



HAL
open science

Conséquences de l'échange de domaines évolutivement éloignés sur l'activité et la géométrie de la NADPH-cytochrome P450 réductase.

Aigrain Louise

► **To cite this version:**

Aigrain Louise. Conséquences de l'échange de domaines évolutivement éloignés sur l'activité et la géométrie de la NADPH-cytochrome P450 réductase.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT : . tel-00529217

HAL Id: tel-00529217

<https://theses.hal.science/tel-00529217>

Submitted on 25 Oct 2010

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THERAPEUTIQUE : DU FONDAMENTALE A L'APPLIQUE

POLE : INGENIERIE DES PROTEINES

ANNEE 2010

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'Université PARIS-SUD 11

par Melle Louise AIGRAIN

CONSEQUENCES DE L'ECHANGE DE DOMAINES EVOLUTIVEMENT
ELOIGNES SUR L'ACTIVITE ET LA GEOMETRIE
DE LA NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE

soutenue le 13 octobre 2010

COMPOSITION DU JURY :

Rapporteurs :

Dr. René FEYEREISEN
Dr. Marten VOS

Examineurs :

Pr. Herman VAN TILBEURGH
Pr. Bruno GUIGLIARELLI
Dr. Solange MORERA

Directeur de thèse :

Dr. Gilles TRUAN

à Geo et Michel.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci à mes rapporteurs, les Drs René Feyereisen et Marten Vos, qui ont donné de leur temps pour juger ce manuscrit. Sachant l'intérêt que le Dr. Feyereisen porte à la CPR, son avis sur ces recherches m'est d'une grande valeur. Merci également à Bruno Guigliarelli d'avoir apporté un regard supplémentaire en examinant ce travail, ainsi qu'à Herman van Tilbeurgh et Solange Moréra dont les points de vue de cristallographes étaient indispensables.

Parmi la foule de personnes qui m'a permis de réaliser ce doctorat tout en apprenant, découvrant et souriant durant trois années, je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Gilles Truan. Comme si la vie ne m'avait pas déjà assez gâtée, il a fallu que je tombe sur ce Chef pédagogue et motivant qui a accepté de combler mes lacunes en biologie, finissant même par me convaincre de la beauté d'une protéine (colorée !) joliment déposée sur une colonne !... Mes années de doctorat rimeront toujours avec des expériences sur un air de jazz, des discussions culinaires tout aussi cruciales que les manip qu'elles venaient interrompre, et une attention qui me font souhaiter de tout mon cœur que cette fin de thèse ne m'éloigne pas définitivement de la smala Truan.

Je suis particulièrement reconnaissante envers Denis Pompon qui m'a accueilli dans son laboratoire dès mon master d'une façon telle que je ne pouvais que souhaiter y rester en thèse. Merci Denis pour votre disponibilité, pour vos minimum de 10 réponses (dont 1 ou 2 réalisables...) pour chacune de mes questions posées, et surtout pour votre savoir-faire manuel et vos connaissances théoriques en électrochimie sans qui les données de potentiométrie n'auraient jamais été ni mesurées ni analysées.

Une visite opportune du LEBS est à l'origine de notre collaboration si fructueuse, mais surtout si sympathique avec toi Solange, qui m'a fait découvrir les gouttes retournées, la cryoprotection et les cabanes de Soleil ! Merci à nouveau pour ta cordialité, tes conseils et coups de pouce.

Viennent ensuite tous mes collègues qui, sans avoir directement participé à ce travail de thèse, m'ont aidée quotidiennement grâce à leurs conseils pratiques mais surtout grâce à leur bonne humeur qui rend le travail au 23b si chouette.

Je pense en premier lieu à Laetitia qui a fait régner dans notre bureau une atmosphère bouclement folle de papotage sérieux entre raisonnement culturel et ouverture scientifique !

Mon arrivée au laboratoire s'est fait tout en douceur grâce à Benoit qui m'a patiemment indiqué tout ce qu'on ne sait pas quand on débarque ! Merci pour ton accueil et ton aide dont je n'ai mesuré la valeur que bien plus tard.

Un deuxième soleil est entré dans le laboratoire avec l'arrivée de Florence dont les rayons bercent aujourd'hui un joli Mathias. Merci Flo pour ton amitié et ta force joyeuse qui aide tant à relativiser.

La plus grande pipelette du bâtiment s'est dernièrement exilée sur une île, mais je remercie depuis la métropole notre Pedro tant regretté pour ses fous rires mémorables, sa franchise et surtout ses talents de pâtissier !

Merci Aude pour tes conseils et nos discussions, professionnelles ou non, mais toujours enrichissantes. Après le jazz de Gilles, ton rire au bonheur contagieux sera définitivement LE souvenir sonore de ma thèse !

Merci à Fataneh d'avoir apporté ses parfums de rose et de pistache dans ce franchouillard de laboratoire.

Merci à Jacquotte d'être Jacquotte avec tout l'enthousiasme et la fantaisie que cela implique !

Merci enfin à tous ceux qui ont peuplé ma vie professionnelle et qui, sans pour autant m'être proches, ont participé à mon plaisir d'aller travailler pendant 3 ans ; je pense à Philippe U., à Muriel, à Pascale&Mathieu (ce nom qui ne fait qu'un cache bien sûr aussi celui de Mahoney !), à Sandrine, à Damjana&Cube, à Bruno, à Ewen, à Philipp M, à Christina, à Nathalie....

Une dédicace toute spéciale à Mireille et à Aude, mes reliseuses, qui m'ont offert pour quelques heures leur regard vif et perçant, à l'affût de la moindre faute, alors que la réductase ou même la biochimie ne constituent pas *a priori* (sans accent sur le « a ») leurs centres d'intérêt principaux !

Le soutien de nombreuses personnes extérieures au laboratoire a également énormément compté dans mon envie et mon plaisir de découvrir le métier de chercheur. Je remercie ma famille pour cette liberté protectrice qu'elle m'a toujours offerte et pour les Mensch exemplaires qui la composent. Je remercie Marie qui prouve chaque jour que la blondeur et le savoir-vivre n'ont rien de contradictoire avec le génie (ou sinon j'ai la chance d'avoir dégotté l'exception qui confirme la règle !?!). Enfin, mais sûrement pas pour finir (!), je remercie JoJo, mais n'en dirai pas plus, car ce que je lui dois ne saurait tenir en quelques mots, si tant est que je les trouve...

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1. Les protéines multidomaines	3
1.1. Prépondérance des protéines multidomaines	3
1.2. La définition d'un « domaine protéique ».....	5
1.3. Les domaines de connexion	6
1.4. Intérêt et difficultés de l'étude des protéines multidomaines	8
2. Modularité des systèmes de transport d'électrons aux cytochromes P450.....	15
2.1. Les différents composants.....	15
3. Diversité et modularité des systèmes P450	23
3.1. Le recensement et la classification des systèmes	24
3.2. Les interactions entre les composants des systèmes P450.....	25
3.3. Les fusions dans les systèmes P450	32
4. La NADPH-cytochrome P450 réductase (CPR)	35
4.1. Découverte de la CPR	35
4.2. La CPR, produit de la fusion de gènes ancestraux.....	36
4.4. Le domaine de connexion	46
4.5. Les protéines multidomaines analogues.....	49
5. Présentation du sujet de thèse : La construction de chimère, une approche rationnelle pour l'étude de protéines multidomaines	55
5.1. Le domaine comme unité de construction	55
5.2. La chimérogénèse des systèmes P450	57
5.3. Construction de CPR chimères	59
MATERIELS ET METHODES	61
1. Matériel.....	63
1.1. Souches.....	63
1.2. Plasmides.....	63
2. Méthode.....	64
2.1. Construction de biologie moléculaire	64
2.2. Expression et purification.....	73
2.3. Cinétique stationnaire suivie par spectroscopie d'absorption.....	76
2.4. Déplétion du cofacteur FMN	77
2.5. Analyses d'HPLC-MS	77
2.6. Stopped-Flow.....	78

2.7.	Analyses par spectrométrie de masse.....	78
2.8.	Titration des CPR en anaérobie.....	78
2.9.	Dénaturations thermique et chimique suivies par fluorimétrie	79
2.10.	Mesure des potentiels d'oxydoréduction des CPR par spectroélectrochimie	79
2.11.	Cristallographie.....	80
3.	Analyse	82
3.1.	Logiciel d'analyse des données de potentiométrie : Electrofilter.....	82
RESULTATS.....		85
1.	Construction de CPR chimère.....	87
1.1.	La définition des domaines et des points de jonction.....	87
2.	Expression et purification des CPR.....	91
2.1.	Les CPR solubles	91
2.2.	Les CPR membranaires	92
3.	Analyse biochimique	94
3.1.	Activités des CPR chimères - Comparaisons avec les CPR parentales.....	94
3.2.	Titration des CPR.....	106
3.3.	Etudes de cinétique rapide.....	109
3.4.	Potentiométrie par spectroélectrochimie.....	113
3.5.	Dénaturations des CPR	120
3.6.	Purification distinctes des domaines FMN et FAD, et ligation protéique <i>in vitro</i> via des intéines	124
4.	Analyse structurale.....	126
4.1.	Cristallogénèse CPR chimères solubles	126
4.2.	Collecte des données et attribution structurale	127
4.3.	La forme ouverte de la CPR	128
DISCUSSION.....		137
1.	Propriétés cinétiques et thermodynamiques des CPR chimères	139
1.1.	Reconnaissance et intégrité des domaines	139
1.2.	Interprétation des résultats de potentiométrie.....	141
2.2.	Les interactions aux interfaces entre les domaines de la CPR	144
3.	Caractère dynamique de la CPR et des diflavines réductases en général.....	149
3.1.	Origine et contrôle des mouvements de domaines au sein de la CPR.....	149
3.2.	YHs, la première structure ouverte d'une diflavine réductase	151
4.	Interfaces, linker, et domaine de connexion.....	153
5.	Perspectives.....	155

ANNEXES	159
1. Classement des systèmes de transport d'électrons au P450.....	161
2. Résidus impliqués dans la reconnaissance entre le P450 et ses partenaires rédox	165
BIBLIOGRAPHIE.....	169

Abréviations

ABC	ATP binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adenosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléotide
ATP	Adenosine triphosphate
CBD	Chitin binding domain
CPR	NADPH-cytochrome P450 réductase
CT	Charge transfer species
ECD	Etape cinétiquement déterminante
eNOS	NO-synthase endothéliale
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FdxR	Ferrédoxine réductase
Fdx	Ferrédoxine
FRET	Résonance Förster par transfert d'énergie
GFP	Green Fluorescent Protein
GSH	Glutathionne
Hm	CPR humaine membranaire
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
Hq	Hydroquinone
Hs	CPR humaine soluble
HYm	CPR chimérique humaine-levure membranaire
HYs	CPR chimérique humaine-levure soluble
iNOS	NO-synthase inductible
IPL	<i>In vitro</i> protein ligation
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MCS	Multi-cloning site
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MSR	Méthionine synthase réductase
MS	Spectrométrie de masse
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NOS	Oxyde nitrique synthase
nNOS	NO-synthase neuronale
ORF	Phase ouverte de lecture
Ox	Oxydé
P450	Cytochrome P450
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PEG	Polyéthylèneglycol
PGK	3-phosphoglycerate kinase
Red	Réduit
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	Root mean square deviation
ROS	Reactive oxygen species
RPE	Résonance paramagnétique électronique
Rs	CPR de rat soluble
RX	Rayons X
SAXS	Small angle X-ray scattering

SiR	Sulfite réductase
Sm-FRET	Single molecule FRET
Sq	Semiquinone
TE	Transfert d'électrons
T _m	Température de fusion
TOF	Time-of-flight
TROSY	Transverse relaxation-optimized spectroscopy
UV	Rayons ultraviolets
Y _m	CPR de levure membranaire
Y _s	CPR de levure soluble
YH _m	CPR chimérique levure-humaine membranaire
YH _s	CPR chimérique levure-humaine soluble

INTRODUCTION

*In some lost place I had to find,
Follow me the wise man said,
But he walked behind.*

*« Teachers »
Leonard Cohen*

1. Les protéines multidomaines

1.1. Prépondérance des protéines multidomaines

Depuis les années 1970 et les tout premiers séquençages de génomes de virus, le nombre d'organismes dont la totalité du génome a été séquencée se compte par centaines et ne cesse d'augmenter, allant de la bactérie à l'humain. Ce flot d'informations a imposé un changement de notre approche scientifique et ce dans tous les domaines de la biologie. Alors que la majorité des recherches se concentrait sur l'analyse isolée de gènes ou de protéines impliquées dans des processus biologiques distincts, il est devenu possible d'étudier comment ces gènes et les protéines pour lesquelles ils encodent, coopèrent et interagissent pour générer les structures et les procédés complexes soutenant la vie au sein d'une cellule ou d'un organisme (Janin and Wodak, 2002).

Pour cela, l'information contenue dans la séquence d'un génome doit d'abord être traduite en termes de fonction biologique. Il apparaît alors que seul un nombre restreint de gènes est nécessaire au fonctionnement biologique d'un organisme. Ce phénomène est particulièrement remarquable chez les organismes évolués ; le génome humain ne contient que 30.000 à 40.000 gènes codants, seulement 30 % de plus que celui du ver *C. elegans*, et dix fois plus que ceux d'organismes unicellulaires comme *E. coli*. ou *Bacillus subtilis*.

La complexité d'un organisme n'est pas directement reliée aux nombres de ses gènes codants pour des protéines, mais plutôt à la multiplication des interactions existantes entre ces protéines ou les domaines qui les composent (Itzhaki et al., 2006; Ivanic et al., 2008; Schuster-Bockler and Bateman, 2007). Non seulement l'homme présente le plus grand nombre d'interactions protéine-protéine recensées, mais 60 % des protéines ou domaines protéiques humains interagissent avec plus de 20 autres partenaires et 30 % avec plus de 50. En comparaison, seules 30 % des protéines de levure et moins de 5 % des protéines de *E. coli* entrent en interaction avec plus de 20 autres protéines. La diversité et la flexibilité de ces interactions seraient alors à l'origine de l'immense variété des fonctions biologiques au sein d'une cellule et la complexité du réseau d'interactions entre ces protéines reflèterait bien mieux le caractère évolué ou primaire d'un organisme que la quantité même de ses gènes codants.

De la même façon qu'un grand nombre de fonctions biologiques peuvent être codées par seulement quelques gènes, la plupart des protéines, aussi diverses soient leurs fonctions et leurs origines, sont elles-mêmes construites à partir de quelques « domaines ». La définition exacte de ce terme sera discutée dans le paragraphe suivant, mais on peut dès lors considérer ces « domaines » comme des blocs unitaires, en nombre limité, dont la combinaison, la duplication et la fusion sont à l'origine de la diversification des protéines au cours de l'évolution (Wolf et al., 1999). Ainsi des fonctions protéiques nouvelles et complexes se sont construites à partir d'un ensemble fini de domaines, dont le nombre est estimé entre 1000 et 6000 selon la littérature (Han et al., 2007).

A nouveau, la complexité d'un organisme ne saurait être reliée à la seule multiplicité de ses domaines protéiques mais plutôt à l'abondance et à la diversité de ses protéines multidomaines. En effet, 68 % des familles de domaines protéiques sont communes aux trois règnes du vivant et seulement 12 % sont caractéristiques d'une espèce unique (Marsden et al., 2006). Les protéines multidomaines sont également représentées dans tous les règnes du vivant, mais elles deviennent

majoritaires chez les procaryotes (65 %) et particulièrement abondantes chez les eucaryotes dont elles forment 70 à 80 % des protéines (Apic et al., 2001).

Plusieurs études récentes se sont intéressées aux phénomènes de duplication, de recombinaison et de fusion de domaines protéiques au cours de l'évolution. Les domaines peuvent être classés soit en familles ayant une homologie de séquence significative correspondant à une origine commune, soit en superfamilles correspondant à des domaines ayant perdu leur similarité de séquences mais ayant tout de même conservé des relations structurales indéniables (Han et al., 2007). Généralement, les similarités de structures sont mieux conservées que les homologies de séquences (Chothia and Lesk, 1986). La plupart des superfamilles sont communes aux trois domaines du vivant, et sont particulièrement présentes chez les archées (88 %) et les bactéries (63 %). Il ressort de ces études que les domaines d'une famille donnée semblent s'associer seulement avec ceux d'une ou de deux autres superfamilles et l'orientation N - C terminale de leur combinaison est très conservée. Il existe cependant quelques familles, décrites comme versatiles ou mobiles, qui ont tendance à se combiner de part et d'autre avec des domaines issus de multiples familles. Les domaines de ces familles versatiles ont en réalité des fonctions dites auxiliaires qui ne correspondent pas à la fonction catalytique première de l'enzyme, mais jouent généralement des rôles de transmetteur du signal ou d'adaptateur (Lee and Lee, 2009). Enfin les recombinaisons entre familles différentes au sein du même règne semblent participer de manière significative à l'évolution de fonctions spécifiques d'un règne ou d'une espèce (Apic et al., 2001).

Les protéines multidomaines sont donc effectivement prépondérantes, notamment chez les eucaryotes. Mais, malgré cette constatation, la plupart des études se sont jusqu'à présent concentrées sur de petites protéines ou des domaines isolés issus de la fragmentation de protéines multidomaines et ce pour deux raisons. Premièrement, l'analyse fonctionnelle ou parfois structurale de protéines de hauts poids moléculaires est techniquement difficile, la majorité des protéines recensées dans la Protein Data Bank ont un poids moléculaire inférieur à 38 kDa (http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html). De plus, la nature globulaire et compacte d'un domaine autorise *a priori* la dissection de la plupart des protéines multidomaines en domaines catalytiques distincts dont l'étude est alors grandement facilitée. Cette approche est effectivement concluante lorsqu'elle s'adresse à des protéines dont les propriétés globales correspondent simplement à la somme des propriétés de chacun de leurs domaines isolés (Scott et al., 2002), mais ce comportement est loin d'être majoritaire. Lors de la dissection d'une protéine multidomaine, une grande quantité d'informations concernant les interactions entre domaines, la dynamique de l'ensemble ou encore des caractères de coopérativité et d'allostérie est perdue (Batey et al., 2005; Kuriyan and Eisenberg, 2007; Ryabov and Fushman, 2007b).

La majorité des processus cellulaires est prise en charge par des assemblages protéiques complexes, mettant en jeu non seulement des interactions entre plusieurs protéines, mais aussi entre des domaines d'une même macromolécule. Les études se focalisant sur chacun de ces composants pris séparément permettent généralement d'identifier et de caractériser leurs rôles au sein d'un système. Mais le mode de fonctionnement précis, les possibilités de régulation et les interactions entre ces différents partenaires ne peuvent être ainsi appréhendés, et seule l'analyse des protéines multidomaines en tant qu'unités propres et indivisibles offre une compréhension plus globale et plus fine de ces systèmes complexes.

1.2. La définition d'un « domaine protéique »

Le « domaine » joue aujourd'hui un rôle crucial que ce soit en biologie structurale, en génétique, en évolution, ou encore en biochimie. Malheureusement, ce concept est utilisé de façons différentes dans chacune de ces disciplines. Par ailleurs, la notion de domaine est souvent confondue avec celle de « module » qui représente une entité dont la séquence contient des motifs caractéristiques et qui ne se replie pas nécessairement de façon autonome, à la différence des unités de séquences répétitives qui sont indépendantes en termes de structure et de fonction, mais ne forment de structure stable qu'à l'état de copies multiples. De plus, le terme de « motif » est également fréquemment utilisé mais il ne s'adresse qu'à une partie d'un domaine tel que les résidus d'un site actif ou d'un site de fixation (Copley et al., 2002).

