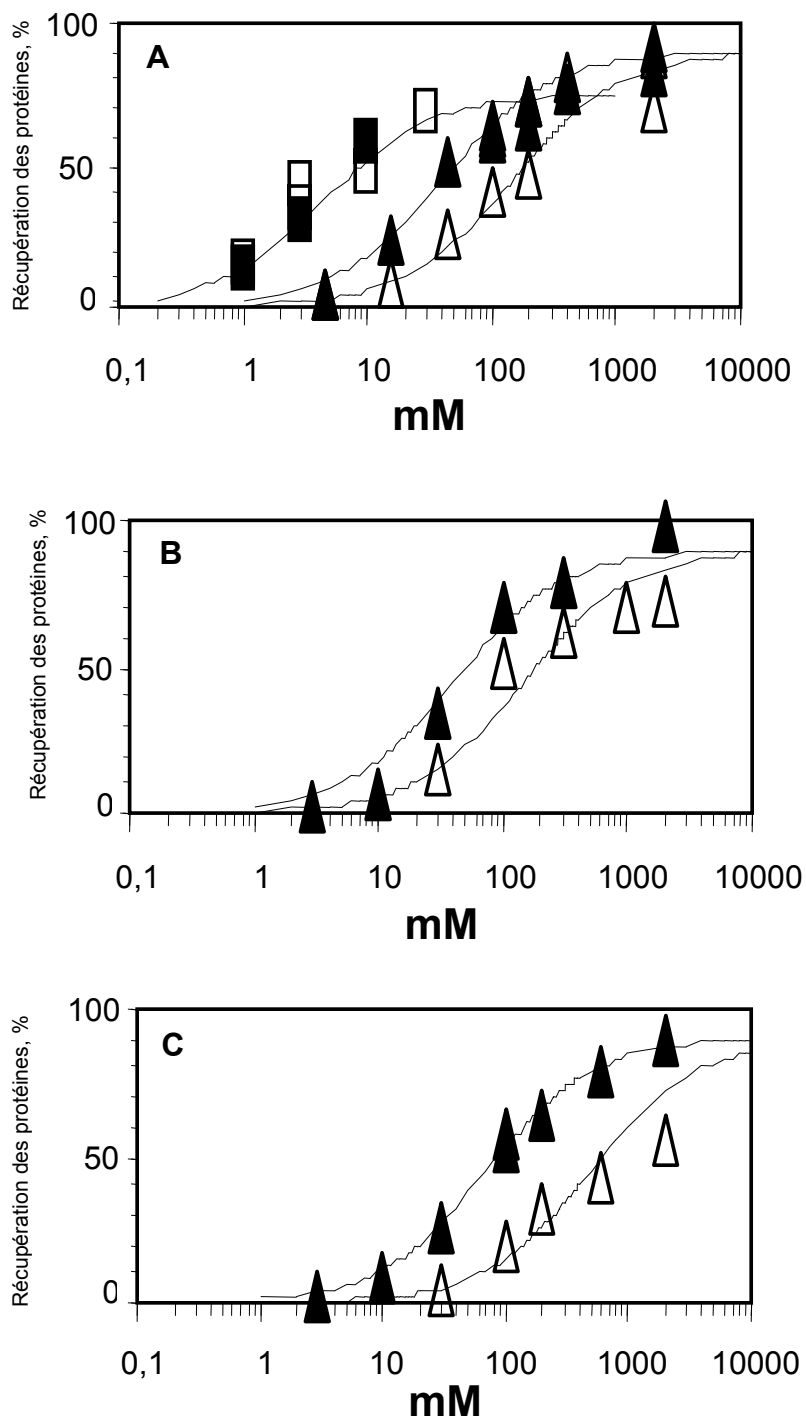
**Figure 58 - Les effets de la concentration en nucléotide ou en sel sur l'éluion des différentes formes de la Ca-ATPase native – (A)  $E_1Ca_2$ , (B)  $E_2H_3TG$  et (C) EP, carrés plein : AMP-PNP, carrés vides : ADP, triangles pleins : KCl et triangles vides : NaCl.**

### F.2.3 La chromatographie d'affinité de la FITC-ATPase en fonction de sa conformation sur une colonne agarose-Red120.

Différents milieux ont été choisis afin de stabiliser préférentiellement les formes  $E_1Ca_2$ ,  $E_2H_3TG$ ,  $E_2H_3VO_4$  et EP de la FITC-ATPase solubilisée en  $C_{12}E_8$  (cf. matériels et méthodes). Il est décrit que le dérivé EP solubilisé en détergent est toujours stable sur plusieurs heures [121]. Les effets de la concentration en nucléotide (AMP-PNP et ADP) ou en sel (KCl et NaCl), sur l'éluion des différentes formes de l'enzyme, sont présentés figure 59. Les résultats de la rétention et du  $K_{0,5}$  sont présentés tableau 8.