En biologie structurale, les domaines protéiques sont généralement décrits comme des chaînes polypeptidiques continues se repliant spatialement en unités structurales compactes et distinctes (Jones et al., 2000; Lee and Lee, 2009). Un domaine protéique en biochimie correspond par contre au fragment minimal d'un gène capable d'exercer une certaine fonction. Et enfin, un domaine est défini en phylogénétique par une séquence continue, identifiée dans différents contextes, particulièrement conservée au cours de l'évolution, mais sans aucun lien avec une fonction particulière (Adams et al., 1996). Une définition plus générale, mais aussi plus restrictive, est de décrire comme « domaine » une sous-région d'une chaîne polypeptidique qui est autonome, c'est-à-dire possédant toutes les caractéristiques d'une protéine globulaire entière (Hawkins and Lamb, 1995; Yesylevskyy et al., 2006).

En réalité, il est particulièrement difficile de définir clairement et de façon universelle l'ensemble des idées que recouvre la notion de domaine. Ainsi, la toute dernière définition proposée ci-dessus ne s'applique pas aux domaines formant une unité structurale bien définie au sein d'une protéine multidomaine mais dont la séquence est entremêlée avec celle d'autre domaine avoisinant. Les domaines de connexions ne rentrent pas non plus dans cette définition car ils permettent de relier des domaines catalytiques entre eux et possèdent une structure secondaire propre, mais leur fonction biologique n'a de rôle qu'au sein de la protéine multidomaine. Et il en va de même pour tous les domaines des familles versatiles jouant des rôles secondaires de transmission du signal ou d'adaptateur (Lee and Lee, 2009).

De nombreuses études de bioinformatique ont développé des outils afin d'identifier et de classer les domaines protéiques existants dans la nature. Certaines se basent sur une définition « génétique » du concept de domaine et procèdent par simple alignement de séquences (Copley et al., 2002). D'autres ont une approche plus structuraliste et s'appuient sur la comparaison de l'architecture même des protéines (Song et al., 2007). Enfin, plusieurs équipes proposent des algorithmes combinant les deux méthodes d'analyses, définissant alors les domaines d'une protéine par le biais de leurs interfaces et des interactions inter- et intra domaines (Kim et al., 2006). En effet, les interactions entre résidus à l'intérieur d'un même domaine sont plus fortes et stables que celles interdomaines. Ces études démontrent que les domaines intrinsèquement stables et compacts entrent beaucoup moins en interaction avec d'autres domaines, tandis que les domaines peu stables à l'état isolé sont souvent stabilisés par des phénomènes de coopérativité au sein de la protéine multidomaine (Yesylevskyy et al., 2006). Malheureusement, en se basant à nouveau sur des critères

de définition et des paramètres différents, ces résultats et ces classifications sont difficilement comparables.

Je définirai dans ce manuscrit un « domaine » comme une chaîne polypeptidique, continue ou non, formant une unité structurale compacte et distincte, possédant une fonction spécifique au sein d'une protéine multidomaine, mais pas obligatoirement à l'état isolé, et dont la structure, à défaut de la séquence, est particulièrement conservée au cours de l'évolution.

1.3. Les domaines de connexion

Pendant longtemps, l'étude de domaines ou de sous-unités protéiques isolés a complètement occulté le rôle déterminant des domaines de connexion au sein des protéines multidomaines. La dissection de celles-ci en domaines catalytiques distincts, sans même ôter les domaines de connexion, les inhibe par définition. Dans ces conditions, les rôles mécanistiques de régulateur, d'adaptateur ou encore de charnière pouvant être pris en charge par les domaines de connexion ne sont absolument pas détectables.

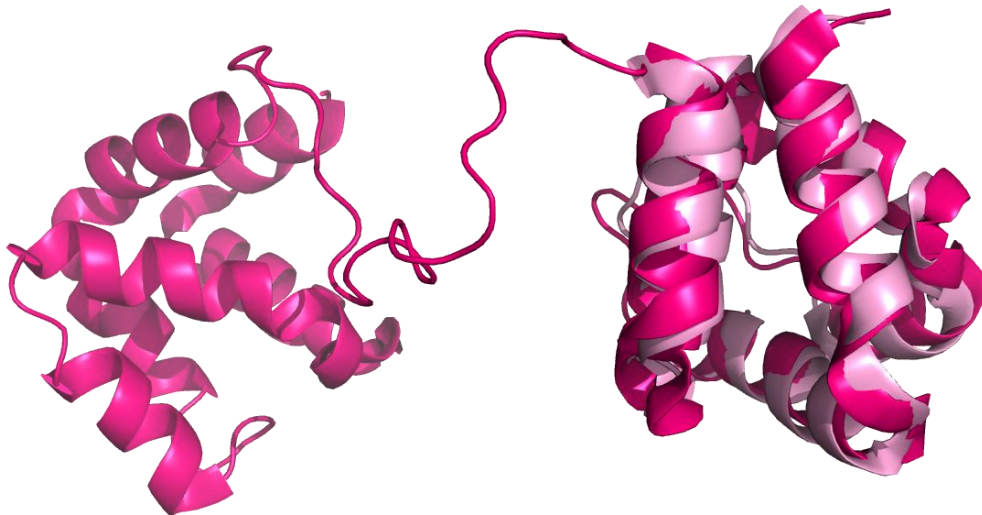


Figure 1: Aligment des structures du domaine PYRIN (1UJC) de la protéine ASC humaine et de la protéine entière (2KN6).

Dans un grand nombre de cas, la fusion de domaines catalytiques est concrétisée par un linker reliant deux domaines fonctionnels, simple boucle flexible n'ayant qu'une fonction d' « espaceur » ou de « rapprocheur » selon le point de vue. La dissection semble alors sans conséquence pour l'analyse structurale ou biochimique de chaque domaine pris individuellement. Ainsi les activités natives de systèmes tels que la PksA polycétide synthase ont pu être reconstituées à partir de ses domaines disséqués (Crawford et al., 2008). Par ailleurs, les structures de nombreux domaines isolés s'avèrent parfaitement cohérentes avec celles de protéines complètes obtenues ultérieurement. La structure du domaine PYRIN de la protéine humaine ASC s'aligne par exemple parfaitement sur celle de la protéine entière déterminée quelques années plus tard (de Alba, 2009; Liepinsh et al., 2003) (**Figure 1**).

Les linkers ne sont pas simplement des connecteurs covalents, ils permettent également d'établir une communication entre des domaines fonctionnels qu'ils relient (Gokhale and Khosla, 2000). Dans pratiquement toutes les protéines multidomaines, ces linkers, même s'ils ne sont pas essentiels au

fonctionnement général de la protéine, augmentent considérablement la stabilité de l'ensemble et imposent ou maintiennent la coopérativité entre les différents domaines catalytiques (Hawkins and Lamb, 1995; Ramachandran et al., 2007). Indépendamment d'une structure secondaire potentielle, la longueur même de ces connecteurs est alors critique. Dans de nombreux cas, l'allongement d'un linker, c'est-à-dire l'éloignement physique des domaines catalytiques qu'il relie, conduit à une diminution d'activité due à la perte de coopérativité et d'interactions interdomaines. A l'inverse, le raccourcissement d'un connecteur impose une rigidification du système, le privant de la flexibilité nécessaire au bon positionnement des domaines catalytiques (Batey and Clarke, 2006; Sauer et al., 2000). A la fois espaceur et rapprocheur, les linkers doivent être perçus comme des adaptateurs optimisés au cours de l'évolution pour concilier interaction, coopérativité, et protection des parties hydrophobes avec suffisamment de flexibilité et de mobilité.

L'intérêt récent pour les domaines de connexion a incité la publication d'études ciblées visant à les inventorier, les caractériser et les classer. Il en ressort deux grandes familles de connecteurs : ceux composés principalement d'hélices α , formant souvent des structures assez flexibles reliées par des « coils » ou « bends », et ceux composés de boucles ou linkers, apparemment peu structurés, mais contenant un taux élevé de prolines qui leur confère une certaine rigidité. Les domaines de connexion sont en général composés d'acides aminés hydrophobes, avec une propension pour les prolines supérieure aux autres types de domaines, le ratio des probabilités de trouver une proline dans un domaine de connexion *versus* tout autres domaines étant de 1,3 (George and Heringa, 2002).

Si l'étude par fragmentation des protéines contenant des connecteurs de la seconde famille (boucle) peut s'avérer concluante, les domaines de connexion ayant une structure secondaire propre (hélices α) possèdent probablement des rôles mécanistiques non négligeables qui ne peuvent être appréhendés qu'en les analysant dans leur contexte natif. Ainsi le domaine de connexion reliant les domaines PDZ 1 et 2 de la protéine NHERF1, facteur de régulation des échanges transmembranaires Na^+/H^+ chez les mammifères, augmente non seulement la stabilité thermodynamique de l'ensemble mais également l'affinité du domaine PDZ 2 pour des protéines cibles (Bhattacharya et al.). De la même façon, le domaine de connexion chez les récepteurs à guanylyl cyclases joue un double rôle de répresseur d'activité cyclase en l'absence du ligand et d'activateur du domaine cyclase lors de la fixation du ligand sur le domaine récepteur (Saha et al., 2009).

Il est souvent possible de déterminer le rôle de ces connecteurs par des études classiques de mutagenèse dirigée mais leur mode de fonctionnement est alors généralement bien plus difficile à appréhender. En effet, bien que des propriétés de charnières dynamiques leur soient souvent attribuées, rares sont les études qui ont réellement pu mettre en évidence leur implication dans le transfert d'informations via des changements conformationnels se répercutant dans toute la protéine. Ces travaux nécessitent souvent la résolution de plusieurs structures, obtenues dans différentes conditions, comme la présence ou l'absence d'un ligand. Ce fut par exemple le cas pour la protéine MalK, sous-unité ATPase du transporteur de maltose chez *E. coli*, dont la première cristallisation sans ATP a d'abord révélé l'existence de deux conformations dites ouverte et semi-ouverte, tandis que la résolution de la structure en présence de nucléotide a démontré une fermeture du système lors de la fixation du ligand (Chen et al., 2003) (**Figure 2**).

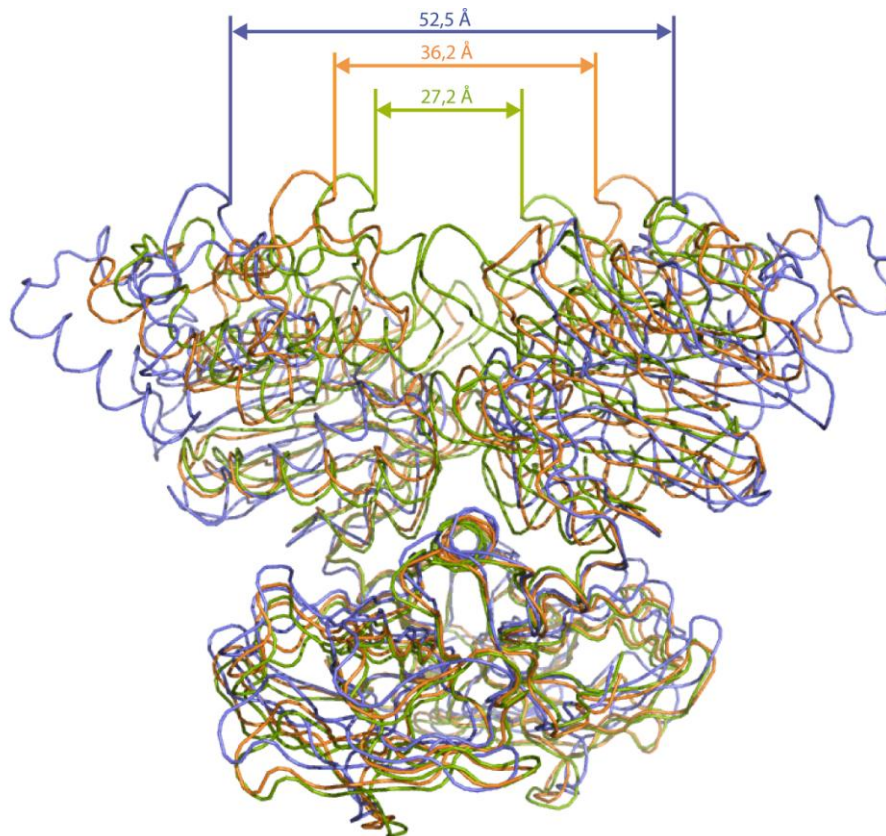


Figure 2: Les trois conformations, ouverte (mauve, 1O1E), semi-ouverte (orange, 1O1B) et fermée (verte, 1O1Z) de la protéine Malk.

Les exemples, encore trop rares, suffisent à nous convaincre du rôle primordial joué par les domaines de connexion chez les protéines multidomaines. Ils nous obligent à réviser notre approche scientifique afin de caractériser leurs fonctions, apparemment secondaires, mais indissociables du reste d'un système. Le problème ne saurait alors être simplifié par une restriction du champ d'étude ; la protéine multidomaine doit être analysée sous sa forme native, en présence des autres partenaires avec lesquels elle entre en interaction au cours de son activité catalytique.

1.4. Intérêt et difficultés de l'étude des protéines multidomaines

1.4.1. Les avantages

Après avoir constaté que la majorité des protéines, en particulier chez les eucaryotes, sont composées de plusieurs domaines, on peut se demander quels en sont les avantages pour l'organisme. La duplication, la combinaison ou encore la fusion de domaines en protéines multidomaines ont joué un rôle important dans la diversification, la spécialisation et la différenciation des espèces. Pourtant, la profusion de protéines multidomaines contenant un ou plusieurs domaines similaires, mais agencés de façons différentes, semble *a priori* peu économe en termes de production de protéines comparativement à l'expression séparée de chacun des domaines. Néanmoins, la réunion de différents domaines en une unique protéine présente de nombreux avantages dont l'allostérie. Ce phénomène a d'abord été découvert chez des protéines non pas multidomaines mais analogues par leur structure quaternaire. L'hémoglobine (Hb), qui forme des tétramères, constitue l'exemple type des protéines allostériques. En effet, chaque sous-unité de Hb présente une affinité assez faible pour O_2 qui augmente grâce aux propriétés de

coopérativité positive entre les sous-unités (Perutz, 1979; Petschow et al., 1977; Schay et al., 2006; Yonetani and Laberge, 2008).



Figure 3: Structure du dimère de la peptidase T de *S. typhimurium* (1FNO). Les domaines catalytiques sont représentés en bleus clair et foncé tandis que les domaines de dimérisation sont en orange et jaune. L'accès au site catalytique est encerclé de vert.

Les protéines multidomaines souvent issues de la fusion de gènes formant au préalable des structures quaternaires, ont généralement conservé, voir même acquis, un caractère allostérique. La comparaison des protéines carboxypeptidase A et peptidase T de *S. typhimurium*, respectivement mono- et bidomaines, illustre bien la possibilité de réguler ainsi de façon allostérique la fonction d'un enzyme. Le second domaine de la peptidase T est un membre de la superfamille des domaines de dimérisation de peptidases bactériennes. Ils permettent à la peptidase T, contrairement à la carboxypeptidase A, de former un dimère stable. L'activité de celle-ci devient alors plus spécifique, se limitant à l'hydrolyse de peptides très courts. La résolution de la structure du dimère a pu montrer que des boucles des domaines de connexion restreignent les cavités des deux sites catalytiques qui ne peuvent alors accueillir que des mono-, bi- ou tripeptides (Agarwal et al., 2007; Bashton and Chothia, 2007) (**Figure 3**).

Mais la fusion des différents composants d'un complexe protéique en une unique protéine multidomaine présente également d'autres avantages tels que (Batey et al., 2005; Chothia and Gough, 2009; Hawkins and Lamb, 1995):

- la colocalisation des partenaires ;
- une régulation commune des différents composants et leur expression en ratio stœchiométrique fixe permettant un contrôle plus fin de l'activité catalytique ;
- une meilleure canalisation des métabolites dans le cas de réactions couplées et une meilleure protection des espèces intermédiaires instables ;
- une plus grande flexibilité vis-à-vis de la reconnaissance entre partenaires : de plus faibles interactions permettent des réarrangements conformationnels plus rapides sans impliquer pour autant une dissociation du complexe, les partenaires étant reliés entre eux ;
- la création de nouvelles activités enzymatiques, ou leur modification par différents biais possibles:
 - la régulation de l'activité d'une enzyme soit par l'addition d'un domaine non-enzymatique (domaine de connexion ou de régulation), soit par la formation d'oligomères ;

- l'apparition de nouvelles fonctions protéiques issues de la fusion de différentes activités distinctes ;
- le transfert d'une partie de l'activité présente dans une protéine monodomaine à un nouveau domaine supplémentaire.

Quelques exemples illustrent assez bien ces différents phénomènes. *E. coli* est la seule bactérie connue possédant une protéine multidomaine transmembranaire DsdD qui catalyse le transfert des électrons du cytoplasme vers le périplasma à la place de la protéine CcdA généralement présente chez les autres bactéries. CcdA est bien plus petite que DsdD et correspond à sa partie hydrophobe interne. Il a été démontré qu'en acquérant un domaine du type thiorédoxine, DsdD avait élargi sa spécificité de substrats comparée à CcdA. De plus, des études de phylogénèse ont mis en évidence chez certaines bactéries ne possédant que CcdA, la présence de gènes encodant pour des protéines de type thiorédoxine adjacentes au gène *ccdA*. Ces exemples reflètent certainement une étape évolutive antérieure à DsdD (Katzen et al., 2002).

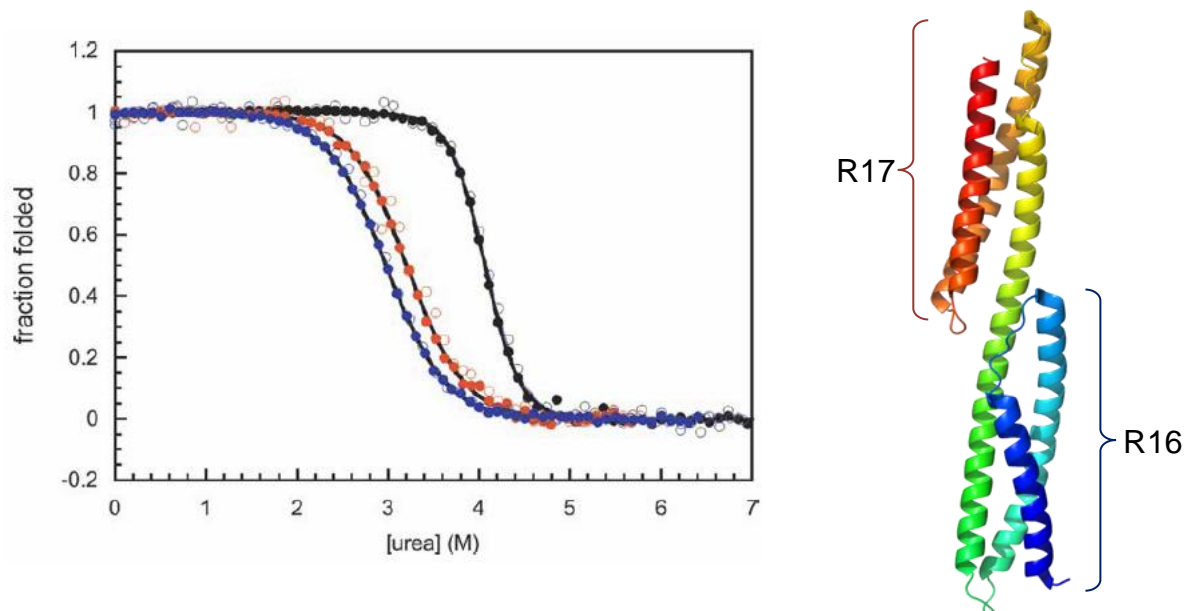


Figure 4 : Gauche : Coopérativité des domaines R16 et R17 de la spectrine lors de la dénaturation chimique de la protéine à l'urée. Les courbes rouge, bleue et noire correspondent respectivement aux domaines R16 et R17 seuls et à la protéine R1617 entière (Batey et al., 2005). Droite : Structure de la protéine tandem R1617 de la spectrine.