Contrairement à la forme  $E_2H_3VO_4$ , les formes  $E_1Ca_2$ ,  $E_2H_3TG$  et EP de la FITC-ATPase, sont retenues sur la colonne agarose-Red120. Seule l'éluion de la forme  $E_1Ca_2$  est induite à la fois par l'AMP-PNP et l'ADP. Cependant, nous n'observons plus de différence d'affinité entre les deux nucléotides ( $[AMP-PNP]/[ADP] = 1$ ). La libération de la forme  $E_1Ca_2$  ne fait plus intervenir un mécanisme coopératif ( $n_{Hill} = 1$ ). La présence du FITC dans le domaine N semble empêcher

l'interaction de l'enzyme avec l'un des groupements Red120 de la colonne. La FITC-ATPase semble donc interagir avec un seul réactif Red120.



**Figure 59** - Les effets de la concentration en nucléotide ou en sel sur l'éluion des différentes formes de la FITC-ATPase – (A) E<sub>1a2</sub>, (B) E<sub>2H3TG</sub> et (C) EP carrés pleins : AMP-PNP, carrés vides : ADP, triangles pleins : KCl et triangles vides : NaCl.

**Tableau 8** : Les caractéristiques de la chromatographie d'affinité de la FITC-ATPase sur une colonne agarose-Red120. **X** : aucune concentration testée n'a permis l'élution de protéine.

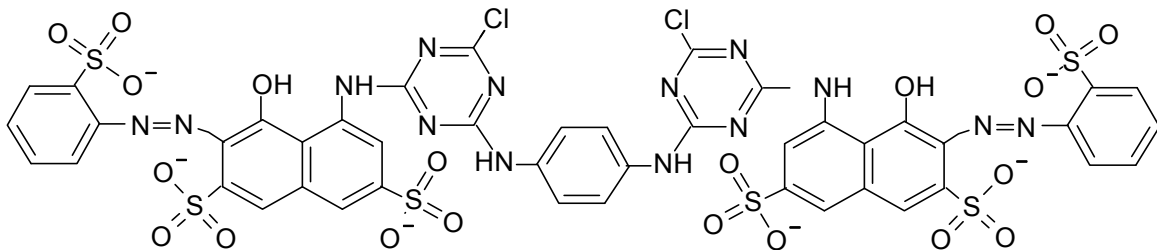
	Rétention	AMPPNP	ADP	KCl	NaCl
<b>E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub></b>	oui	4,5 mM	4,5 mM	40 mM	150 mM
<b>E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG</b>	oui	nd	X	40 mM	150 mM
<b>E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	non	-	-	-	-
<b>EP</b>	oui	nd	X	70 mM	500 mM

L'élution de la totalité des protéines par une solution saline (KCl ou NaCl) pour les formes E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG, nécessite une concentration plus basse par rapport à la Ca-ATPase native ( $[\text{KCl}]_{\text{native}}/[\text{KCl}]_{\text{FITC}} \approx 6,5$  et  $[\text{NaCl}]_{\text{native}}/[\text{NaCl}]_{\text{FITC}} \approx 2$ ). Enfin, les interactions entre la résine agarose-Red120 et le dérivé EP stable sont plus fortes, l'élution est induite par une concentration saline supérieure par rapport aux formes E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG ( $1,75 \times [\text{KCl}]$  et  $3,3 \times [\text{NaCl}]$ ). Néanmoins, la libération de la FITC-ATPase dans les trois cas ne fait pas intervenir un mécanisme coopératif ou anti-coopératif ( $n_{\text{Hill}} = 1$ ). Cette observation est en accord avec la mise en jeu d'un seul réactif Red120.

Nous pouvons conclure que l'absorption de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> sur une colonne agarose-Red120 n'est ni réduite ni empêchée par la présence de FITC dans le domaine N. Cependant, les forces d'interaction entre la colonne agarose-Red120 et l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> sont plus faibles lorsque la protéine est modifiée par le FITC. Cette différence d'interaction est liée au nombre de réactif Red120 qui interagit avec l'enzyme native ou modifiée par le FITC. En effet, la sonde fluorescente liée à la Lys515, semble masquer un des sites d'interaction de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> avec le réactif Red120, situé dans le domaine N.

Les domaines extramembranaires contiennent de nombreuses lysines et arginines, qui sont chargés positivement à pH7 et sont donc de bons candidats pour interagir avec les charges négatives (sulfonâtes) du réactif Red120. Ces résidus correspondent par exemple à Arg489, Arg556, Arg560, Lys492 et Lys515 dans le domaine N. Nous avons observé que l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> native est retenue sur

la colonne agarose-Red120 à pH 7. L'alcalinisation de la résine (pH 9) sans ajout de sodium ou de potassium, induit l'éluion du tiers des protéines déposées (résultat non présenté). Cette sensibilité au pH est en accord avec le pKa de certaines lysines et arginines, notamment les Lys492 et Lys515. Les charges négatives du réactif Red120 (sulfonâtes) semblent donc interagir avec des charges positives situées dans le domaine N.



**Figure 60 - La structure développée du réactif Red120 (triazine) –**

Le mécanisme d'éluion par les nucléotides est complexe, il fait intervenir deux molécules pour la protéine native et une ou zéro pour la FITC-ATPase. Ainsi, les effets des nucléotides sont modifiés ou annulés dès que le FITC est présent (changement de  $K_{0,5}$  et de  $n_{Hill}$ ). Nous pouvons en conclure qu'il existe une compétition directe entre ces nucléotides et les réactifs Red120 au niveau du domaine N, Les changements de  $K_{0,5}$  peuvent être interprétés comme des changements d'accessibilité du site de liaison selon les conformations de l'ATPase- $Ca^{2+}$ . Ceci suggère des modifications de structure globale de la protéine avec un réarrangement des domaines, ce qui est en accord avec nos observations faites avec la digestion trypsique. Finalement, malgré les différences observées pour une même conformation entre natif et FITC, cette technique de chromatographie d'affinité nous permet de confirmer qu'il existe des mouvements ou une réorganisation des structures secondaires du domaine N, entre les formes  $E_2H_3TG$  (natif),  $E_2H_3VO_4$  (natif) et EP (FITC).

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## A. Discussion

La compréhension au niveau atomique du mécanisme de transport des ions calcium par l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique, nécessite la caractérisation structurale des différentes conformations mises en évidence par les études fonctionnelles. Si différents cristaux 2D et 3D existent pour les formes non phosphorylées ( $\text{E}_1\text{Ca}_2$ ,  $\text{E}_1\text{Ca}_2\cdot\text{ADP}$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{TG}$ ,  $\text{E}_2\text{H}_3\text{CrATP}$  et  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$ ), nous ne disposons pas jusqu'à ce jour de cristaux d'une forme phosphorylée covalente.

Il a été montré que pour la formation d'un dérivé phosphorylé covalent stable de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (EP), il est nécessaire d'avoir à la fois une protéine marquée au FITC (Lys515) et un gradient transmembranaire de calcium [108]. Il existe actuellement deux façons d'obtenir ce dérivé EP à partir de FITC-ATPase: soit par le phosphate inorganique  $\text{P}_i$  avec de vésicules préchargées en calcium, soit en présence de calcium et en utilisant l'AcP, un pseudosubstrat. Le dérivé EP ainsi obtenu est caractérisé par un bas niveau de fluorescence du FITC, après la chélation du calcium extravésiculaire par de l'EGTA [108]. La formation et la stabilité du dérivé EP ont été mises en évidence à l'aide de phosphate inorganique radioactif [ $^{32}\text{P}$ ]Pi ou d'AcP radiomarqué [ $^{32}\text{P}$ ]AcP. Il a été observé que la présence de thapsigargine, un inhibiteur spécifique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , stabilise le dérivé EP pendant plusieurs jours [121].

### - Le rôle du FITC dans la stabilisation du dérivé EP.

Afin de mieux comprendre le rôle du FITC dans la formation du dérivé EP, nous nous sommes intéressés à une autre sonde fluorescente qui possède le même réactif thiocyanate, le SITS. Nous avons montré que le SITS modifie de façon spécifique et covalente la Lys515 de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ . La SITS-ATPase est toujours capable, en présence d'AcP, de transporter et d'accumuler du calcium dans les vésicules. Comme avec la FITC-ATPase, la formation d'un gradient calcique en présence d'AcP est concomitante à l'accumulation de dérivé phosphorylé. La chélation du calcium extravésiculaire par de l'EGTA ou l'addition de thapsigargine, induit une libération de calcium et surtout une



**déphosphorylation** de la SITS-ATPase. Ainsi, aucun dérivé EP covalent stable ne peut être obtenu à partir de SITS-ATPase, dans les conditions qui le permettent à partir de FITC-ATPase. Pourtant ces deux sondes fluorescentes réagissent avec la même lysine, la formation d'un dérivé EP stable n'est donc pas due à une simple modification par un agent chimique du domaine N, qui diminuerait la vitesse de déphosphorylation de l'ATPase. Le FITC joue un rôle important dans la stabilisation du dérivé EP. Cette stabilisation est probablement due aux interactions entre certains résidus (chaînes latérales et/ou squelette peptide) situé dans les domaines N et/ou P et le FITC. Ces interactions, qui doivent être de type électrostatique ou de Van der Waal, ne peuvent pas exister ou sont trop faibles lorsque la Lys515 est modifiée par le SITS. Ainsi, la chélation du calcium extravésiculaire après la charge active des vésicules, doit provoquer un mouvement des hélices transmembranaires, qui est répercuté vers les domaines cytoplasmiques et induire soit une déphosphorylation lorsque les interactions entre les domaines cytoplasmiques sont faibles, c'est le cas de l'ATPase native et de la SITS-ATPase, soit un blocage complet de la protéine lorsque les interactions entre les domaines cytoplasmiques sont renforcées, c'est le cas de la FITC-ATPase.