Le cas de la spectrine est représentatif des phénomènes de coopérativité pouvant exister entre plusieurs domaines d'une même protéine. La spectrine est une protéine du cytosquelette impliquée dans le maintien, la flexibilité et l'élasticité de la cellule. Les repliements des domaines R16 et R17 de cette protéine sont interdépendants car la protéine tandem R1617 est bien plus stable que chacun des domaines isolés. De plus, la pente de la courbe de dénaturation de la protéine est plus élevée lorsque la protéine est entière, soulignant à nouveau le caractère coopératif de ces interactions entre les deux domaines (Batey et al., 2005) (**Figure 4**).

Dans certains cas, plusieurs fonctions d'une protéine monodomaine sont partagées entre différents domaines d'une protéine multidomaine homologue. Ainsi les enzymes de restriction EcoRV et FokI possèdent des sites catalytiques parfaitement similaires. Mais on retrouve chez FokI deux domaines supplémentaires de la superfamille des « winged helices » impliqués dans la reconnaissance de l'ADN. Les fonctions de reconnaissance et de clivage prises en charge par l'unique

domaine de EcoRV sont distribuées sur chacun des différents domaines de FokI qui a conservé le même site actif et le même mécanisme de clivage de l'ADN, mais ne reconnaît plus la même séquence cible (Bashton and Chothia, 2007).

La duplication et la fusion de gènes peuvent également conduire à la séparation physique de différentes fonctions. La protéine AhpF fait partie du système enzymatique de protection contre le stress oxydant chez les bactéries. Elle se compose de trois domaines dont deux, du côté N-terminal, correspondent à la fusion de deux repliements type thiorédoxine. Les résultats d'études de phylogénétique associées à des analyses RMN d'échanges hydrogène-deutérium retracent l'évolution de cette protéine. La duplication et la fusion du gène codant pour les domaines thiorédoxine ont eu lieu au sein d'archaées thermophiles. Dans ce contexte, la liaison covalente entre les deux domaines présenterait un avantage sélectif puisque l'oligomérisation est une des stratégies des stabilisations classiques chez les protéines thermophiles. Par la suite, les deux domaines ont divergé, l'un d'eux (domaine b) diminuant en termes d'activité au profit d'une plus grande stabilité. Après un transfert de gène latéral vers la bactérie, ce domaine b a totalement perdu son site actif tandis que le domaine a a gagné en activité (Hall et al., 2009) (**Figure 5**). Cette séparation physique de la stabilité et de la catalyse permet à la protéine d'explorer des propriétés dynamiques améliorant sa catalyse au-delà de ce qui aurait pu être atteint avec un domaine unique.

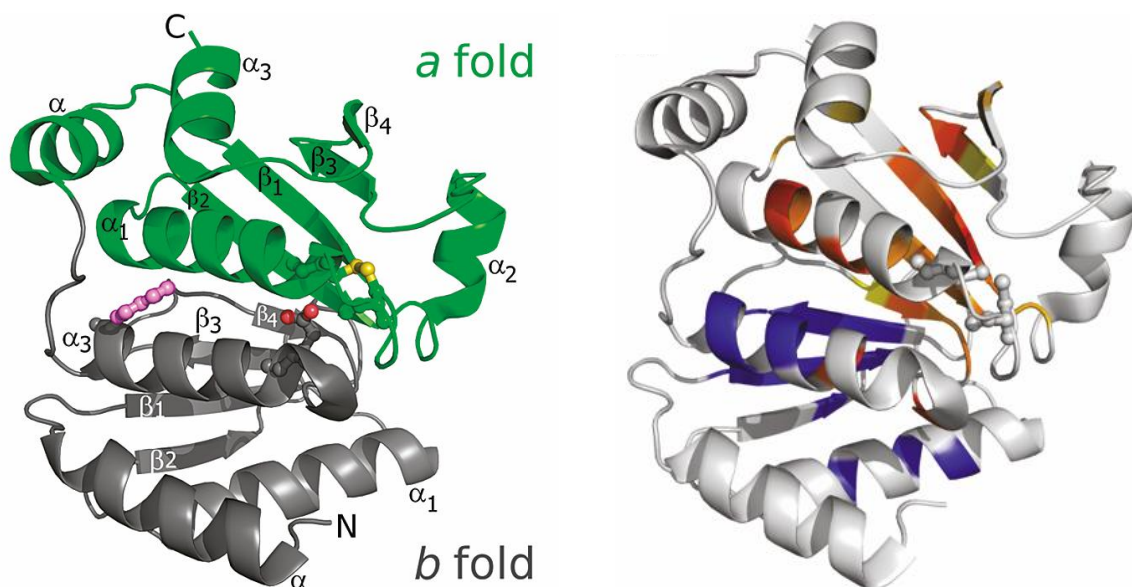


Figure 5: Structure des deux domaines type thiorédoxine de la protéine AhpF. Gauche : Le domaine a conservant l'activité catalytique (vert), domaine b inactif (gris). Droite : Niveaux de protections vis-à-vis de l'échange hydrogène-deutérium, les résidus pour lesquels l'échange est le plus lent (bleus) se trouvent tous dans le domaine b tandis que les résidus présentant des différences significatives en termes de facteur de protection au cours de la catalyse (colorés du jaune au rouge suivant la différence de magnitude) sont tous localisés autour du site actif du domaine a (Hall et al., 2009).

1.4.2. La dynamique des protéines multidomaines

La capacité à rassembler au sein d'une unique protéine les différents composants d'un système présente de réels intérêts pour la cellule. Mais comme nous l'avons vu précédemment, ces phénomènes ne peuvent être appréhendés qu'en étudiant ces systèmes dans leur globalité. Or si l'analyse d'une protéine au niveau atomique, même de haut poids moléculaire, est généralement rendue possible par la cristallographie rayons X, celle-ci ne fournit qu'une image figée d'un état replié de la protéine qui ne correspond pas forcément à la conformation majoritaire en solution. On ne doit pourtant pas oublier que la fonction d'une protéine est, au bout du compte, gouvernée par son caractère dynamique (Henzler-Wildman and Kern, 2007) et ce particulièrement chez les protéines multidomaines. En effet, l'union de plusieurs composants indépendants au sein d'une protéine unique n'est possible que si une certaine flexibilité est conservée afin d'autoriser l'ajustement des domaines entre eux et une mobilité au cours des cycles catalytiques nécessaire aux interactions entre les différents partenaires.

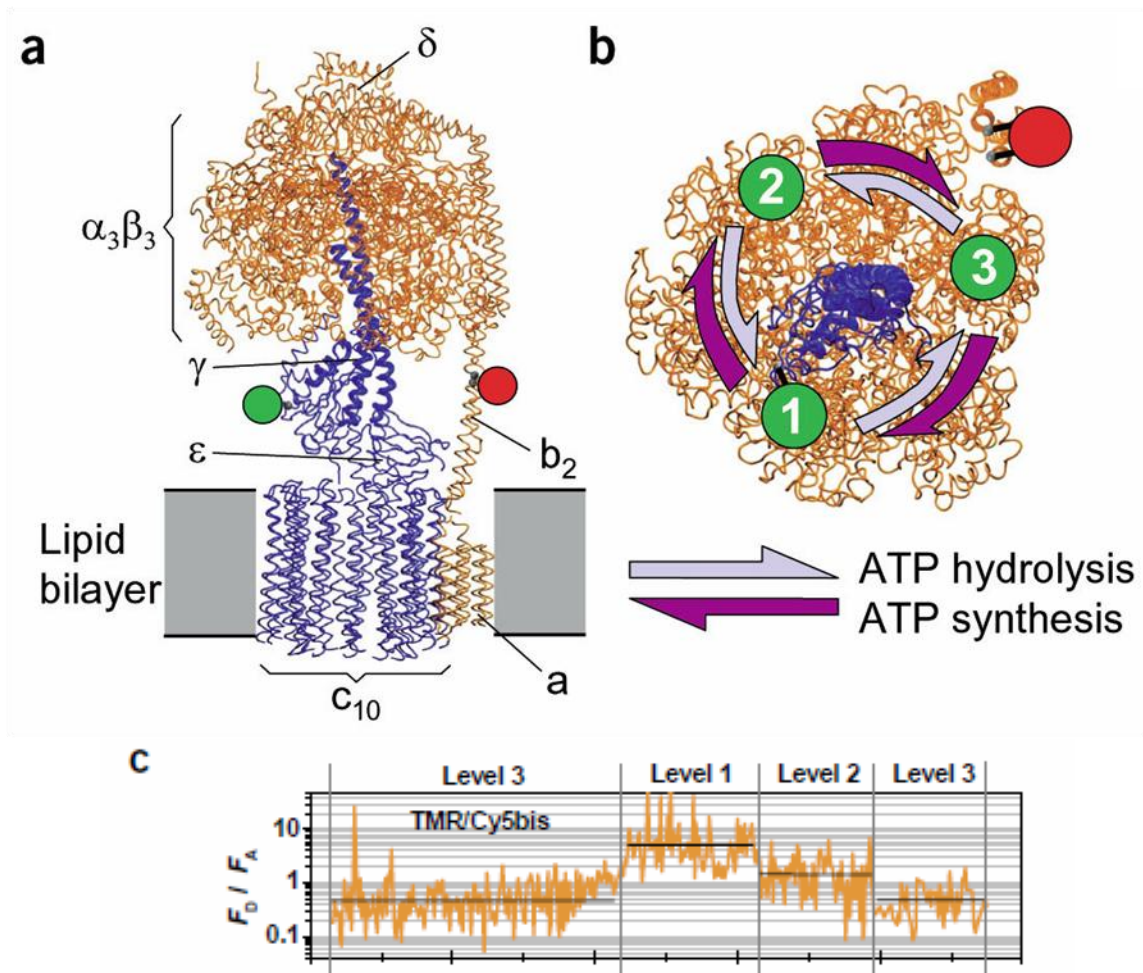


Figure 6: L'analyse par FRET sur molécule unique de la F_0F_1 -ATP synthase révèle des rotations ordonnées et séquentielles sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde durant l'hydrolyse et la synthèse d'ATP. a. La protéine est ancrée dans une double couche lipidique. Les sous-unités du rotor sont représentées en bleu tandis que les sous-unités statiques sont en orange. Le fluorophore donneur est symbolisé par un cercle rouge et l'accepteur est en vert. b. Coupe transversale au niveau des fluorophores. c. Ratio des intensités corrélées du donneur (F_D) et de l'accepteur (F_A) durant 500 ms. Trois niveaux de FRET sont visibles correspondant aux trois distances donneur-accepteur schématisées en b (Diez et al., 2004).

Bien que l'analyse par RMN classique soit encore difficilement applicable aux protéines de haut poids moléculaire, la combinaison de la spectroscopie optimisée par relaxation transverse (TROSY) et les marquages isotopiques permettent l'étude de molécules dont le poids moléculaire avoisine les 1.000.000 Da (Fernandez and Wider, 2003; Ryabov and Fushman, 2007a). Le couplage de données obtenues par RMN en solution avec celles, moins résolutes mais riches en informations dynamiques, obtenues par des expériences de SAXS, est également une solution intéressante (Bernado, 2010).

Par ailleurs, des recherches ciblant les phénomènes de dynamique ont révélé des changements conformationnels majeurs au cours du cycle catalytique de certaines macroprotéines. L'analyse de résonance Förster par transfert d'énergie (FRET), surtout lorsqu'elle est appliquée à l'échelle de la molécule unique, permet non seulement de caractériser en temps réel les mouvements internes, mais donne aussi accès aux caractéristiques d'hétérogénéité ou à des états intermédiaires instables peu peuplés ou rares. Un des plus beaux exemples de caractérisation dynamique par FRET sur molécule unique (smFRET) fut la description de la rotation de la F_0F_1 -ATP synthase. Cette protéine-moteur membranaire est capable de convertir l'énergie électrochimique du gradient transmembranaire de protons en énergie chimique sous la forme de molécule d'ATP. La rotation séquentielle de la sous-unité γ a ainsi pu être suivie en temps réel par smFRET (Diez et al., 2004) (**Figure 6**).

La description totale du fonctionnement d'une protéine nécessiterait finalement la connaissance complète de son paysage énergétique multidimensionnel mettant en jeu des probabilités relatives de chacun de ses états conformationnels (valeurs thermodynamiques) et les barrières d'énergie les séparant (valeurs cinétiques). La modélisation constitue alors la seule possibilité pour accéder à l'ensemble des intermédiaires conformationnels d'une protéine au cours de son cycle catalytique. L'étude *in silico* permet de relier les différentes conformations caractérisées *in vitro* par des méthodes d'analyse classiques, ou encore d'atteindre des états transitoires non détectés. L'étude de la dynamique de la protéine GroEL est un bel exemple du couplage de la cristallographie et de la modélisation. Cette protéine chaperonne utilise l'énergie issue de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP qui induit de larges réarrangements conformationnels. En se basant sur les structures cristallographiques de l'enzyme sous ses formes apo et liée, plusieurs états intermédiaires entre ces deux conformations extrêmes ont pu être modélisés *in silico* (Abrams and Vanden-Eijnden, 2010) (**Figure 7**).

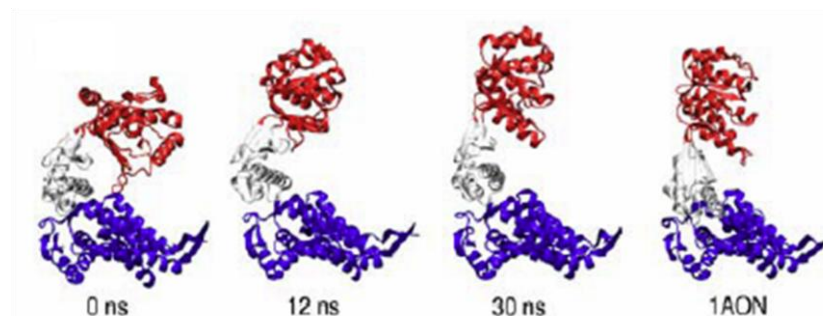


Figure 7: Simulation de la dynamique de la sous-unité de GroEL à partir des structures de l'apoenzyme fermée (à gauche) et de la protéine en présence d'ATP ouverte (à droite). Là aussi, la mobilité du domaine de connexion est particulièrement mise en jeu (Abrams and Vanden-Eijnden, 2010).

La nature intrinsèquement dynamique des protéines multidomaines impose une approche pluridisciplinaire. Seule la multiplication des méthodes d'analyse, leur couplage, et leur complémentarité donnent accès à une représentation globale de tels systèmes, et permet de reconstituer leur mode de fonctionnement tant à l'échelle du site catalytique, qu'à celles du domaine ou de l'ensemble de la protéine.

1.4.3. La création de nouvelles fonctions synthétiques

L'étude des protéines multidomaines est primordiale si nous voulons non seulement acquérir une connaissance globale des phénomènes régissant la vie cellulaire mais également développer de nouvelles machines moléculaires. En effet, l'ingénierie des protéines retrouve en elles des exemples naturels illustrant la possibilité de réguler, modifier, contrôler, voir même de créer de nouvelles fonctions par la simple combinaison de fonctions déjà existantes. Plusieurs travaux démontrent la possibilité de construire de nouvelles activités enzymatiques en s'inspirant des fusions naturelles, mais également en tentant de mieux cerner les phénomènes qui régissent et rendent possible ou non de tels réarrangements interprotéiques.

Deux approches sont possibles pour fusionner artificiellement deux protéines ou domaines : soit le DNA shuffling qui correspond à l'insertion de façon aléatoire de la séquence, ou des fragments de séquence codant pour un domaine dans le gène d'une protéine (Guntas and Ostermeier, 2004) ; soit l'insertion ou la fusion ciblée d'un domaine dans la séquence d'une protéine après avoir déterminé les points de jonctions potentiellement compatibles (Ostermeier, 2005; Peng and Li, 2009). La validation d'un kit de design modulaire de protéines synthétiques à partir de bibliothèques de gènes codant pour des domaines classés par fonctions (activité enzymatiques, régulation, ancrage, dynamique...etc.) a d'ailleurs récemment été publié (Grunberg et al.).

A nouveau, les domaines de connexion attirent particulièrement l'attention grâce à leur capacité à dicter des réarrangements conformationnels. De tels domaines « interrupteurs » sont extraits de protéines naturelles ou conçus en s'inspirant de ces dernières, puis sont incorporés entre des domaines catalytiques distincts, dictant alors la promiscuité et les interactions de ces domaines au sein de la nouvelle protéine. Ces fragments, capables d'adopter des structures locales radicalement différentes en fonction de leurs interactions avec d'autres domaines ou des conditions physico-chimiques, sont appelés « séquences caméléons » (Ambroggio and Kuhlman, 2006). La prédiction de la structure et de la dynamique d'une protéine à partir de sa seule séquence reste encore pour le moment très aléatoire, mais jouera certainement un rôle prépondérant dans les futures avancées en termes de création ciblée de protéines multidomaines synthétiques ayant des fonctions nouvelles.

2. Modularité des systèmes de transport d'électrons aux cytochromes P450

2.1. Les différents composants

Les cytochromes P450 (P450) catalysent principalement des réactions de monoxygénation dans le but d'augmenter la solubilité de molécules xénobiotiques et de permettre leur excrétion de la cellule. Pour ce faire, les P450 ont besoin de l'apport de deux électrons mais à deux étapes bien distinctes de leur cycle catalytique. Les P450 sont donc des accepteurs monoélectroniques. Les molécules servant de sources d'électrons les plus courantes sont le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Or toutes deux sont des donneurs diélectroniques ne pouvant transmettre des électrons que par paires sous la forme d'un ion hydrure. Le système de transport d'électrons au P450 a alors pour rôle de scinder le flux diélectronique issu du NAD(P)H en un flux monoélectronique vers les P450.

Malgré la grande diversité des systèmes P450 dont la nature varie en fonction de l'organisme dont ils sont issus ou de leur localisation cellulaire, tous ces complexes multiprotéiques présentent une architecture globale identique permettant d'assurer le transfert des électrons de façon synchrone avec le cycle des P450. On retrouve donc toujours les quatre mêmes composants :

1. la source électronique (NAD(P)H),
2. un composant oxydoréducteur,
3. un composant transporteur,
4. et l'accepteur final, le P450.

Les deux d'électrons provenant du NAD(P)H sont transmis aux P450 via deux entités distinctes, l'oxydoréductase et le transporteur. Le premier composant a pour rôle de dissocier la paire d'électrons en deux singulets grâce aux propriétés particulières de leur cofacteur flavinique (voir § 2.1.3), tandis que le second fait la navette entre l'oxydoréductase et l'accepteur final.

D'autres complexes protéiques tels que le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries ont dû résoudre cette incompatibilité entre une source diélectronique et un accepteur monoélectronique. Ce système catalyse le transfert des deux électrons du NADH au coenzyme Q (Q). Ce dernier peut atteindre un état de réduction à deux électrons (QH₂) mais uniquement par l'intermédiaire d'un état à un électron (Q^{•-}, semiquinone) qui accepte alors le second électron en même temps que deux protons. Tout comme pour les systèmes P450, le transfert NADH → Q est relayé par deux types intermédiaires, un composant oxydoréductase ayant pour cofacteur une molécule de FMN, et plusieurs transporteurs formant une voie de transfert via des centres fer-soufre eux même strictement monoélectroniques (Ohnishi and Salerno, 2005 ; Sazanov and Hinchliffe, 2006). La séparation spatiale de l'oxydoréductase et de l'accepteur final, qui n'entrent en relation que par l'intermédiaire de transporteurs, n'est donc pas spécifique des systèmes P450. Il semblerait même que cet agencement assure un meilleur couplage entre les partenaires rédox et un meilleur contrôle du flux électronique.

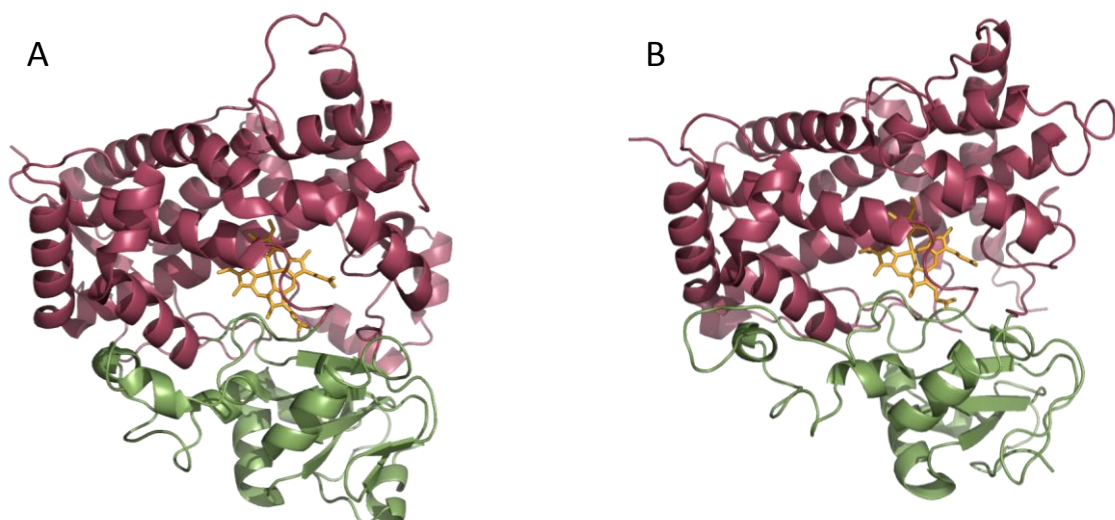
Par la suite, je présenterai d'abord chaque famille de composants, avant de décrire les différents systèmes P450 qu'ils peuvent former et leur classification.

2.1.1. Les accepteurs finaux, les P450

La superfamille des P450 contient un nombre pléthorique d'individus et sont présents dans la quasi-totalité des organismes vivants. Des P450 ont été recensés autant chez les bactéries que chez les mammifères, les plantes, les insectes, les champignons ou encore les protistes ; et déjà plus de 9000 séquences de P450 sont inventoriés à ce jour (Nelson, 2009). Le projet « human genome » a identifié 57 gènes codant pour des P450 fonctionnels dont 7 correspondant à des enzymes mitochondriaux et 50 à des enzymes microsomaux (Iyanagi, 2007). Mais la variabilité des séquences primaires des P450 est telle que certains ne partagent que 16 % d'identité de séquence.

Malgré cela, les P450 ont conservé un repliement structural commun au cours de l'évolution. (Peterson et al., 1997; Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Ces protéines globulaires se divisent en deux parties : un domaine majoritairement composé d'hélices α et un domaine plus flexible comprenant des brins β et des boucles ne formant par réellement de feuillet. Globalement, les 13 hélices représentent la moitié des résidus du cytochrome. L'hème est complètement enfoui au centre de la protéine, coincé entre deux hélices et un brin β qui établissent des contacts hydrophobes avec le cofacteur. Ce dernier est également coordonné par l'atome de soufre d'une cystéine (**Figure 8**) (Poulos, 1988; Poulos et al., 1987).

La localisation des P450 au sein de la cellule est très variable. Chez les procaryotes, les P450 sont des protéines solubles, tandis que chez les eucaryotes, ils sont généralement localisés soit au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (P450 microsomaux), soit dans la membrane interne de la mitochondrie (P450 mitochondriaux) ou encore au niveau des plastes dans les cellules végétales (Niranjan et al., 1988; Schuler and Werck-Reichhart, 2003).



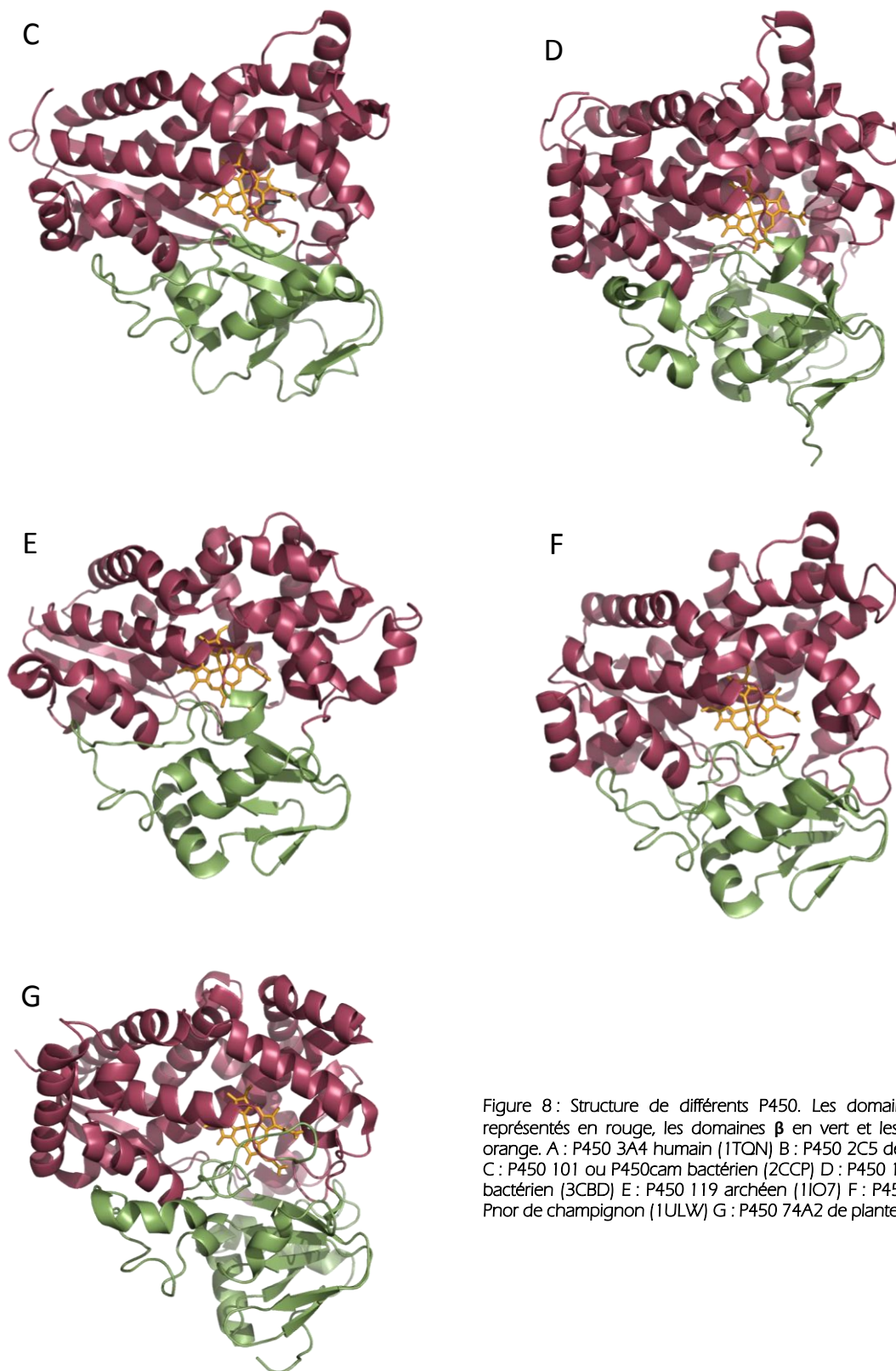
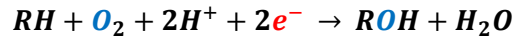


Figure 8 : Structure de différents P450. Les domaines α sont représentés en rouge, les domaines β en vert et les hèmes en orange. A : P450 3A4 humain (1TON) B : P450 2C5 de rat (1DT6) C : P450 101 ou P450cam bactérien (2CCP) D : P450 102 ou BM3 bactérien (3CBD) E : P450 119 archéen (1IO7) F : P450 55A1 ou Pnor de champignon (1ULW) G : P450 74A2 de plante (3DAM)..

Les cytochromes P450 sont les premiers acteurs du métabolisme de détoxification voué à l'élimination des xénobiotiques tels que les polluants ou les médicaments. Ce sont des hémoprotéines qui catalysent majoritairement des réactions de monooxygénation selon l'équation suivante (Cooper et al., 1963; Mansuy et al., 1989; Omura and Sato, 1962) :



L'introduction d'un atome d'oxygène dans la chaîne carbonée des molécules xénobiotiques, souvent très hydrophobes, augmente la solubilité de ces substrats et facilite ainsi leur élimination par la cellule via l'urine ou la bile. La **Figure 9** ci-dessous résume les trois grandes phases du métabolisme de détoxification chez l'humain qui ont lieu principalement au niveau du foie et des reins. La phase I est catalysée par les P450 tandis que la phase II est prise en charge par des enzymes de conjugaison, en générale des transférases, et permet l'ajout d'un groupement hydrophile R' sur le métabolite oxydé ROH. La dernière phase fait intervenir des transporteurs ATP-dépendants (Transporteur ABC pour ATP Binding Cassette) et conduit à l'excrétion des métabolites hors de la cellule (Iyanagi, 2007).

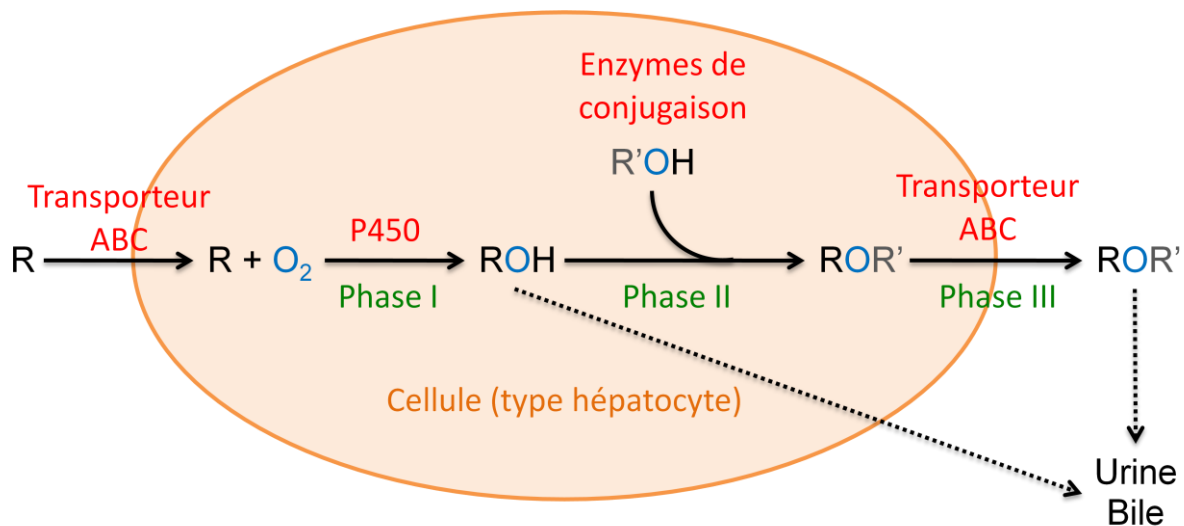


Figure 9: Le métabolisme des xénobiotiques chez l'humain. Les cytochromes P450 catalysent la phase I.

En dehors des réactions de monooxygénation, certains P450 catalysent des réactions de déshydratations, de réductions ou d'isomérisations et introduisent des groupements fonctionnels tels que $-SH$, $-NH_2$ ou encore $-COOH$ sur leurs substrats. La diversité des molécules prises en charge par les P450 en termes de taille et de nature chimique est également très impressionnante. La spécificité des P450 vis-à-vis de leurs substrats est d'ailleurs très variable et chevauchante en fonction du cytochrome. En effet, non seulement certains P450 reconnaissent un très grand nombre de substrats tandis que d'autres sont très spécialisés, mais une même molécule peut elle-même être métabolisée par plusieurs P450 (Coon, 2005).

Le nom des cytochromes P450 est dû à la nature de leur cofacteur, une porphyrine de fer et au pic d'absorption observé à 450 nm sur leur spectre réduit en présence de monoxyde de carbone. Le cycle catalytique des P450 se base sur l'activation d'un atome d'oxygène issu d'une molécule d' O_2 via le cofacteur hémique des cytochromes (**Figure 10**). La nature exacte de l'entité active fer-oxo a longtemps été débattue. Finalement des études de cinétiques rapides, de résonance paramagnétique électronique (RPE), et de spectroscopie Mössbauer ont permis de discriminer

l'espèce ferrate-oxo ($\text{Fe}^{5+}=\text{O}$) en faveur du composé ferryl-oxo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) avec un électron délocalisé sur la porphyrine sous la forme d'un radical π -cation (Egawa et al., 1994; Kellner et al., 2002; Schunemann et al., 2002). Dans certains cas particuliers, les P450 s'affranchissent de l'apport d'électrons en utilisant des agents oxydants tels que les peracides ou les hydroperoxydes (Omura, 2010; Coon, 2005). Ce cycle court, également appelé « peroxide shunt », est décrit par la flèche rose sur la **Figure 10**.

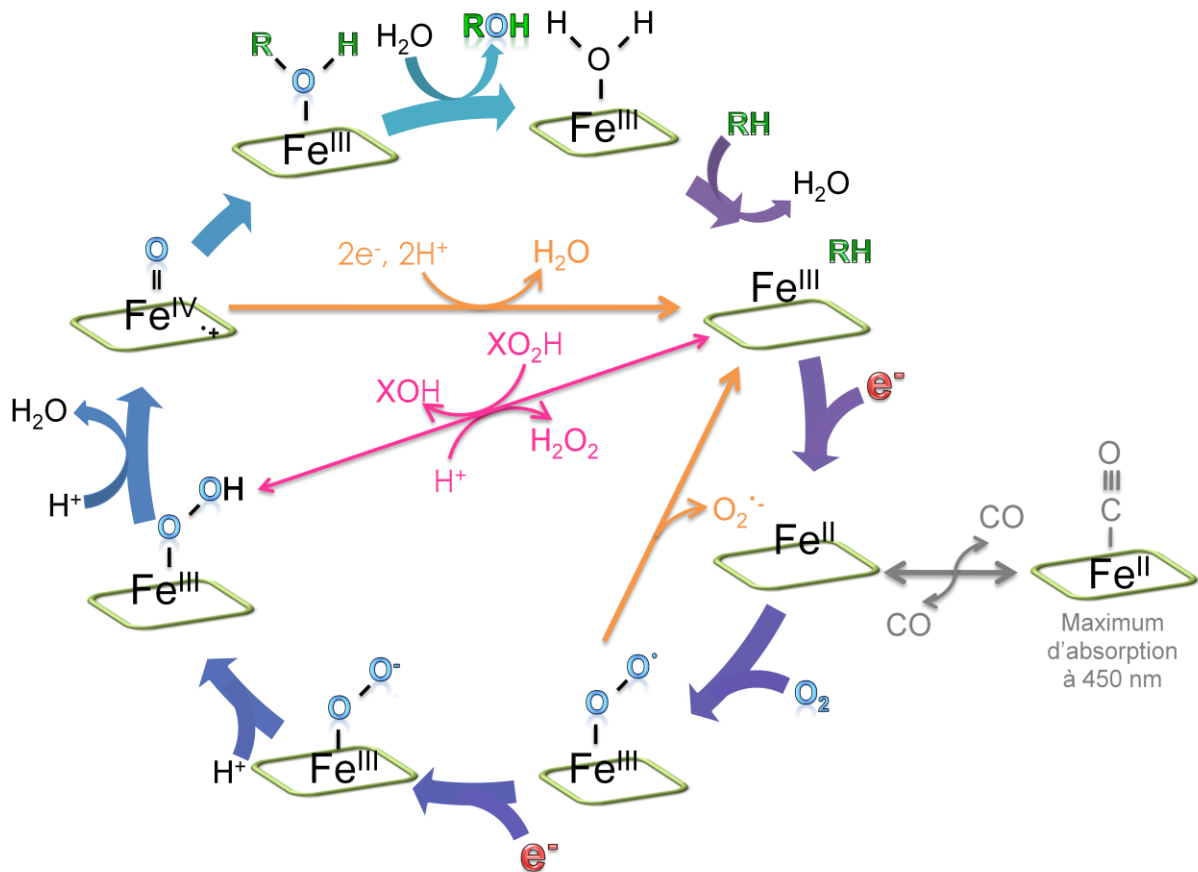


Figure 10: Cycle catalytique des cytochromes P450. La molécule d'hème est schématisée par un carré vert. RH représente le substrat. L'apport de 2 électrons à 2 étapes différentes du cycle est primordial pour éviter l'entrée dans les voies abortives et la production de ROS (reactive oxygen species).

La synchronisation entre les P450 et leurs partenaires rédox qui fournissent les 2 électrons nécessaires à sa catalyse est primordiale. En effet lorsque ce couplage n'est pas réalisé (découplage), le cycle des P450 entre dans des voies abortives (flèches oranges sur la **Figure 10**) conduisant à la décomposition du complexe fer-oxygène et la production soit d'eau, soit d'espèces oxygénées réactives (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène ou le radical superoxyde. Pour certains cytochromes comme les P450 microsomaux et mitochondriaux, cette activité oxydase est d'ailleurs paradoxalement plus importante que l'activité catalytique oxygénase. La fréquence de ces réactions indésirables dépend de nombreux paramètres dont la vitesse des transferts d'électrons ou de protons, le mauvais positionnement des substrats dans le site catalytique, ou encore la qualité de la reconnaissance et des interactions entre P450 et partenaires rédox. Par exemple, le couplage du système P450cam est pratiquement quantitatif lors de l'oxydation du camphre, tandis que 95 % de découplage est observé lors de la métabolisation des styrènes (Murataliev et al., 2008). Le cytochrome *b*₅ (cyt *b*₅) est un des partenaires rédox jouant un rôle primordial dans l'amélioration du couplage, bien qu'il ne soit pas capable de fournir l'entièreté des électrons consommés par les P450

(Perret and Pompon, 1998). Enfin, les P450 ayant une très large spécificité de substrat sont d'avantage sujet à l'introduction d'eau au sein du site actif durant la catalyse, ce qui induit alors un taux élevé de découplage (Munro et al., 2007).

Si les recherches médicales et pharmaceutiques s'intéressent de très près et depuis de longues années à la compréhension et aux contrôles des activités P450, le rôle des partenaires rédox constituant le système de transport d'électrons vers ces enzymes est souvent négligé. Pourtant la nature extrêmement variable de ces systèmes en fonction des organismes dont ils sont issus et de leur localisation cellulaire en font un sujet d'études intéressant et complexe ; ayant, dans le cas de la CPR, des répercussions potentielles sur le métabolisme des médicaments.

2.1.2. Les transporteurs

Il existe trois types de transporteurs selon la nature de leurs cofacteurs impliqués dans le transfert des électrons. Les premiers sont dits de type ferrédoxine (**Figure 11 C**). Les ferrédoxines sont des transporteurs monoélectroniques à centre fer-soufre dont les atomes de fer sont généralement ligandés par des cystéines. La stœchiométrie de ces clusters ([2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S], [3Fe-4S]/ [4Fe-4S]), ainsi que la nature soluble ou membranaire des protéines diffère suivant les systèmes P450 (McLean et al., 2005).