Les propriétés spectrales du FITC confirment l'existence d'interactions entre la sonde et la protéine, au moment de la réorganisation du domaine cytosolique après la phosphorylation et la chélation du calcium (formation du dérivé EP stable). En effet, l'absorption, et donc la fluorescence, d'un chromophore aromatique est sensible à la polarité du milieu, la proximité de groupes chargés et la mise en place de liaisons hydrogènes auxquelles il peut participer en tant que donneur ou accepteur. L'établissement de ce type d'interaction non covalente, entraîne une modification des états fondamentaux et excités du chromophore. Ces modifications induisent des variations d'énergie et de longueur d'onde du maximum d'absorption. L'intensité de fluorescence du FITC à 517 nm varie en fonction du pH, donc en fonction son état de protonation (cf. matériels et méthodes). Par conséquent, la fluorescence exceptionnellement basse du dérivé EP peut être due à un changement de l'état de protonation du FITC, qui se traduit par la mise en place de liaisons hydrogènes entre la sonde et l'enzyme. L'intensité de fluorescence du FITC à 517 nm en milieu apolaire tel que le DMF, est quasi nulle car il n'absorbe plus (cf. matériel et méthode). Les variations de l'intensité de fluorescence peuvent être aussi associée à un changement de polarité de l'environnement proche du FITC, suite à la chasse de molécules d'eau du domaine N au moment de la réorganisation des domaines

cytoplasmiques. L'expulsion de molécules d'eau doit entraîner la perte de liaisons hydrogènes de type ATPase/solvant et/ou FITC/solvant. Le retour à un bilan énergétique équilibré nécessite de reformer les liaisons hydrogènes perdues et ceci entre le FITC et l'ATPase-Ca<sup>2+</sup>. Dans les deux cas, le FITC situé profondément dans le site de liaison du nucléotide (domaine N), interagit avec la Ca-ATPase induisant une stabilisation exceptionnelle du dérivé EP.

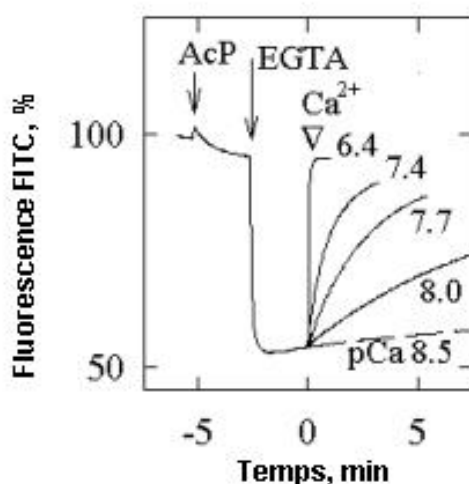
L'intensité de fluorescence du SITS ne varie pas en fonction du pH. Par contre, la position, l'intensité et la forme des spectres d'excitation et d'émission du SITS, diffèrent lorsque la polarité du solvant change (cf. matériels et méthodes). Ainsi, l'exaltation de fluorescence, qui traduit l'accumulation de calcium concomitant à l'accumulation de dérivé phosphorylé, est due uniquement à un changement de polarité de l'environnement proche du SITS. Comme les propriétés de fluorescence du SITS sont inversées par rapport à celles du FITC, nous pouvons supposer que la chute de l'intensité de fluorescence du FITC corresponde au même type de changement d'environnement. Par contre, nous ne pouvons rien conclure sur la chute de l'intensité de fluorescence du FITC (>50 %) au moment de la chélation du calcium extravésiculaire. Nous ne disposons pas d'équivalent avec la SITS-ATPase, c'est à dire une augmentation de l'intensité de fluorescence du SITS au moment de la chélation du calcium extravésiculaire, qui correspondrait à la formation du dérivé EP stable.

Afin de comprendre comment le FITC stabilise le dérivé EP, il serait donc indispensable de déterminer l'orientation et donc les interactions de la sonde avec les résidus (liaison hydrogène, force de Van der Waals) selon la conformation de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> (E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG, E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et EP). Pour cela, il faudrait réaliser une étude par simulation qui permettrait de placer correctement le FITC, c'est le docking moléculaire. Les programmes de docking moléculaire reposent sur l'exploration systématique de l'espace des configurations pour générer et évaluer un grand nombre de liaisons potentielles.

### - La caractérisation du dérivé EP stable.

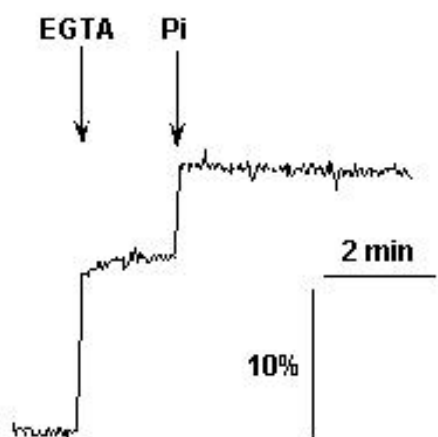
Il est généralement admis que le cycle catalytique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  comporte quatre formes majoritaires (Schéma 3). Dans ce schéma, la présence ou l'absence de calcium dans les sites de transport de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  non phosphorylée, agit comme un interrupteur qui permet au site catalytique de l'ATPase de devenir réactif à l'ATP ( $\text{E}_1\text{Ca}_2$ ) ou au phosphate inorganique ( $\text{E}_2\text{H}_3$ ). De même, l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  phosphorylée effectue une transconformation entre les formes  $\text{E}_1\text{Ca}_2\text{P}$  et  $\text{E}_2\text{H}_3\text{P}$  au moment de la dissociation du calcium du côté luminal. Dans ce modèle  $\text{E}_1/\text{E}_2$ , la forme  $\text{E}_1$  est définie comme exposant les sites hautes affinités pour le calcium du côté cytoplasmique, la forme  $\text{E}_2$  est définie comme exposant les sites basses affinités du côté luminal. Cette "règle" est valable en présence d'ATP ou du pseudosubstrat AcP, les deux cycles catalytiques étant identiques [122].