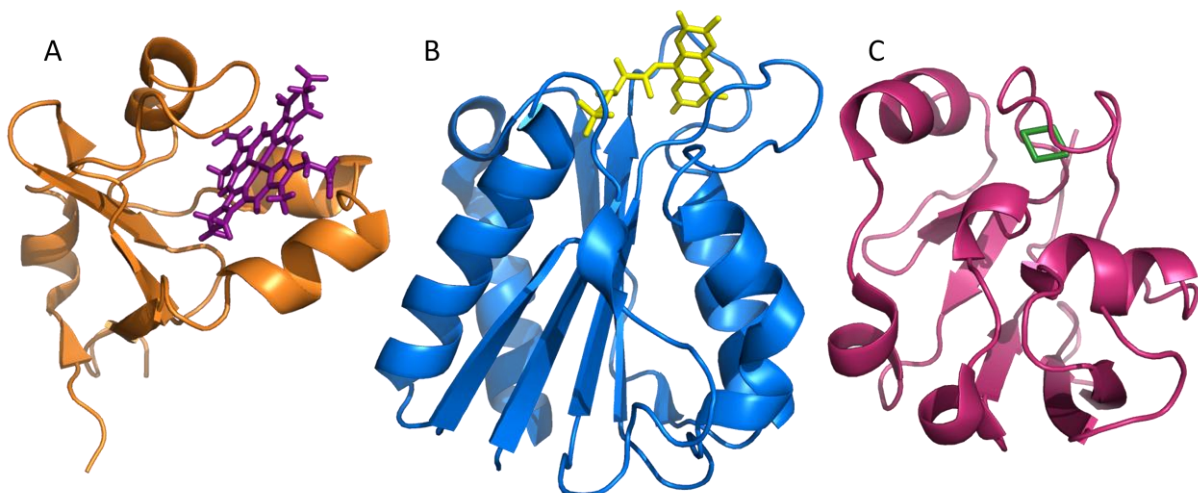


Figure 11: Structure de composés transporteurs de 3 types. A. Structure du cyt b_5 humain (2I96), B. Structure de la flavodoxine de *D. desulfuricans* (3KAP, (Romero et al., 1996)), C. Structure de la ferrédoxine de *Rhodospseudomonas palustris* (1HU1, (Bell et al.)). Les cofacteurs hémiques, FMN et $[Fe_2-S_2]$ sont respectivement représentés en violet, jaune et vert.

Les seconds types de transporteurs rencontrés sont les flavodoxines (**Figure 11 B**). On retrouve ces petites flavoprotéines (~14-23 kDa) chez un grand nombre d'organismes unicellulaires tels que des bactéries aérobies ou anaérobies, ou des eucaryotes inférieurs comme des algues (Sancho, 2006). Elles participent à des réactions de fixation d'azote, à l'activation réductive de la pyruvate-formate lyase ou de la biotine synthase (Munro et al., 2007). On les retrouve sous forme soluble dans les systèmes P450 bactériens, mais aussi sous forme membranaire, fusionnées à d'autres composants, chez les systèmes P450 eucaryotes. Dans les deux cas, elles gardent leur rôle initial de transporteurs monoélectroniques. D'un point de vue structural, les flavodoxines possèdent un repliement commun constitué d'un feuillet β central comprenant cinq brins parallèles, entourés de quatre hélices α (Sevrioukova et al., 1999b). Les flavodoxines étant connues comme des substituts potentiels aux ferrédoxines lorsque les conditions cellulaires sont limitées en fer, il n'est pas

surprenant de retrouver ces deux types de protéines dans des rôles équivalents de transporteurs d'électrons aux P450 (McLean et al., 2005).

Enfin le troisième transporteur recensé est le cyt b_5 (**Figure 11 A**). Des formes solubles et membranaires de cette protéine de ~17 kDa sont présentes chez les animaux, tandis que seules des formes membranaires existent chez la levure et les insectes, mais le degré d'identité de séquences entre ces différents cyt b_5 reste élevé. Une protéine analogue existe également chez les procaryotes, le cyt b_{561} . Structuellement, le cyt b_5 est une petite protéine globulaire constituée de 6 hélices α et 5 brins β renfermant une molécule d'hème dont l'atome de fer est coordonné à deux histidines complètement conservées (Schenkman and Jansson, 2003). Suivant les systèmes, le cyt b_5 peut soit endosser totalement le rôle de transporteur ou simplement influencer la nature et l'efficacité de la catalyse (Hannemann et al., 2007; Iyanagi, 2007; Omura) (voir § 3.2.3).

2.1.3. Les oxydoréductases

Les oxydoréductases sont presque toutes de type ferrédoxine réductase à l'exception de quelques systèmes bactériens tels que PFOR qui possèdent alors une réductase de type flavodoxine déjà décrite dans le paragraphe précédent (Hannemann et al., 2007).

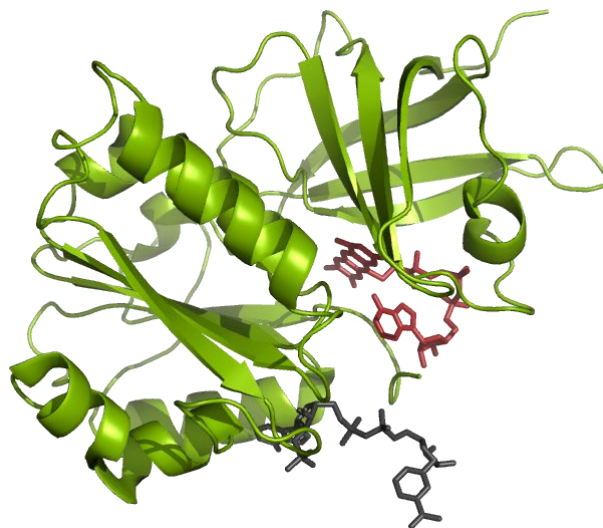


Figure 12: Structure de la ferrédoxine réductase de *Rhodobacter capsulatus* cristallisée en présence de NADP⁺ (en gris). Le cofacteur FAD est représenté en rouge (2VNH, (Bortolotti et al., 2009)).

Les ferrédoxines réductases sont également des flavoenzymes ubiquitaires qui transmettent les électrons issus du NAD(P)H à des donneurs de bas potentiel rédox telles que des ferrédoxines ou des flavodoxines. Ces protéines utilisent les propriétés de leur groupe prosthétique flavinique, le FAD, pour scinder le doublet électronique transmis par le NAD(P)H sous la forme d'un ion hydrure vers des transporteurs obligatoirement monoélectroniques (Carrillo and Ceccarelli, 2003). Les cycles isoalloxazines/flavoniques peuvent exister sous trois états rédox au sein des flavoprotéines : oxydés, partiellement réduits (radical semiquinone, sq), et totalement réduits (hydroquinone, hq), différant tous d'un électron dans leurs niveaux de réduction (voir § 4.3.2.1). La stabilité du cycle isoalloxazine dans ces trois états rédox permet aux flavoenzymes de coupler des molécules organiques à deux électrons avec d'autres groupements prosthétiques transférant des électrons singulets (Sevrioukova and Peterson, 1995).

Leur structure se découpe en deux domaines contenant chacun plus ou moins 150 acides aminés (**Figure 12**). La région C-terminal est responsable de la fixation de NAD(P)H et correspond au repliement classique d'un Rossmann Fold permettant la fixation des pyridines dinucléotides, tandis que le domaine N-terminal est composé d'un tonneau β antiparallèle liant le cofacteur FAD via des interactions de π stacking. Des résidus aromatiques, coplanaires au groupement flavinique, sont alors positionnés de façon à maximiser les recouvrements des orbitales π (Gruetz et al., 2000).

3. Diversité et modularité des systèmes P450

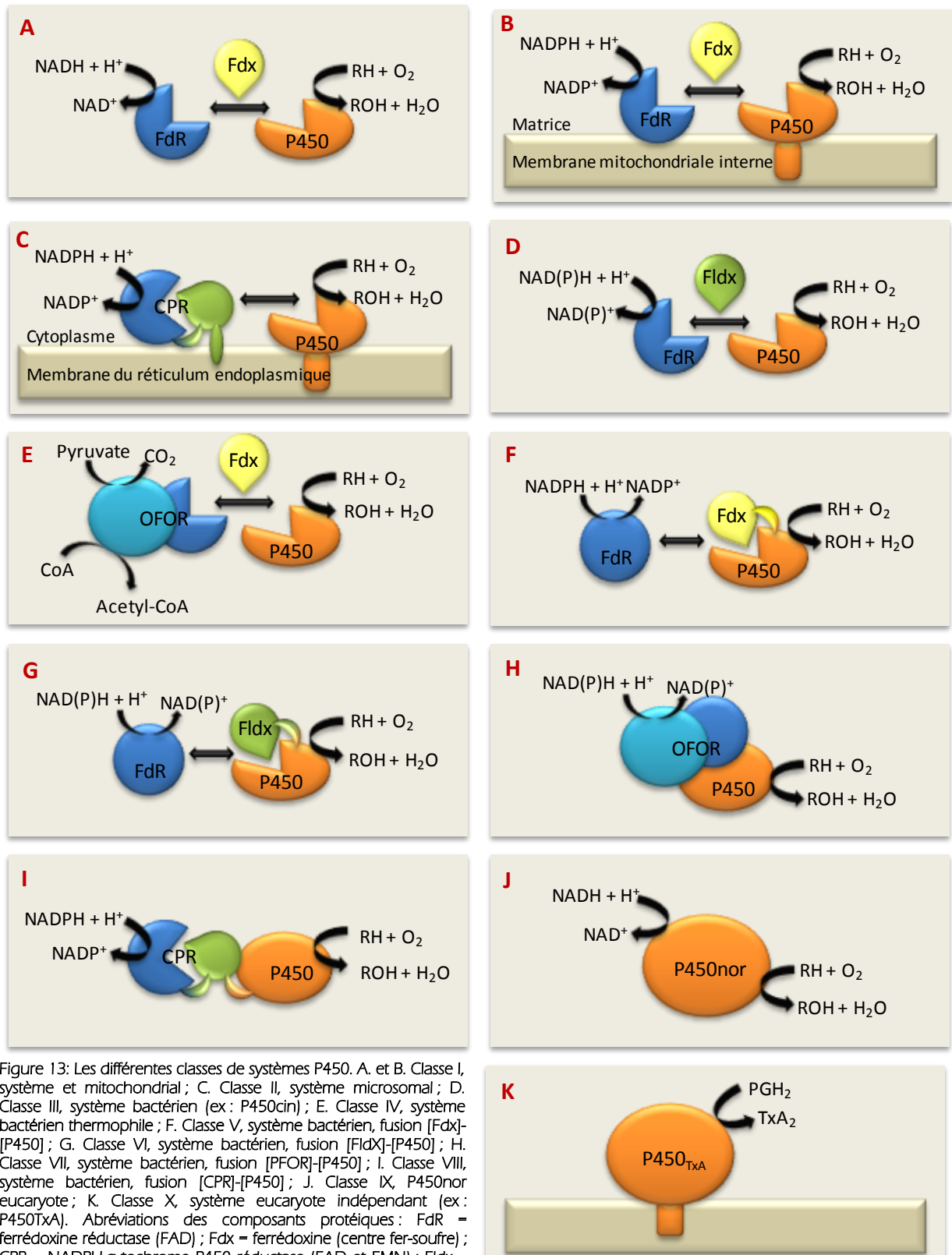


Figure 13: Les différentes classes de systèmes P450. A. et B. Classe I, système et mitochondrial ; C. Classe II, système microsomal ; D. Classe III, système bactérien (ex : P450cin) ; E. Classe IV, système bactérien thermophile ; F. Classe V, système bactérien, fusion [Fdx]-[P450] ; G. Classe VI, système bactérien, fusion [Fldx]-[P450] ; H. Classe VII, système bactérien, fusion [PFOR]-[P450] ; I. Classe VIII, système bactérien, fusion [CPR]-[P450] ; J. Classe IX, P450nor eucaryote ; K. Classe X, système eucaryote indépendant (ex : P450_{TxA}). Abréviations des composants protéiques : FdR = ferrédoxine réductase (FAD) ; Fdx = ferrédoxine (centre fer-soufre) ; CPR = NADPH-cytochrome P450 réductase (FAD et FMN) ; Fldx = flavodoxine (FMN) ; OFOR = 2-oxoacide :ferrédoxine oxydoréductase (thiamine phosphate ; centre [4Fe-4S]) ; PFOR = phthalate oxygénase réductase (FMN, centre [2Fe-2S]). (Hannemann et al., 2007)

3.1. Le recensement et la classification des systèmes

Les systèmes de transfert d'électrons aux P450 sont réunis en familles ou classes dont le nombre ne cesse d'augmenter avec la découverte de nouveaux types d'enzymes. Les premiers P450 ont d'abord été regroupés sous deux grandes classes : les systèmes procaryotes solubles de classe I, et les systèmes eucaryotes membranaires de classe II (McLean et al., 2005). Mais rapidement de nouveaux spécimens révélant la diversité inattendue des systèmes de transports d'électrons aux P450, correspondant à des cas plus ou moins particuliers, ont imposé la révision de ce classement simpliste. Ainsi, en 2007, Hanneman recensait 10 classes de P450 ayant des partenaires rédox de natures différentes, certaines présentant des fusions en protéines multidomaines et pouvant être solubles, partiellement ou totalement membranaires (**Figure 13** et **Annexe § 1**) (Hannemann et al., 2007).

Les systèmes majoritaires sont ceux des classes I et II. La classe II est communément représentée chez les P450 microsomaux dont le transporteur des électrons est assuré par la NADPH-cytochrome P450 réductase (CPR) issue de la fusion d'une flavodoxine et d'une ferrédoxine réductase. L'ensemble du système est alors ancré à la membrane du réticulum endoplasmique. Par ailleurs, la classe VIII, dont l'exemple classique est la P450-BM3 de *Bacillus megaterium*, correspond à la fusion de l'ensemble des trois composants en une unique protéine multidomaine soluble et indépendante (Narhi and Fulco, 1986). L'énumération et la description des différentes classes de systèmes en **Figure 13** ont pour but de souligner la diversité et surtout la modularité des systèmes de transports d'électrons aux cytochromes P450 qui ont pourtant évolué à partir de gènes ancestraux communs. Mais les particularités des organismes dont ils sont issus, leur localisation cellulaire, ou encore la nature des réactions prises en charge par un cytochrome précis ont favorisé la fusion de tels ou tels composants, leur ancrage ou non à une membrane, et finalement la simplification ou au contraire la multiplication des systèmes chez un organisme donné.

Malgré la diversité apparente de ces différents systèmes, ils partagent tout de même des caractéristiques communes telles que la présence de trois partenaires rédox (oxydoréductase, transporteur et accepteur), à l'exception des classes IX et X constituées d'un unique P450 indépendant. Par ailleurs les systèmes NAD(P)H-dépendants possèdent pratiquement toujours des composants oxydoréductases de type ferrédoxine réductase, à l'exception de la classe VII, et ne présentent que trois types de transporteurs différents (voir § 2.1.2). Les divergences entre les classes de systèmes P450 proviennent plutôt de leur nature, soluble ou membranaire, et des fusions existant entre certains de leurs composants. On peut alors se demander l'origine de ces fusions ; mais la variété des systèmes rencontrée, présentant pratiquement toutes les possibilités de fusions quelques soit l'organisme d'origine, semble indiquer le caractère opportuniste et certainement peu contraignant de ces fusions.

Les organismes tels que les plantes ou les champignons sont des exemples de l'adaptation des systèmes P450 au cours de l'évolution. De par leur nature sédentaire, ces espèces dépendent complètement de leur métabolisme pour affronter les variations de leur environnement ou pour communiquer. Elles ont développé en conséquence une biochimie complexe dans laquelle les P450 jouent un rôle important tant au niveau du métabolisme primaire que secondaire. On a recensé chez les plantes le plus grand nombre de séquences de gènes codant pour des P450. Et, tandis que les organismes contenant des systèmes P450 de classe II ne possèdent généralement qu'un unique gène

codant pour une CPR, plusieurs isoformes de CPR ont été identifiés chez les plantes et des champignons. Ces différents partenaires présentent des propriétés rédox, des localisations subcellulaires, et des activités vis-à-vis de tel ou tel P450 différentes. Cette sophistication est probablement un atout pour ces organismes contraints à s'adapter à des modifications et des agressions de leur environnement (Lah et al., 2008; Murataliev et al., 2004). Par ailleurs, les P450 chez les plantes ont un rôle de biosynthèse plutôt que de dégradation qui nécessiterait potentiellement une adaptation du système de transfert d'électrons et la coexistence de plusieurs CPR.

3.2. Les interactions entre les composants des systèmes P450

3.2.1. La conservation de la charge et les interactions électrostatiques

Non seulement la grande majorité des systèmes P450 présente le même nombre de composants, indépendants ou fusionnés et ayant des fonctions analogues, mais les charges électrostatiques superficielles de ces composants au niveau de leurs zones d'interactions sont également très conservées (**Figure 14**). Ainsi, les résidus autour de la face proximale de l'hème des cytochromes par laquelle transitent les électrons provenant du transporteur, exposent des charges majoritairement positives (bleues) (Gilep et al., 2001b; Rogers et al., 1994; Sevrioukova et al., 1996a). Ceux entourant les cofacteurs des différents transporteurs sont eux clairement négatifs (rouges) (Higashimoto et al., 2006). Finalement les cofacteurs des composants oxydoréductases sont entourés de charges positives.

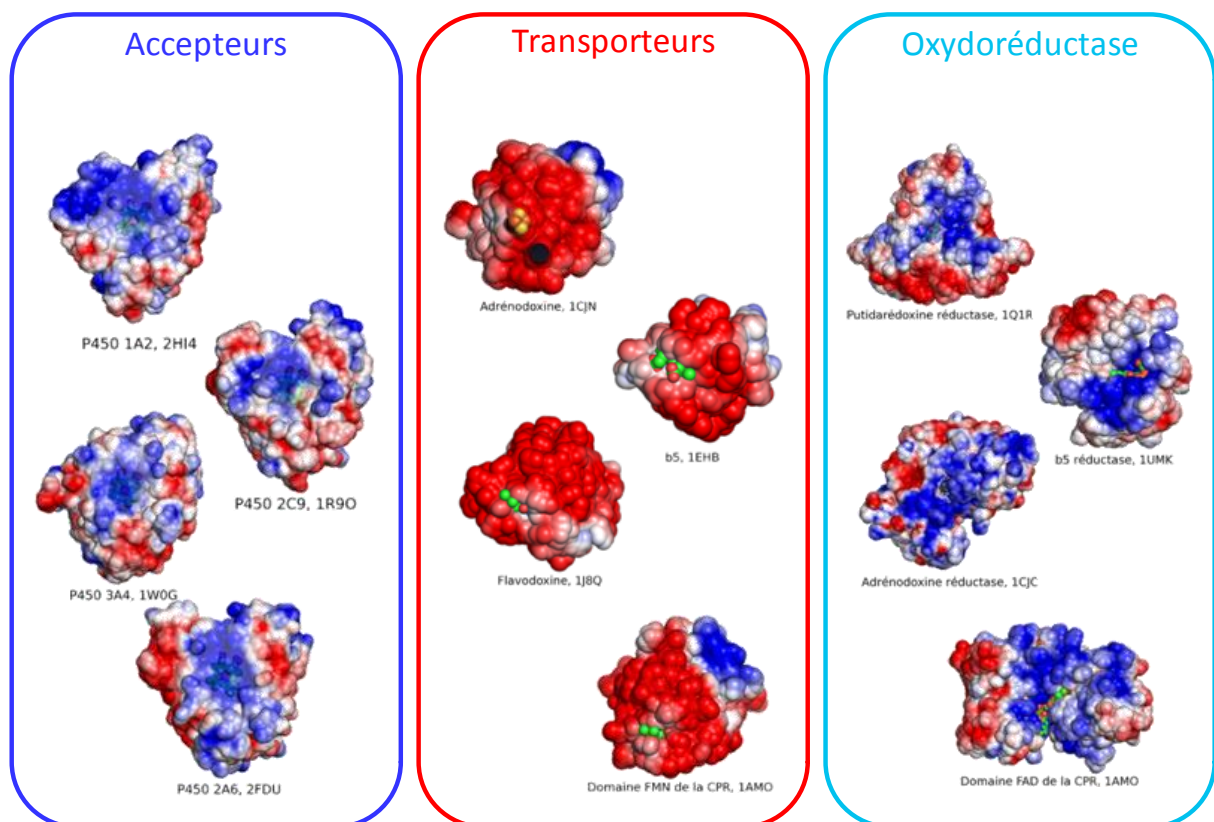


Figure 14: Conservation des charges à la surface des différents types d'accepteurs (P450), de transporteurs et d'oxydoréductase. Les potentiels électrostatiques positifs sont représentés sur la surface de Connolly en bleu tandis que les négatifs sont en rouge (de -5 à +5 kEV).

Concernant les composants transporteurs, tels que les flavodoxines ou le cyt b_5 , qui font la navette entre l'oxydoréductase et le cytochrome, la distribution des charges y est fortement asymétrique avec une face négative portant le cofacteur, et une face non catalytique positive. Ce phénomène crée un moment dipolaire le long de l'axe passant par le cofacteur qui facilite ainsi l'orientation du transfert d'électrons (Jenkins et al., 1997). Mais la force de ces interactions électrostatiques entre le transporteur et l'accepteur est tout de même assez variable selon les systèmes. Par exemple, le complexe entre le cytochrome P450-C17 et une flavodoxine bactérienne est bien moins stable que celui entre ce même cytochrome et une CPR (Jenkins and Waterman, 1998).

Certain cas font malgré tout exception. Ainsi le domaine transporteur (FMN) dans le P450-BM3 ne présente pas de charge négative autour du cofacteur flavinique, mais plutôt des acides aminés neutres et hydrophobes (Sevrioukova et al., 1999b) (**Figure 15**). Cette particularité expliquerait d'ailleurs la stabilisation, dans le P450-BM3, d'une forme rédox du FMN particulière, la semiquinone anionique (voir § 4.3.2.1), absente des autres systèmes. Dans le cas particulier du P450-BM3, la fusion de tous les composants en une unique protéine suffit à assurer une très bonne efficacité de transferts d'électrons. Une interaction trop étroite du cytochrome et du transporteur risquerait en effet, dans ce cas particulier, de ralentir la constante catalytique de l'ensemble en empêchant le domaine FMN d'interagir avec le domaine oxydoréductase (Davydov et al., 2000).

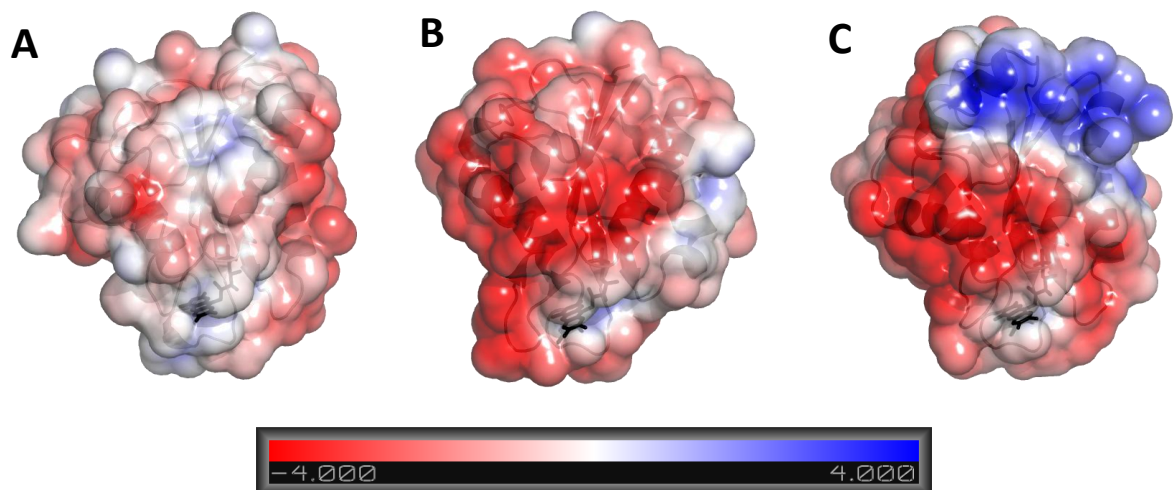
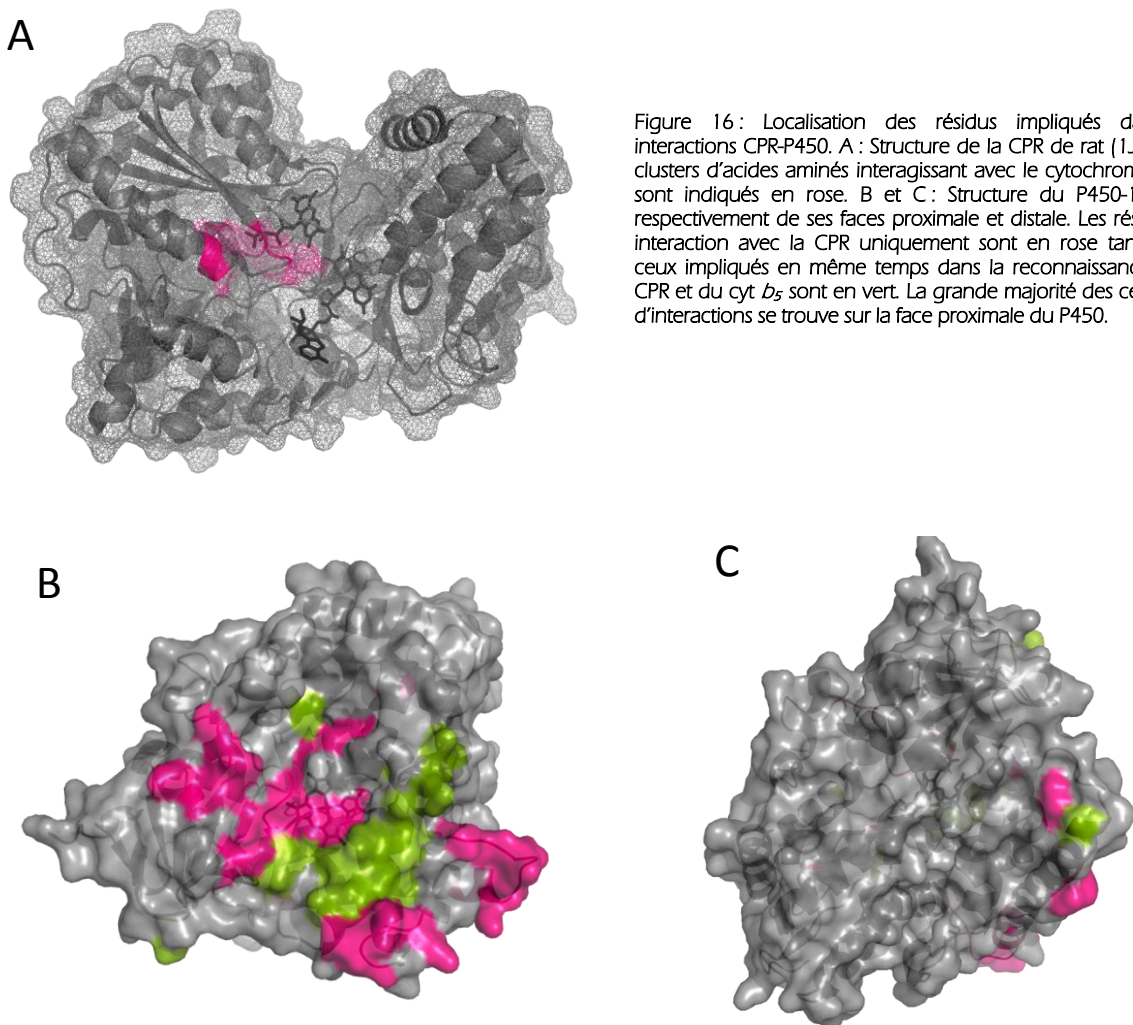


Figure 15 : Potentiels de charges à la surface du domaine FMN du P450-BM3 (A., 1BVY), de la flavodoxine de *D. vulgaris* (B., 1J8Q) et du domaine FMN de la CPR humaine (C., 1B1C). (Sevrioukova et al., 1999b)

Globalement, la conservation des caractéristiques de surfaces entre les acteurs des systèmes P450 assure une préservation de la voie de transferts des électrons de l'oxydoréductase vers la P450 via le transporteur. Le premier et le dernier composant de cette chaîne étant de même nature électrostatique, les interactions potentielles à leurs surfaces sont répulsives, et empêchent un transfert direct de l'oxydoréductase au P450. D'autres parts, la forme globale des différents partenaires permet également une reconnaissance au travers de leur géométrie de surface. Ces caractéristiques diminuent le risque de court-circuitage du transporteur qui aurait des conséquences néfastes pour la cellule en engendrant le découplage des cycles du P450.

De très nombreuses études ont par ailleurs mis en évidence, voir même le caractère indispensable, de certains clusters d'acides aminés chargés autour des cofacteurs par lesquels

transitent les électrons. Ces résidus contrôlent la voie de transfert d'électrons entre les composants (Churbanova et al., 2010; Shen et al., 1989) (**Figure 16 A**). Le rôle de deux clusters spécifiques à la surface du domaine FMN de la CPR impliqués dans des interactions électrostatiques avec d'autres partenaires a pu être identifié par mutagenèse dirigée. Il s'agit des acides aminés ²⁰⁷Asp-Asp-Asp²⁰⁹ et ²¹³Glu-Glu-Asp²¹⁵ autorisant la reconnaissance du cytochrome P450 ou encore du cytochrome *c* (cyt *c*), un accepteur artificiel utilisé comme référence de mesure de l'activité de la CPR. Mais tandis que la substitution du premier groupement de résidus n'affecte que l'activité P450 réductase, les mutations du second cluster n'ont d'impact que sur l'activité cyt *c* réductase. Il semblerait donc que les deux cytochromes, tous deux pourtant réduits par la CPR de façon analogue, ne mettent pas en jeu les mêmes résidus au niveau de la surface de la CPR (Shen and Kasper, 1995).



De la même façon, la mutation ou la modification chimique de résidus à la surface d'autres composants des systèmes P450 ont révélé leurs rôles dans la reconnaissance des différentes protéines entre elles. Ainsi les résidus Asp53, Glu44 et Glu56 du cyt *b*₅ sont nécessaires à l'efficacité des transferts vers des accepteurs finaux, tels que le cyt *c*, et leurs mutations en acides aminés neutres déstabilisent fortement le complexe entre ces partenaires rédox (Gao et al., 2006; Qian et al., 1998; Sun et al., 1999). D'autre part Hlavica et al. ont inventorié en 2003 l'ensemble des acides aminés de différents P450 jouant un rôle dans la reconnaissance entre ceux-ci, la CPR et/ou la cyt *b*₅. Les résultats concernant la CPR sont décrits dans le Tableau 19 en annexe (Hlavica et al., 2003). La

majorité de ces résidus sont chargés positivement (Lys, Arg...) et complètent donc parfaitement les clusters acides (Asp et Glu) négatifs à la surface du domaine FMN de la CPR. Ces interactions sont principalement situées sur la face proximale du cytochrome (**Figure 16 B et C**) qui correspond donc probablement à la zone d'arrivée des électrons vers l'hème. Enfin une quantité non négligeable de ces résidus est également impliquée dans la reconnaissance du cyt b_5 rendant *a priori* impossible la formation d'un hétérocomplexe trimère.

Les interactions électrostatiques jouent donc un rôle primordial dans la reconnaissance des partenaires rédox. Ce mode d'interaction, également nommé association de charges complémentaires, peut être caractérisé en suivant l'influence de la force ionique sur l'activité catalytique du système. La diminution de l'activité à haute concentration saline correspond alors à la dissociation d'interactions électrostatiques entre partenaires. Mais, dans le cas des transferts d'électrons (TE), l'augmentation modérée de la concentration en ions à basse force ionique est corrélée à une accélération du TE due au caractère en plus conducteur du milieu, sans que la déstabilisation du complexe protéique ne soit encore notable (inférieure à quelques centaines de mM). L'influence de la force ionique sur l'efficacité de transfert résulte donc de l'association de deux phénomènes opposés : l'accélération du TE dans un milieu conducteur (augmentation du k_{cat}) et la dissociation des interactions électrostatiques à forte concentration saline (diminution du K_m). La courbe de l'activité en fonction de la conductivité qui en découle présente une forme une cloche (**Figure 17**) où le premier processus est prédominant à basse conductivité, tandis que le second devient majoritaire lorsque la conductivité dépasse les $10 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ (Smith et al., 1994; Voznesensky and Schenkman, 1992).

La notion d'un complexe bi- ou tri-protéique rassemblant les différents partenaires rédox et correspondant à la configuration active d'un système P450 peut s'avérer erronée ou trop stricte lorsqu'il s'agit de TE. Par exemple, la structure du domaine monooxygénase du P450-BM3 co-cristallisé avec le domaine FMN (transporteur) de la partie réductase révèle assez peu d'interactions entre les deux partenaires. On retrouve deux liaisons hydrogènes directes, un pont salin, et quelques contacts à travers des molécules d'eau. La présence de si peu de contacts spécifiques sur une surface d'interactions de 967 \AA^2 indique que les interactions entre les domaines transporteur et accepteur ne sont pas très fortes (Sevrioukova et al., 1999b). Or, la reconnaissance entre protéines partenaires et la formation de complexes actifs mettent généralement en jeu des interactions souvent très spécifiques et de nature multiple (hydrophobe, électrostatique, géométrique...etc.). Mais, bien qu'ils présentent de telles interactions, les composants des systèmes P450 ont aussi la particularité de catalyser des TE. Pour cela, le positionnement exact des différents partenaires n'est pas obligatoirement nécessaire au transfert. Par ailleurs, les constantes de vitesse associées aux TE sont bien supérieures à celles correspondant à des réactions chimiques classiques. Des interactions trop fortes et trop stables entre deux composants risqueraient alors de ralentir la constante catalytique de l'ensemble en empêchant la dissociation du complexe post-transfert correspondant au donneur oxydé et à l'accepteur réduit. Ainsi, le TE est moins contraignant quant à la géométrie prérequis des différents acteurs qui ne forment pas nécessairement un véritable complexe stable mais peuvent simplement se « rencontrer ». Les TE restent donc compatibles avec des modes d'associations assez souples (Janin and Wodak, 2002).

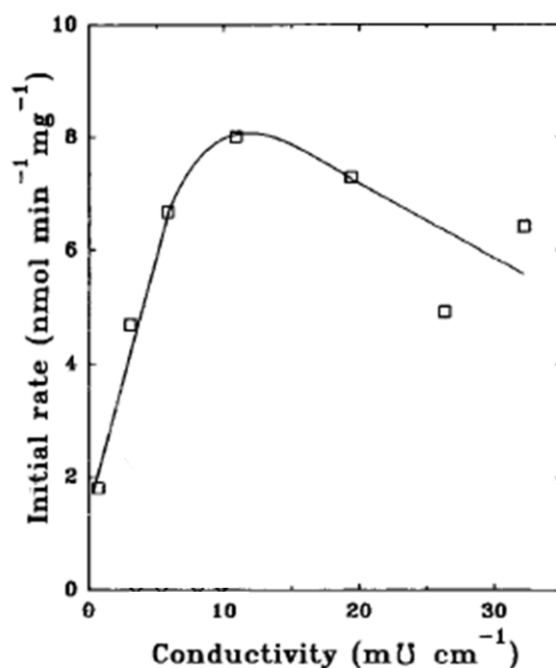


Figure 17: Influence de la conductivité (ou force ionique) sur le taux initial de benzophetamine N-déméthylation catalysée par le cytochrome P450-LM2 dans des microsomes de foie de rat. La conductivité varie en fonction de la concentration en phosphate de sodium dans le tampon de réaction (1 à 400 mM).

3.2.2. Interactions membranaires

De nombreux systèmes P450 contiennent plusieurs protéines membranaires. Si les interactions entre partenaires n'ont lieu que de façon stochastique, au gré des collisions, l'ancrage des différents composants à une membrane présente au moins l'avantage de restreindre l'espace de liberté des protéines à deux dimensions. Par ailleurs, chez les systèmes de classe II, le ratio physiologique P450 :CPR est largement supérieur à l'unité. En effet, chez les mammifères, on observe une molécule de CPR pour 10 à 20 molécules de P450. Une même CPR est donc capable de fournir en électrons non seulement à un grand nombre d'isoenzymes P450, mais aussi à d'autres accepteurs ancrés à la membrane du réticulum tels que l'hème oxygénase, la squalène oxygénase ou encore le cyt *b*₅. Ces derniers accepteurs accentuent donc la disparité stœchiométrique entre la CPR et les protéines qu'elle doit fournir en électrons. De plus, certains P450 ont une affinité particulière pour la CPR. Les électrons devraient donc logiquement leur être fournis de façon préférentielle ; privant alors les P450 moins affins et les rendant métaboliquement silencieux. Ces constatations conduisent à l'hypothèse de la formation de clusters ou radeaux aux seins desquels des accepteurs se rassembleraient autour de la CPR. Ces clusters à la surface des membranes seraient alors en équilibre dynamique avec des composants libres de diffuser (Jamakhandi et al., 2007; Omura, 2010).

Plusieurs études mettent en évidence l'existence de tels phénomènes d'oligomérisation. L'analyse de la cinétique des TE *in vitro* a permis une première caractérisation de la formation d'oligomères. Ainsi le transfert du premier électron de la CPR au P450 est généralement considéré comme rapide mais présente systématiquement une cinétique biphasique (Backes and Eyer, 1989; Oprian et al., 1979). Au moins deux processus sont donc mis en jeu lors de ce TE. Une explication de ce phénomène biphasique consisterait alors à associer la phase rapide à la réduction des P450 au

voisinage d'une CPR dans un cluster (50 à 70 % des cytochromes), tandis que la seconde phase caractériserait le TE vers des P450 plus éloignés ou hors du cluster (Backes and Kelley, 2003). Mais cette hypothèse semble difficilement compatible avec la persistance d'une cinétique biphasique dans les tests *in vitro* ou la CPR est en excès par rapport au P450. Quoiqu'il en soit, de tels regroupements de P450 autour de CPR ont également pu être caractérisés *in vivo* via des techniques de complémentation de fluorescence (Ozalp et al., 2005) ou de FRET (Szczesna-Skorupa et al., 2003) (Figure 18).

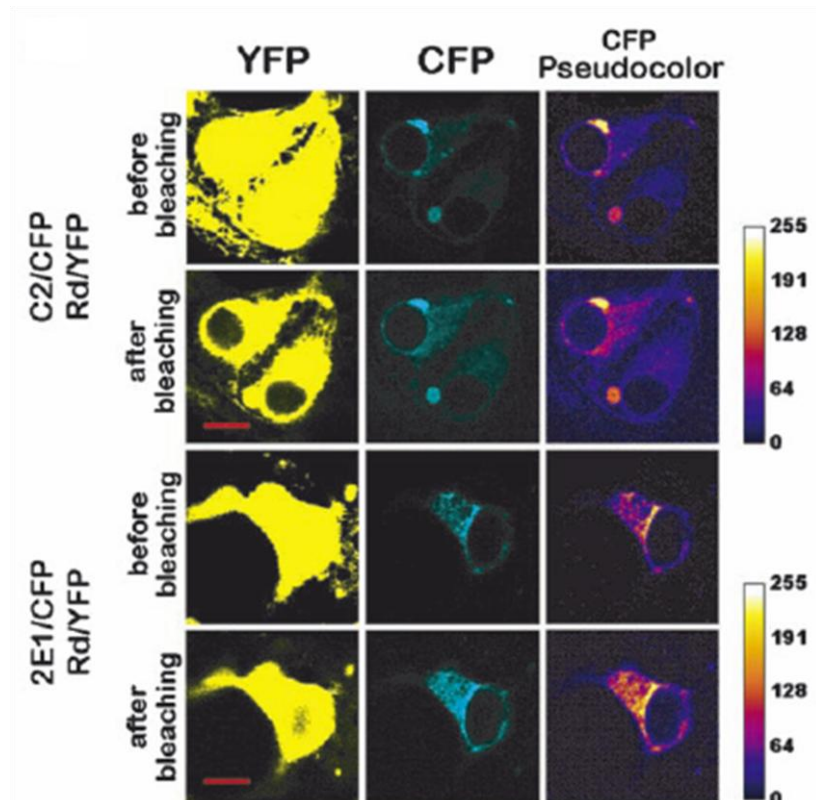


Figure 18 : Détection du FRET entre la CPR et les cytochromes P450 2C2 et 2E1 par photoblanchiment accéléré dans des cellules transfectées. Des cellules COS1 ont été co-transfectées par les vecteurs d'expression pour la fusion CPR-YFP et soit P450 2C2-CFP, soit P450 2E1-CFP. Les images des cellules ont été prises à travers les canaux YFP et CFP, avant et après photoblanchiment de l'accepteur YFP avec un laser à 514 nm pendant 2 min. Des conditions optiques similaires ont été utilisées pour collecter les données YFP et CFP, conduisant à la saturation substantielle des images YFP due à l'augmentation de fluorescence intrinsèque de YFP. Pour une meilleure visualisation de la différence de fluorescence CFP, les images CFP pré- et post-photoblanchiment sont aussi présentées en pseudocoloration (Szczesna-Skorupa et al., 2003).