Champeil et ses collaborateurs [108] ont montré que le dérivé EP (non stabilisé par la thapsigargine) est instable au cours du temps en présence de 3 nM de calcium libre (Figure 4,  $\text{pCa} = 8,5$ ). En présence de 400 nM de calcium libre (Figure 61,  $\text{pCa} = 6,4$ ), la FITC-ATPase reprend son cycle catalytique tant qu'il y a de l'AcP. La sensibilité au calcium de cet intermédiaire catalytique inhabituel ( $\text{pCa} \geq 8$ ), non stabilisé par la thapsigargine, indique que le calcium interagit directement avec le dérivé EP et donc que les **sites hautes affinités** pour le calcium, dont l'entrée se trouve du côté cytoplasmique, sont **accessibles**. De ce fait, le dérivé EP ne correspond pas à la forme  $\text{E}_2\text{H}_3\text{P}$ . De plus, l'intensité du signal de fluorescence des deux espèces est très différente (Figure 62). Le dérivé EP ne correspond pas non plus à la forme  $\text{E}_2\text{H}_3\text{VO}_4$ , considéré comme un  $\text{E}_2\text{P}$  non covalent [128]. Les expériences de digestion trypsique (cf. E.1) et de chromatographie d'affinité sur colonne Red120 (cf. E.2) le démontrent.



**Figure 61 - La sensibilité au calcium du dérivé à bas niveau de fluorescence** – Le dérivé à bas niveau de fluorescence est formé en présence d'AcP, de 15  $\mu\text{M}$  calcium puis par addition de 2 mM EGTA. La concentration final en  $\text{Ca}^{2+}$  libre est de 3 nM ( $\text{pCa} 8,5$ ). Au temps zéro, du calcium a été ajouté augmentant ainsi le  $\text{pCa}$  comme indiqué sur la figure tirée de Champeil et al., 2001 [108].

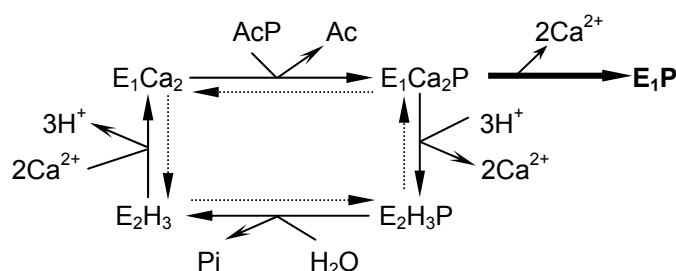
L'obtention du dérivé EP à partir de phosphate inorganique, dépend de la présence d'un gradient calcique formé par l'addition d'EGTA sur des vésicules passivement préchargées en calcium (cf. A.1.2b). Les sites basses affinités pour le calcium du dérivé EP peuvent contenir un ou deux ions calcium. Champeil et ses collaborateurs ont montré qu'après l'addition d'EGTA, de phosphate inorganique puis d'ionophore sur des vésicules passivement préchargées en  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , un taux inférieur à 0,2 nmol de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  lié par mg protéine a été observé. Sachant qu'il y a environ 10-12 nmoles de calcium par mg de protéine. Ces études démontrent que le dérivé EP ne contient pas d'ions calcium occlu et suggèrent que les **sites basses affinités** pour le calcium, situés du côté luminal, ne sont **pas occupés** [108]. En conséquence, le dérivé EP ne correspond pas à la forme  $\text{E}_1\text{Ca}_2\text{P}$ .



**Figure 62 - La formation de  $\text{E}_2\text{H}_3\text{P}$  à partir de FITC-ATPase en suivant la fluorescence du FITC** – La cuvette contient un tampon 50 mM MOPS-Tris (pH 7, 20°C), 0,1 M KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  et des vésicules de RS (1 mg/ml FITC-ATPase). La forme  $\text{E}_2\text{H}_3\text{P}$  est obtenue après l'addition de 5 mM EGTA et 10 mM Pi.

Les caractéristiques du dérivé EP ne sont pas en accord avec celles décrites pour un phosphoenzyme dont la formation dépend d'un gradient calcique [125]. En effet, l'apparition de ce type de phosphoenzyme est associée à la réorientation des sites de fixation du calcium du côté luminal et à l'occlusion des ions calcium [125]. Il semble donc correspondre à une forme  $\text{E}_1\text{P}$  non conventionnelle dans le cycle catalytique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (Schéma 5).