L'importance des interactions membranaires lors de la reconnaissance et de la formation d'un complexe actif entre les composants transporteurs et des cytochromes P450 a initialement été suggérée par l'absence d'activité réductase lors de l'utilisation de CPR tronquées de leur partie N-terminale membranaire. Non seulement les formes solubles de la CPR semblaient inactives vis-à-vis de leurs accepteurs naturels (elles réduisent uniquement les accepteurs artificiels solubles tels que le cyt c ou le ferricyanure), mais le fragment hydrophobe de la CPR est capable d'inhiber l'association de CPR natives avec des P450 (Black and Coon, 1982). Pourtant des études récentes ont montré que, bien que jouant un rôle majeur dans la reconnaissance avec ses accepteurs, la partie membranaire de la CPR n'est pas pour autant nécessaire à l'observation d'un transfert électronique (Estabrook et al., 1996; Higashimoto et al., 2008; Huber Iii et al., 2009; Huber and Backes, 2007).

3.2.3. *L'influence du cyt b_5 et allostérie des P450*

Dès 1979, le cyt b_5 est identifié comme un accepteur de la CPR (Enoch and Strittmatter, 1979). A nouveau, les parties membranaires des deux protéines, sans être indispensables, ont un impact significatif sur la qualité de leur reconnaissance. Bien que le cyt b_5 soit capable de stimuler le TE dans des tests d'activité contenant de la CPR et des P450, l'origine exacte de allostérie reste très débattue.

En effet, le cyt b_5 est en mesure de fournir le deuxième électron du cycle catalytique des P450 microsomaux, secondant ainsi la CPR (Canova-Davis and Waskell, 1984; Noshiro et al., 1981). Mais le TE vers le P450-3A4 est également accéléré lors de la simple addition d'apo-cyt b_5 (Yamazaki et al., 1996). Ce résultat est d'autant plus étonnant que la structure de l'apo-cyt b_5 est très différent et beaucoup plus désordonnée que celle du cyt b_5 natif (Falzone et al., 1996). L'apo-cyt b_5 faciliterait pourtant le TE par simple complexation aux P450, induisant un changement potentiel conformationnel favorable à la réduction par la CPR, sans qu'il n'y ait pour autant de transfert du cyt b_5 au P450. Mais d'autres études révèlent une compétition entre la CPR et le cyt b_5 . Ainsi, l'augmentation du ratio cyt b_5 versus CPR dans les tests d'activité P450-2B4 conduit à l'inhibition de l'activité réductase (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2007). Ces deux derniers résultats sont contradictoires, car si les deux partenaires du P450 partagent le même site d'interaction à la surface du cytochrome, l'apo-cyt b_5 devrait également inhiber l'activité de la CPR. Finalement, un effet certain du cyt b_5 est de favoriser l'oxydation du substrat par l'espèce ferryl-oxo par rapport à la voie abortive de réduction de l'eau, diminuant ainsi des fuites dans le cycle catalytique du P450-3A4 (Perret and Pompon, 1998).

Par ailleurs, des études sur la composition en CPR, cyt b_5 et P450 de microsomes de foies humains, en fonction du sexe et de l'âge, révèlent une diminution de l'expression des deux transporteurs électroniques avec le temps et une variation importante de celles-ci entre individus ; sans pour autant influencer d'une quelconque façon sur l'expression des cytochromes P450 eux-mêmes (Gan et al., 2009).

3.2.4. *Les interactions entre cytochromes P450*

L'abondance physiologique des cytochromes P450, comparée à la rareté de la CPR, pose la question des interactions éventuelles entre P450 et de leur mise en compétition. Des travaux sur la mobilité rotationnelle des P450 au niveau de la membrane établissent l'existence d'une portion de P450 statiques ou immobilisés due très probablement à la formation d'agrégats. De façon intéressante, le degré d'immobilisation de ces P450 diminue lors de l'addition de CPR ou de cyt b_5 . Les deux partenaires redox sont donc à même de dissocier ces agrégats membranaires de P450 (Backes and Kelley, 2003).

La présence d'un P450 peut également influencer les caractéristiques catalytiques d'un autre P450 via la formation de complexes hétéromériques d'isoenzymes. Ainsi les P450 1A2 et 2B4 s'associent via des interactions électrostatiques dont la stabilité dépend fortement de la nature et de la concentration du substrat (Kelley et al., 2005; Reed et al., 2010).

La complexité des systèmes, ainsi que la variabilité des taux d'expression des différents cytochromes et partenaires redox, font de chaque type de cellules et de chaque organisme un cas

particulier. Si les mesures effectuées sur des extraits microsomaux reflètent de très près les conditions *in vivo*, elles sont difficilement interprétables quant au rôle des différents acteurs impliqués tant les paramètres (natures et stœchiométrie des partenaires, composition lipidique des membranes...) sont nombreux et variables. Il est donc très difficile d'expertiser précisément, et encore plus de reconstituer les conditions physiologiques d'activité de tel ou tel système. Mais les mesures d'activité *in vitro* à partir de protéines purifiées permettent tout de même de comparer différents résultats tout en contrôlant et mesurant l'influence d'un facteur particulier (concentration d'un composant, nature des lipides formant la pseudo-membrane...).

3.3. Les fusions dans les systèmes P450

Plusieurs classes de systèmes P450 présentent des cas de fusion entre composants. Pour les classes II et IV, la fusion concerne l'oxydoréductase et le transporteur ; tandis que pour les classes V et VI, le transporteur est relié au cytochrome. Enfin, les classes VII et VIII correspondent à des systèmes où l'ensemble des composants oxydoréductase, transporteur et cytochrome s'associent en une unique macroprotéine multidomaine. On peut alors s'intéresser sur les avantages pour l'organisme hôte de telles fusions au sein de complexes multiprotéiques pourtant fonctionnels à l'état fragmenté.

La première raison possible est l'amélioration de l'efficacité catalytique, que ce soit en termes de rapidité (k_{cat}) ou d'efficacité (limiter les fuites conduisant à la réduction non spécifique du dioxygène). Cette hypothèse est vérifiée chez le P450-BM3 qui possède la constante catalytique la plus rapide de tous les systèmes P450, atteignant $\sim 280 \text{ s}^{-1}$. Ceci correspond à un k_{cat} au moins deux ordres de grandeur au-dessus des vitesses observées pour des cytochromes eucaryotes du métabolisme des acides gras (CYP4). Par contre, de façon assez logique, l'affinité (K_D) pour les substrats reste identique chez les systèmes fusionnés ou fragmentés.

Le P450-BM3 est non seulement un système exceptionnellement rapide mais il est également particulièrement bien couplé. Ainsi la constante cinétique exceptionnelle du transfert FMN vers hème reflète bien la vitesse catalytique élevée de cet enzyme en atteignant les 223 s^{-1} . Ce transfert constitue généralement l'étape cinétiquement déterminante (ECD) du cycle et est invariablement plus lent pour les systèmes de classe I et II. En effet, la fréquence des interactions, c'est-à-dire des collisions productives est bien plus faible chez ces derniers, que ce soit au niveau des membranes que dans le cytosol. De plus, la reconstitution du système P450-BM3 à partir du domaine monooxygénase et de la partie responsable du transport des électrons disséqués ne permet absolument pas de retrouver l'activité du système unitaire natif, soulignant donc l'importance de la fusion, et plus particulièrement du linker reliant le domaine FMN au domaine cytochrome (Munro et al., 2007; Murataliev et al., 2004).

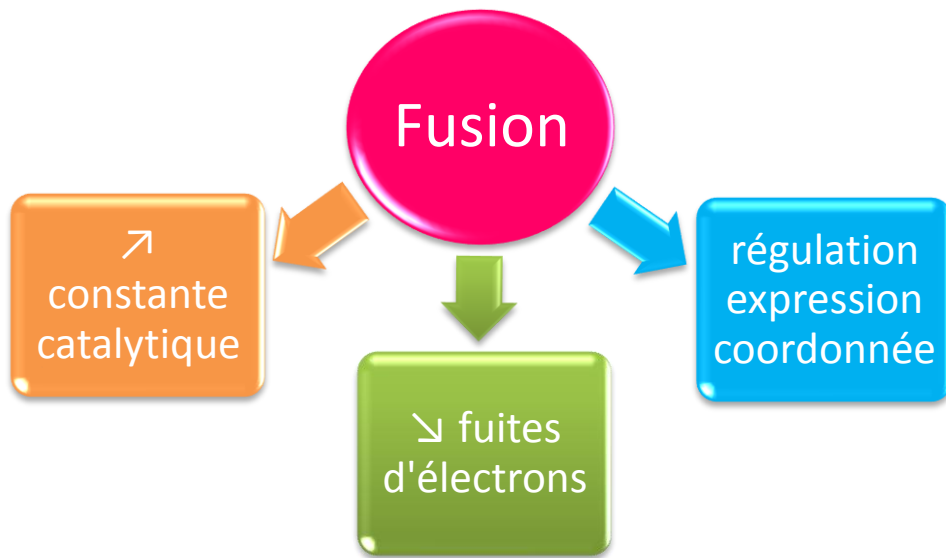
Concernant le tout premier TE de l'oxydoréductase au transporteur, la fusion de ces deux composants devraient favoriser de façon similaire les systèmes de classe II (CPR/P450) et ceux de classe VIII (P450-BM3) en comparaison à d'autres systèmes dissociés. Des tests d'activités P450 ont été réalisés avec le P450-C17 et soit la CPR de rat soit les protéines dissociées analogues, une flavodoxine et une ferrédoxine réductase bactériennes (Wang et al., 1997). Avec le système dissocié, l'activité catalytique maximum n'est atteinte qu'en utilisant un très large excès (50 à 100 fois supérieur au P450-C17) du ratio équimolaire des deux protéines, et la vitesse reste toujours un ordre

de grandeur inférieur à celui obtenu en présence de CPR (Jenkins and Waterman, 1998). De plus, l'activité réductase reconstituée à partir des deux domaines catalytiques disséqués de la CPR (domaine FMN et FAD) n'atteint que 2 % de l'activité native (Smith et al., 1994). Des résultats équivalents sont obtenus avec la partie réductase disséquée du P450-BM3 (Peterson et al., 1997; Sevrioukova et al., 1996b), soulignant à nouveau l'importance de la fusion et le rôle probablement primordial des domaines de connexion. Mais si la fusion oxydoréductase-transporteur s'avère réellement avantageuse, tous les systèmes de classe II et VIII n'en sont pas pour autant équivalents. En effet, l'activité cyt *c* réductase du P450-BM3 est de l'ordre de 100 à 150 s⁻¹, celle de CPR microsomaux mammifères varie de 50 à 80 s⁻¹, tandis que les CPR issus de la levure ou de plantes peuvent atteindre 200 s⁻¹ (Murataliev et al., 2004; Sevrioukova and Peterson, 1995).

L'obligation d'un apport diélectronique temporellement distinct est commune à tous les cytochromes P450 et nécessite la dissociation du complexe cytochrome-transporteur afin de permettre à ce dernier de chercher le second électron au niveau de l'oxydoréductase. Ce phénomène offre inévitablement une voie de découplage si le transporteur monoélectronique réduit ne rallie pas à nouveau le cytochrome avant que le composé oxy-ferreux de ce dernier ne se dissocie. La fusion des composants, en augmentant fortement la probabilité et la rapidité des TE, diminue le risque de fuites électroniques au sein des systèmes P450. Il faut cependant noter que cette dernière voie abortive dépend aussi de la nature du substrat pouvant être à même de stabiliser l'espèce oxy-ferreux (Munro et al., 2007).

Comme pour toutes les protéines multidomaines, une raison probable de la fusion de composants P450 provient des avantages associés à la régulation de leur expression et de leur coordination. Dans certains systèmes de classe I, comme celui du P450cam, la transcription des différents gènes codant pour les trois protéines est clairement coordonnée. Mais ce cas n'est pas généralisable. Ainsi pour les systèmes eucaryotes de classe II, l'unique CPR interagit avec de nombreux isoenzymes et autres accepteurs. Son expression ne saurait donc être coordonnée avec un P450 particulier. Dans le cas du P450-BM3, bien que son rôle physiologique reste encore incertain, il est probablement important pour *Bacillus megaterium* de pouvoir réguler précisément l'expression d'un système hautement actif lorsque par exemple la densité cellulaire est élevée, ou que les ressources en oxygène ou nutriments se raréfient, ou enfin lors de rapides changements environnementaux (Munro et al., 2007). La fusion est alors clairement avantageuse au regard de systèmes nécessitant la coordination de l'expression de deux ou trois gènes distincts. Enfin, elle assure surtout l'exclusivité des transferts électroniques vers un cytochrome précis, contrairement aux autres systèmes plus dissociés où les transporteurs interagissent avec de nombreux accepteurs.

En conclusion, la fusion des partenaires rédox dans les systèmes P450 présentent trois avantages majeurs : l'augmentation de la constante catalytique générale lorsque le TE est limitant, la diminution des fuites électroniques conduisant à la production d'espèces oxygénées réactives, et la régulation commune de l'expression des différents composants fusionnés.



4. La NADPH-cytochrome P450 réductase (CPR)

Les recherches effectuées durant ma thèse se sont focalisées sur la NADPH-cytochrome P450 réductase (CPR) car cette protéine multidomaine constitue le principal système de transport d'électrons aux cytochromes P450 eucaryotes.

4.1. Découverte de la CPR

Dès 1950, Horecker isole à partir de foie de porc hydrolysé par la trypsine, une enzyme capable de catalyser la réduction du cyt *c* et contenant du FAD (Horecker, 1950). Il la nomme alors la triphosphopyridine nucléotide cytochrome *c* réductase. Par la suite, Williams, Kamin, Philips et Langdon caractérisent une protéine d'une masse molaire de 68 kDa issues respectivement de foies de porc et de rat et capable de transférer des électrons à des accepteurs mono- ou biélectroniques comme le cyt *c*. et le ferricyanure, ou le dichlorophénolindophénol (Philips and Langdon, 1962; Williams and Kamin, 1962). L'activité cyt *c* réductase est corrélée à la concentration en KCl, elle disparaît lors du traitement au sulfate d'ammonium, mais est retrouvée lors de l'ajout de FMN. La stœchiométrie du cofacteur FAD semble être de 2 moles par mole d'enzyme (Kamin et al., 1965; Masters et al., 1965). Cependant le rôle réel de l'enzyme reste encore inconnu. En effet, les procédures de solubilisations utilisées à cette époque ne permettent pas de conserver les propriétés physiologiques de la protéine...

ANNÉE	AGENTS DE SOLUBILISATION	MASSE MOLAIRE (kDa)	GROUPES PROSTHÉTIQUES	RÉDUCTION D'ACCEPTEURS ARTIFICIELS	RÉDUCTION DE CYTOCHROMES P450
1962	Trypsine	68	FAD	✓	X
1962	Stéapsine	68	FAD	✓	X
1973	Bromolaïne	71	—	✓	X
1974	Déoxycholate Cholate	79	FAD ou FAD/FMN ?	✓	✓
1975	Rénex Triton	79	FAD/FMN	✓	✓

Durant les années soixante, les fonctions physiologique de la cyt *c* réductase sont de mieux en mieux cernées. Son addition sur des foies de lapin inhibe les oxydations de médicaments NADPH-dépendantes (Gillette, 1966) et son activité est liée à l'hydroxylation des médicaments par les microsomes (Ernster and Orrenius, 1965; Jick and Shuster, 1966). Grâce à l'optimisation du protocole de purification de l'enzyme, des études d'immunologie confirment ces dernières hypothèses. En effet des anticorps inhibant fortement l'activité cyt *c* reductase de microsomes hépatiques, bloquent également l'hydroxylation d'acides gras et d'autres substrats types du système de métabolisation des

médicaments (Glazer et al., 1971; Masters et al., 1971; Wada et al., 1968). Pourtant aucune étude à partir de cytochrome *c* réductase solubilisée ne révèle une activité cytochrome P450 dépendante.

C'est en 1973 que Welton & al. isolent une protéine de plus grande taille (71 kDa) grâce à un protocole différent, préférant l'utilisation de détergents à celles de lipase ou trypsine (Welton et al., 1973). Par la suite, les techniques d'isolement et de purification, grandement améliorées par le développement des colonnes d'affinité, autorisent enfin la solubilisation de la protéine sous sa forme native (79 kDa), contenant une mole de FAD et de FMN par mole d'enzyme (Dignam and Strobel, 1977; Vermilion and Coon, 1978a; Vermilion and Coon, 1978b). La relation entre l'activité de la cytochrome *c* réductase et la réduction de cytochromes P450 par des pyridines nucléotides est enfin prouvée. En 1976, Yasukochi & al. utilisent le terme de « NADPH-cytochrome *c* (cytochrome P450) réductase » avant que l'enzyme ne soit définitivement rebaptisée « NADPH-cytochrome P450 réductase » ou, plus simplement CPR (Yasukochi and Masters, 1976). On sait aujourd'hui que les 8 à 12 kDa manquants lors des premières extractions correspondaient à la partie N-terminale membranaire de l'enzyme qui joue un rôle majeur dans la reconnaissance entre la CPR et les P450 (voir § 3.2.2).

4.2. La CPR, produit de la fusion de gènes ancestraux

La CPR (EC 1.6.2.4) fait partie de la famille assez restreinte des diflavines réductases. Elle constitue à elle seule le système principal de transport d'électrons vers tous les P450 eucaryotes. L'ensemble CPR plus P450 correspond à la classe II des systèmes P450 (voir § 3.1). La CPR est très certainement le produit de la fusion de deux gènes ancestraux, l'un codant pour une ferrédoxine réductase correspondant au domaine FAD (composant oxydoréducteur), et l'autre codant pour une flavodoxine et correspondant au domaine FMN (composant transporteur). Cette affiliation est non seulement détectable par des analyses de phylogénèse (Porter et al., 1990; Porter and Kasper, 1986) (**Figure 20**), mais elle est aussi clairement visible lors de la comparaison des structures de ces différentes protéines (**Figure 19**) (Wang et al., 1997; Zhao et al., 1999).

Chez les eucaryotes supérieurs, seule la CPR et quelques protéines analogues présentent un domaine de type flavodoxine. En effet, si les flavodoxines sont largement distribuées à l'état de protéines indépendantes chez les bactéries et exceptionnellement chez quelques algues monocellulaires eucaryotes, on ne retrouve leurs gènes que sous la forme de fusion encodant pour des protéines multidomaines chez les eucaryotes supérieurs (Sancho, 2006). La CPR pourrait donc potentiellement être le fruit d'une fusion inter-royaume entre un gène Fldx bactérien (probablement introduit dans les cellules eucaryotes via les mitochondries) et un gène FdR préexistants (Wolf et al., 1999; Wolf et al., 2000).