**Schéma 5** : Le cycle catalytique du transport du calcium par la FITC-ATPase en présence d'AcP.



Néanmoins, nous avons cristallisé le dérivé EP stabilisé par la thapsigargine (cf. C.3.2). Les premières études enzymatiques ont suggéré que la thapsigargine interagit et stabilise uniquement la forme  $E_2H_3$  [126]. Plus tard, il a été démontré que la thapsigargine peut réagir avec les formes  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3P$  [127]. Nous avons montré que la thapsigargine provoque une déphosphorylation de la forme  $E_1Ca_2P$  pour la FITC-ATPase et la SITS-ATPase. Par contre, elle interagit et stabilise pendant plusieurs jours la FITC-ATPase sous la forme EP. La mutagenèse dirigée et la structure atomique de  $E_2H_3TG$ , indiquent que la thapsigargine se loge entre les hélices M3, M5 et M7 [103, 130]. Cet inhibiteur des SERCA1 semble rigidifier le domaine transmembranaire, empêchant tout changement de conformation induit par la fixation de calcium et donc réduit considérablement la vitesse de déphosphorylation du dérivé EP.

Il existe deux voies de déphosphorylation dans le cycle catalytique de l'ATPase- $Ca^{2+}$ . La forme  $E_1Ca_2P$  peut être déphosphorylée en donnant son phosphate à un accepteur comme l'ADP ( $E_1Ca_2P \rightarrow E_1Ca_2$ ) ou en effectuant une transconformation  $E_1Ca_2P \rightarrow E_2H_3P$ , puis l'hydrolyse de  $E_2H_3P$  libérant le phosphate inorganique dans le cytosol. La transconformation  $E_1Ca_2P \rightarrow E_2H_3P$  est l'étape limitante de la déphosphorylation de  $E_1Ca_2P \rightarrow E_2H_3$ . La stabilisation accrue du dérivé EP en présence de FITC et de thapsigargine peut être liée à l'inhibition de la transconformation  $E_1 \rightarrow E_2$ .

Le mécanisme qui permet à la thapsigargine de rendre insensible au calcium cytosolique le dérivé EP, reste à être élucidé. Nous pouvons supposer que (i) la thapsigargine empêche indirectement le calcium de se fixer sur la protéine, par une réorientation complète ou partielle des sites hautes affinités, (ii) la thapsigargine limite les changements de conformation après la fixation du calcium, ce dernier ne pouvant pas être occlu. Dans les deux cas, le dérivé EP avec ou sans thapsigargine peut avoir une structure légèrement différente.

#### **- Que nous apporte la structure 3D du dérivé EP.**

Une alternative à la diffraction des rayons X et à la spectroscopie RMN, c'est la formation de cristaux 2D et leur étude par microscopie électronique. Généralement, les cristaux 2D sont obtenus à partir de protéine solubilisée et en utilisant la stratégie soit des films lipidiques fonctionnalisés

(monocouche lipidique étalée à l'interface air eau), soit l'élimination du détergent (dialyse ou absorption sur des Bio Beads). Nous avons obtenu, de façon reproductible, des cristaux 2D de la forme  $E_2H_3VO_4$  et surtout du dérivé EP à partir de **vésicules de réticulum sarcoplasmique natives**. La Ca-ATPase est donc toujours insérée dans sa membrane biologique naturelle. Ainsi, un cristal 2D de type vésiculaire a été obtenu et observé par microscopie électronique en coloration négative. Cependant, ces cristaux sont de trop petite taille pour permettre une analyse d'image. L'optimisation des conditions de cristallogénèse, par le développement d'une stratégie de fusion des vésicules cristallines, nous a permis d'obtenir des vésicules plus grosses et surtout des plaques à partir desquelles poussent des cristaux de type tubulaire. Après un traitement d'images à partir de clichés de cryomicroscopie électronique, nous avons obtenu la première **structure 3D d'un dérivé phosphorylé covalent d'une ATPase de type P à 8 Å de résolution**. Afin de caractériser cette première structure d'un dérivé phosphorylé covalent, nous l'avons comparé aux structures existantes de la Ca-ATPase. Pour cela, nous avons utilisé le programme URO [133] qui permet la superposition des structures 3D disponibles avec celle du dérivé EP.

Les mouvements les plus importants entre les formes  $E_1Ca_2$  et EP sont ceux des domaines N et A qui basculent vers le domaine P. Ce repliement des domaines extramembranaires a déjà été décrit entre  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$  [103]. Nous n'observons pas de mouvement d'une telle amplitude entre EP et  $E_2H_3TG$  ou  $E_2H_3VO_4$ , la Ca-ATPase garde sa conformation "fermée". Cependant, nous observons certaines modifications, notamment au niveau du **positionnement du domaine A**, qui est lié aux mouvements des trois premières boucles cytoplasmiques (A/Nter et M1 – M3). Ces boucles seraient impliquées dans l'accessibilité des sites hautes affinités pour le calcium, avec les groupements carboxyles de Glu58 (M1) et Glu309 (M2) qui formeraient l'entrée [129]. Un mouvement important de ces boucles a déjà été décrit entre les deux structures atomiques  $E_1Ca_2$  et  $E_2H_3TG$ . Il est directement lié au déplacement vers le lumen de M3, au changement d'inclinaison de M2 et M3, au mouvement particulier de M1 dont la partie amino-terminale se couche parallèlement au plan de la membrane [103 – 129]. Ces déplacements sont vraisemblablement moins importants entre les trois conformations "fermées" de la Ca-ATPase. Cependant, ils traduisent une accessibilité différente des sites hautes affinité pour le calcium, lié à la position du domaine A mais aussi à la **phosphorylation covalente de EP**. En effet, M3 interagit directement par des liaisons hydrogène avec le domaine P, qui bascule de

30° vers la membrane, suite à l'inclinaison de l'hélice transmembranaire M5 entre les formes E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG [103]. Le mouvement de M3 est donc influencé par celui du domaine P [129]. De plus, il est décrit que le mouvement du domaine P induirait aussi celui de M1 et M2, sans qu'il n'existe d'interactions directes entre ces hélices et le domaine P [103]. Le mouvement observé dans notre comparaison peut être aussi dû à une orientation différente du domaine P, suite à la phosphorylation covalente de EP. Il est décrit que les structures des domaines N et P ne changent pas entre E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG (r.m.s 0,63 - 0,75 Å), seul un mouvement des domaines entiers a été observé [103]. Nous pouvons supposer que l'organisation des structures secondaires du domaine P, soient modifiées entre une protéine phosphorylée et non-phosphorylée et pourrait aussi expliquer les différences observées entre toutes les structures. Ce lien entre l'accessibilité/orientation des sites de haute affinité pour le calcium et la phosphorylation covalente de l'enzyme, est confirmé par la différence relevée entre toutes les structures au niveau de la boucle M6-M7. En effet, il est décrit que le mouvement de la boucle M6-M7 est lié à l'accessibilité/orientation des sites de haute affinité pour le calcium et au mouvement de P [136]. Cette boucle, composée de 28 résidus, interagit *via* des liaisons hydrogènes avec d'autres segments de la protéine dont notamment la boucle M8-M9 et les hélices  $\alpha$  du domaine P. La présence de six prolines dont quatre réunies par paire, joue également un rôle important dans la structuration de cette boucle, en limitant les angles de torsion du squelette peptidique [102]. La différence observée dans cette zone peut, comme les précédentes, révéler une accessibilité différente des sites de haute affinité pour le calcium entre les deux structures, ainsi que la présence d'un phosphate lié de façon covalente à l'Asp351.

Les expériences de trypsinisation et de chromatographie sur une colonne agarose-Red120, nous démontrent qu'il existe bien des différences de positionnement des domaines extramembranaires et notamment du domaine A. Ainsi, la détermination de la structure du dérivé EP suggère (i) l'implication des trois premières boucles cytoplasmiques dans l'accessibilité des sites hautes affinité pour le calcium. (ii) Le rôle de la boucle M6-M7 comme transducteur de signal entre le site de phosphorylation et les sites hautes affinités pour le calcium. (iii) Le positionnement du domaine A ne dépend pas uniquement de la présence ou de l'absence de calcium, mais aussi de la formation et de l'hydrolyse de l'aspartyl-phosphoryl-enzyme.

Cependant, les changements de conformation révélés par l'ensemble des structures 3D de la Ca-ATPase, ne permet pas d'expliquer certains aspects de son mécanisme enzymatique. Ainsi, l'ATP peut se lier à l'enzyme en présence ou en absence de calcium [138]. Par contre, la forme  $E_2$  n'est pas phosphorylable par l'ATP. Pourtant, même pour les formes  $E_2H_3TG$ ,  $E_2H_3VO_4$  et EP qui présentent un aspect compact, le phosphate terminal de l'ATP est trop loin de l'Asp351 pour produire la phosphorylation, ce qui pourrait expliquer pourquoi la fixation de l'ATP sur  $E_2$  ne suffit pas pour induire la phosphorylation. La phosphorylation de l'Asp351 doit nécessiter une inclinaison plus importante du domaine N, qui n'a pas encore été révélée par une structure ou des calculs de dynamiques moléculaire. Ce basculement accentué du domaine N sur le domaine P, doit être possible avec une réorientation du domaine A. En effet, le domaine A semble gêner et donc limiter le basculement du domaine N sur le domaine P dans toutes les structures 3D des formes "fermées". Cette conformation hypothétique doit correspondre à une forme transitoire de l'ATPase- $Ca^{2+}$ , qui n'a pas encore été stabilisée. Après la publication de la structure 3D de  $E_1Ca_2$ , Green et McLennan ont suggéré que la phosphorylation de l'ATPase- $Ca^{2+}$  provoque le rapprochement des domaines extramembranaires, l'enzyme adopterait à ce moment là, une structure encore plus compacte que celle de la forme  $E_2H_3VO_4$  [140]. Nos résultats rendent compte de la "fermeture" de l'ATPase- $Ca^{2+}$  au moment de sa phosphorylation. Par contre, ils ne permettent pas d'observer un aspect plus compact de l'enzyme, qui doit correspondre à une forme transitoire de l'ATPase- $Ca^{2+}$ . Enfin, aucune structure ne semble posséder de sites de basse affinité accessible du côté luminal. Toyoshima et ses collaborateurs suggèrent que ses sites de basse affinité soient accessibles pendant la transconformation  $E_1Ca_2P \rightarrow E_2H_3P$ , au moment de la libération du calcium et de l'échange avec les contre ions (protons). Néanmoins, l'accessibilité de ces sites de basse affinité n'est pas révélée par la structure de EP. Comme pour le basculement extrême du domaine N qui permettrait la phosphorylation, l'accessibilité des sites de basse affinité doit correspondre à une forme transitoire de l'ATPase- $Ca^{2+}$  encore non stabilisée.

Finalement, cette forme EP est aussi intéressante comme exemple de la flexibilité conformationnelle de la Ca-ATPase. Elle ne doit vraisemblablement pas appartenir au cycle catalytique standard de la Ca-ATPase, mais elle doit être formée lorsque le réticulum sarcoplasmique



a été chargé activement en calcium et que la concentration en calcium cytosolique est très basse [108].

## B. Perspectives

### - La détermination d'une structure atomique du dérivé EP.

Pour comparer les structures de façon plus rigoureuse, il est nécessaire d'avoir la structure atomique des formes EP. Un premier modèle atomique de  $E_2H_3VO_4$  a été construit en adaptant les coordonnées atomiques de  $E_1Ca_2$  aux densités électroniques [95]. Les trois domaines cytoplasmiques (N : nucléotide, A : actuator et P : phosphorylation) ont été ajustés individuellement en tant que corps rigides et une minimisation d'énergie sur l'ensemble de la structure a été ensuite effectuée. Un second modèle a été obtenu en affinant ces déplacements d'une part avec une structure de microscopie électronique de meilleure résolution et d'autre part en y incluant des modifications des hélices qui composent le domaine transmembranaire. Celles-ci ont été pliées et déplacées pour s'ajuster à la densité correspondante [95]. Dans ce cas aussi, l'assemblage final a été obtenu après une minimisation d'énergie des différents morceaux rassemblés.

Pour la détermination de la structure atomique du dérivé EP, nous voulons développer et utiliser une autre technique que le déplacement de corps rigides. Cette nouvelle approche s'appuie sur la dynamique vibrationnelle (modes normaux). L'analyse des modes normaux d'une structure consiste à décomposer la dynamique vibrationnelle de l'ATPase- $Ca^{2+}$ , en une série de modes de mouvement de fréquences différentes. Brièvement, nous pouvons dire que les modes les plus lents sont ceux qui décrivent les mouvements de grandes amplitudes (domaines entiers), alors que les modes rapides correspondent à des mouvements de plus faible amplitude (acides aminés) [139]. De ce fait, le résultat des calculs de modes normaux rapides nous renseignera sur les amplitudes, les directions des mouvements des différents acides aminés qui constituent l'ATPase- $Ca^{2+}$ , ainsi que les zones charnières qui permettent ces mouvements. Ainsi, pour un ajustement probablement plus réaliste d'une structure atomique dans les densités électroniques de EP, des déplacements et des rotations des carbones asymétriques du squelette peptidique seront obtenus par une combinaison de modes normaux appliqués à cette structure atomique. Dans ce cas la molécule est traitée comme un

ensemble et non comme un assemblage. Cette méthode implique l'application itérative de combinaisons de modes normaux jusqu'à l'obtention d'un ajustement optimal.

#### **- Dynamique moléculaire.**

Afin de comprendre par quel mécanisme moléculaire l'hydrolyse de l'ATP est couplée au transport du calcium, il est nécessaire de décrire le mouvement de la molécule au cours du temps. Idéalement, l'étude du comportement dynamique de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> doit prendre en compte toutes les structures atomiques de la protéine et être réalisée dans une bicouche lipidique. Cependant, le système (ATPase + membrane) comporte énormément d'atomes et la simulation, à l'heure actuelle, ne pourra pas dépasser, au mieux, la dizaine de nanosecondes. Hors, un cycle complet de transport de calcium couplé à l'hydrolyse d'ATP nécessite une dizaine de millisecondes. Il existe une autre approche plus simple et moins coûteuse en temps machine, l'analyse des modes normaux sur l'ensemble des structures atomiques disponibles. Ainsi, l'étude des modes mis en jeu entre les différentes conformations permettra de décrire les mouvements de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> au cours de son cycle catalytique. Des premiers résultats ont été obtenus au laboratoire sur les deux structures atomiques E<sub>1</sub>Ca<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>H<sub>3</sub>TG, ils fournissent des informations particulièrement intéressantes sur les résidus importants impliqués dans le mécanisme de transport [151]. Récemment, une autre approche des modes normaux a été décrite sur des structures obtenues par cryomicroscopie électronique. Elle permet de prédire les déformations d'une protéine directement à partir des données structurales à basse résolution [152].