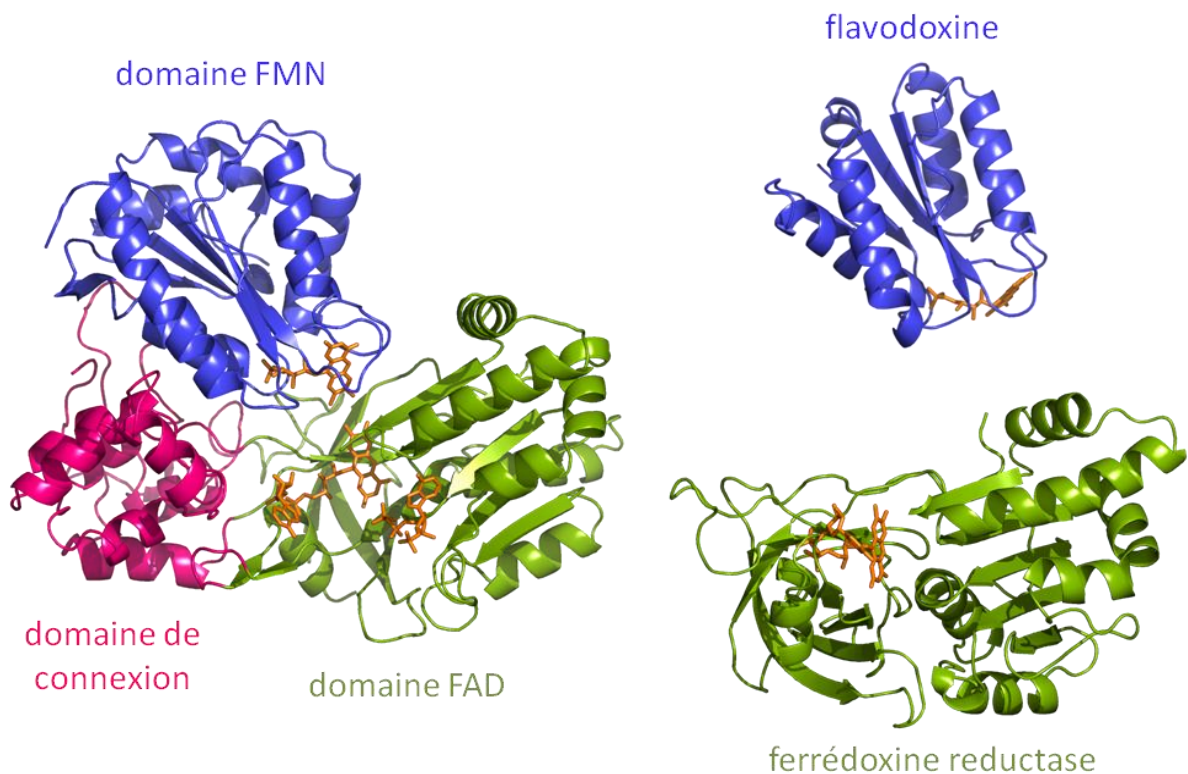


Figure 19: Comparaison de la structure cristallographique de la CPR de rat (Wang et al., 1997) (à gauche), et des repliements typiques des flavodoxines et des ferrédoxines réductases (à droite). Les domaines FAD et FMN de la CPR sont respectivement analogues à une flavodoxine (bleu) et une ferrédoxine réductase (vert). Les cofacteurs flaviniques sont de couleur orange, tandis que le domaine de connexion reliant les deux domaines catalytiques de la CPR est de couleur rose.

	50	60	70	80	89	99		
FdR	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -		
CPR	K N N Y L V L Y A S	Q T G T A E D Y A K	K F S K E L V A K F	N - L N V M C A D V	E N Y D F E S L N D	V P V I V S I F I S		
Fld	S K K V L I L F G S	S T G N T E S I A Q	K L E E L V A A G G	H E V T L L N A A E	A S A D - - N L A D	G Y D A V L M G C S		
	109	119	129	139	149	159		
FdR	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -		
CPR	T Y G E G D F P D G	A V N F E D F I C N	A E A G A L S N L R	Y N M F G L G N S T	Y E F F N G A A K K	A E K H L S A A G A		
Fld	A W G M E D L E L Q	D - D F A P L F D E	M E N M G L K G K K	L A A F A S G D M E	Y E H Y C G A V P A	I E E K A R G L G A		
	169	172	177	187	197	240	246	256
FdR	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	M T Q A K A	K H A D V P V N L Y	R P N A P F I G K V
CPR	I R L - - G K L G E	A D D G A G T T D E	D Y M A W K D S I L	E V L S H Q L N R	N A D G I Q L G P F	- - - - -	- - - - -	D L S Q P Y I A P I
Fld	E V I C E G L K I E	G D A S S D - - P D	A V S A F A E D V L	K K L - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
	266	276	285	295	305	352	360	
FdR	I S N E P L V K E G	G I G I V Q H I K F	D L T G G N L K Y I	E G Q S I G I I P P	G V D K N G K P E	- - - - -	K L R L Y S I A S T	
CPR	V K S R E L F S S N	D R N C I - H S E F	D L S G S N I K Y S	T G D H L A V W P S	N L E I T G P V S	- - - - -	R Q L F S S L I Q F	
Fld	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	
	370	445	455	465	475	495	496	516
FdR	R H G D D V D D K	T I S L C V R Q L E	Y K H P E - - S G E	T V Y G V C S T Y L	T H I E P G S E	V K I T G P V G	K E	- - - - -
CPR	A P N A D V K E K	T V H V T S I V E N	F P N P E L P D A P	P V V G V T T N L L	R N I Q L A Q N	Y D L N G P R K	S N	- - - - -
Fld	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
	518	528	538	548	558	568		
FdR	M L L P D D P E A N	V I M L A T G T G I	A P M R T Y L W R M	F K D A E - R A A N	P E Y Q F K G F S W	L V F G V P T T P N		
CPR	F R L P S N P S T P	V I M I G P G T G V	A P F R G F I R E R	V A F L E S Q K K G	G N N V S L G K H I	L F Y G S R N T D D		
Fld	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -		
	578	588	598	605	615	625		
FdR	I L Y K E E L E E I	Q Q K Y P D N F R L	T Y A I S R E Q K N	P Q G G R M Y I Q D	R V A E H A D Q L W	Q L I K N Q K T H T		
CPR	F L Y Q D E W P E Y	A K K L D G S F E M	V V A H S R L - - -	P N T K K V Y V Q D	K L K D Y E D Q V F	E M I N N G A F I Y		
Fld	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -		
	635	645	655	665	675	683		
FdR	Y I C G L R G M E E	G I D A A L S A A A	A K E G V T W S D Y	Q - - - - K D L K K	A G R W H V E T Y	- - - - -		
CPR	V C G D A K G M A K	G V S T A L V G I L	S R G K S I T T D E	A T E L I K M L K T	S G R Y Q E D V W	- - - - -		
Fld	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -		

Figure 20: Alignements des séquences de la CPR de *S. cerevisiae* (vert), de la ferrédoxine réductase (FdR) de *Anabaena sp.* (mauve), et de la flavodoxine (Fldx) de *Pseudomonas aeruginosa* (orange). La numérotation correspond à celle des résidus de la CPR. Entre les résidus 50 et 200, la séquence de la CPR est analogue à celle de la Fldx. Entre les résidus 240 et 683, la séquence de la CPR est analogue à celle de la FdR avec quelques interruptions correspondant principalement au domaine de connexion.

4.3. La structure et les caractéristiques biochimiques de CPR issus d'organismes distants

4.3.1. Les similarités de structure

En 2007, seules deux structures de CPR natives étaient disponibles. Il s'agissait des CPR de rat (Wang et al., 1997) et de levure (Lamb et al., 2006). Par ailleurs plusieurs mutants de ces CPR de rat (W677G, et S457A/C630A/D675N) (Hubbard et al., 2001) ou de levure (D74G/Y75F/K78A) (Yermalitskova, 2006) avaient également été cristallisés. Bien que provenant d'organismes très éloignés et ne présentant que 35 % d'homologie de séquence (Sevrioukova et al., 1996b), ces deux protéines, natives ou mutées, cristallisent dans des conformations extrêmement proches avec une déviation RMS de la position des C α entre les deux chaînes d'acides aminés de 1,811. Dans les deux cas, la densité électronique correspondant à une molécule du cofacteur NADP⁺ a été identifiée, et le positionnement des cofacteurs flaviniques est pratiquement identique (**Figure 21**).

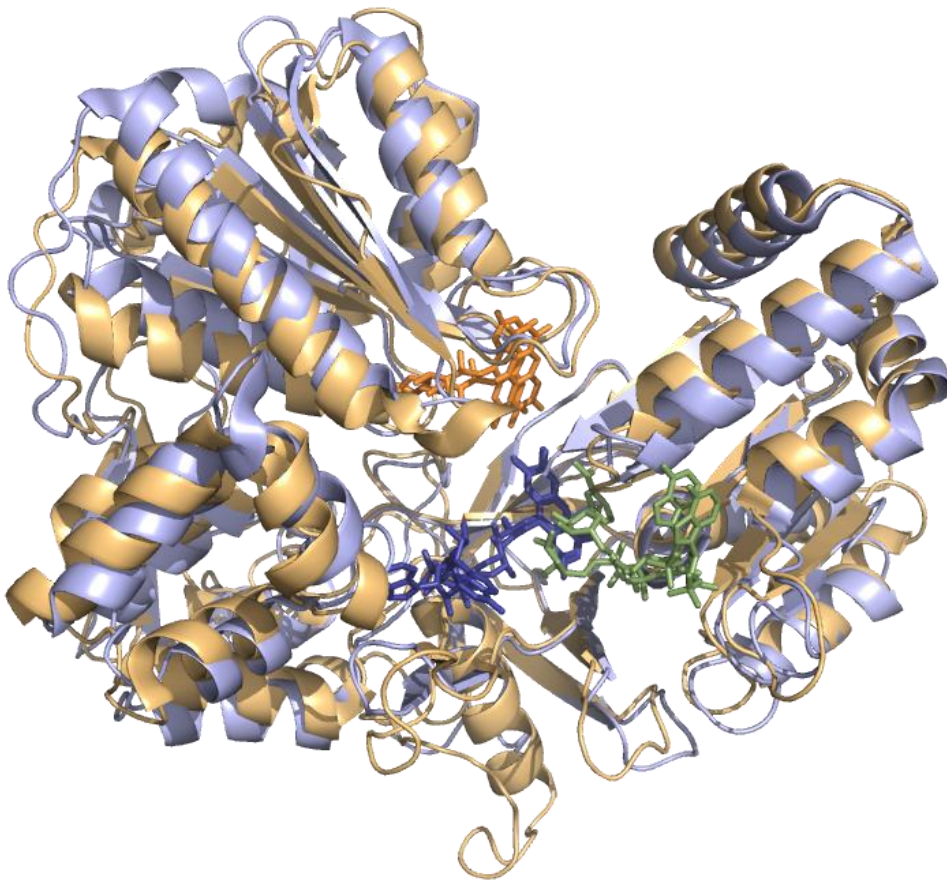


Figure 21: Alignement des structures des CPR de rat (1J9Z) et de levure (2BF4) respectivement en bleu et orange clairs. Les cofacteurs FMN sont représentés en orange, les FAD en bleus, et les molécules de NADP⁺ en vert.

Dans cette conformation, les deux flavines sont très proches et parfaitement alignées, autorisant ainsi un TE interne direct (sans l'intermédiaire d'aucun résidu) du FAD au FMN. En effet la distance entre les groupements méthyles en position C7 et C8 les cycles isoalloxazines (voir la description de la structure des flavines **Figure 24**) est respectivement de 3,5 Å et 4,5 Å. Les deux cycles sont pratiquement plans et forment un angle avoisinant les 150° dans les deux structures (**Figure 22**).

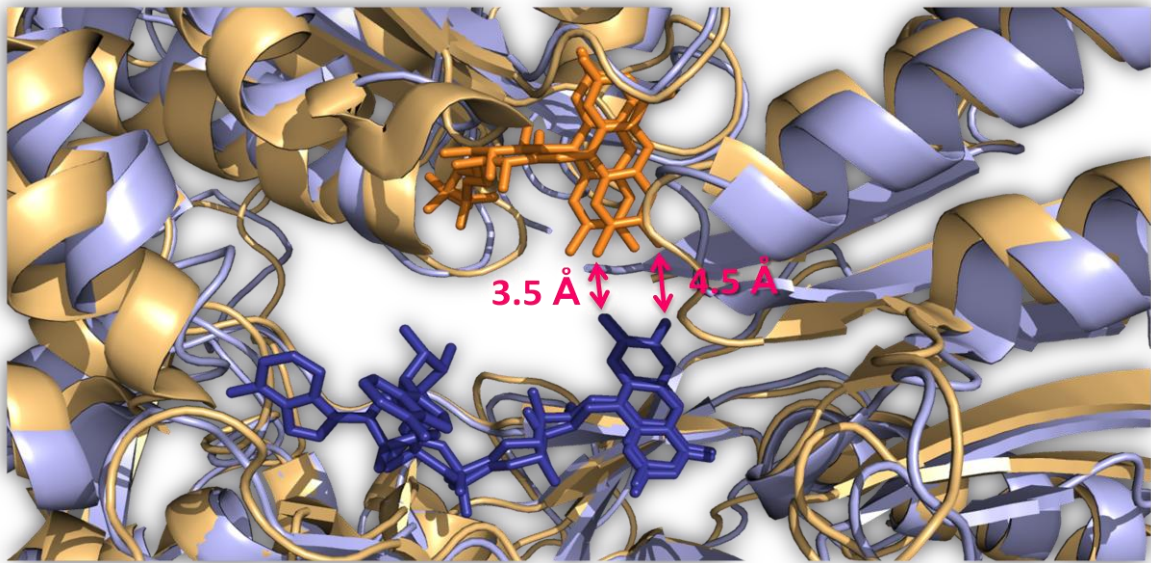


Figure 22: Zoom sur l'alignement des structures des CPR de rat et de levure présenté dans la Figure 21 au niveau des cofacteurs flaviniques FAD et FMN, respectivement en bleu et orange. Les distances entre les groupements méthyles en position C7 et C8 sur les cycles isoalloxazines sont indiquées par des doubles flèches roses.

Alors que cette conformation est compatible avec un transfert interne direct, le transfert externe du FMN vers un accepteur type P450 semble impossible sans un minimum de réorganisation structurale. En effet, toutes les tentatives de modélisations informatiques avec plusieurs structures de P450 révèlent une distance minimale entre la molécule de FMN et le cofacteur hémique des cytochromes supérieure à 20 Å (**Figure 23**). Le FMN est en réalité tellement enfoui au milieu de la protéine que l'approche d'un accepteur potentiel devient impossible. On ne peut donc imaginer un transfert externe du FMN au P450 dans cette conformation. Pour ces raisons, lors de la publication de ces structures cristallographiques, l'hypothèse d'une autre conformation de la CPR a été proposée. Cette forme serait plus « ouverte », en comparaison à la forme très fermée connue jusqu'alors, exposant ainsi le cofacteur FMN au solvant et donc aux accepteurs.

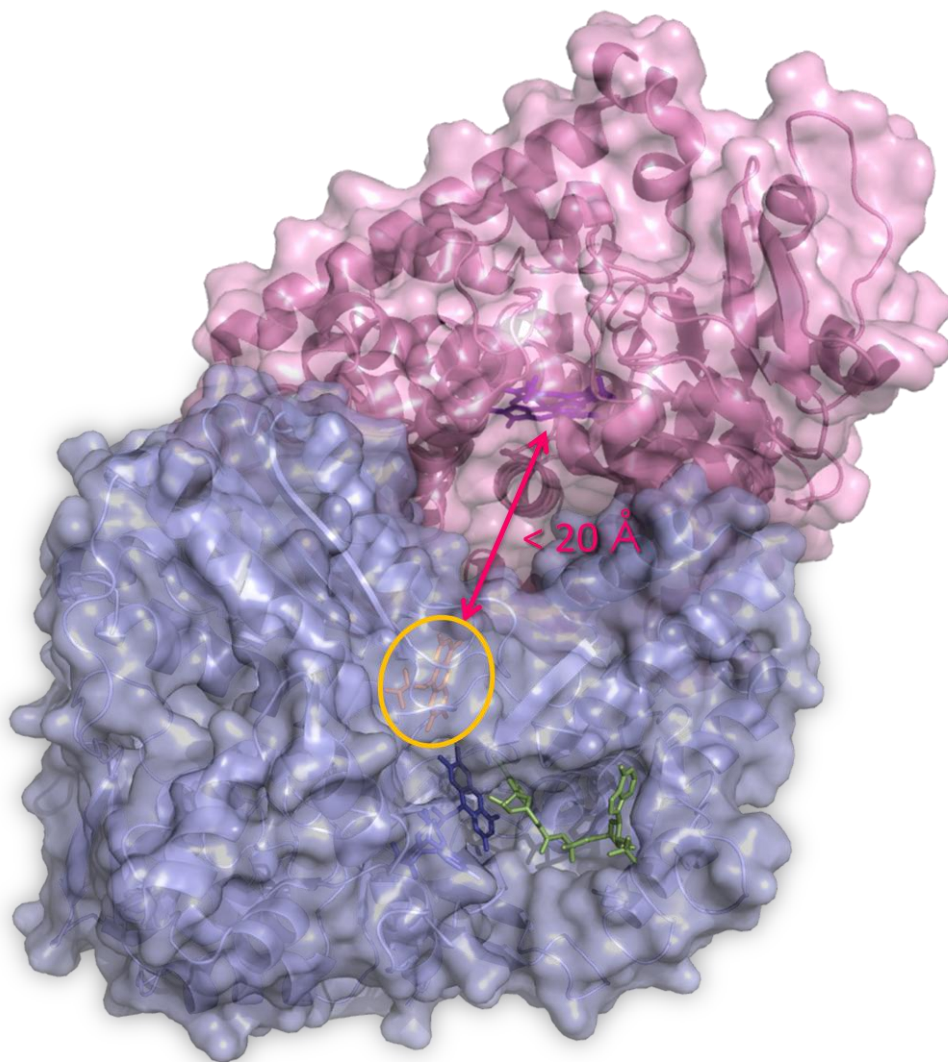


Figure 23 : Représentation de la structure en surface de la CPR de rat (bleu clair) et du P450-3A4 [2H14] (rose clair). Le cofacteur FMN de la CPR, localisé par un cercle orange, est complètement enfoui à l'intérieur de la protéine. Les cofacteurs FAD et NADP⁺, respectivement bleu et vert, sont beaucoup plus accessibles.

4.3.2. La diversité des propriétés biochimiques

4.3.2.1. Les espèces stables

Bien que possédant des structures fortement similaires, les CPR issues d'organismes éloignés présentent des caractéristiques biochimiques hétérogènes et variables. Par exemple, lors de la purification de différentes CPR, la couleur de la solution protéique finale dépend de l'organisme dont la CPR est issue. En effet, l'espèce stable, c'est-à-dire l'état rédox dans lequel se trouve chacune des deux flavines, varie suivant la nature de l'enzyme. Or le FMN et le FAD présentent chacun trois états rédox possibles (**Figure 25** et **Figure 26**) :

- l'état totalement oxydé (FMN ou FAD), de couleur jaune, et dont le spectre présente un maximum d'absorption caractéristique à 455 nm ;
- l'état semiquinone (sq) où la flavine réduite par 1 électron est sous une forme radicalaire. Chez les flavoprotéines, on retrouve deux formes de semiquinones :
 - la semiquinone neutre ou bleue (FMNH[•] ou FADH[•]) dont le spectre d'absorption présente une large bosse autour de 600 nm ;
 - la semiquinone anionique ou rouge (FMN^{•-} ou FAD^{•-}) dont le maximum d'absorption est proche de 490 nm.
- l'état totalement réduit (2 électrons, FMNH₂ ou FADH₂) pratiquement incolore, aussi appelées hydroquinone (hq).

Ainsi la CPR de levure présente un couleur jaune car, lors de sa purification, l'espèce stable comprend les deux flavines dans leur état oxydé. Par contre, les CPR de mammifères sont de couleur verte car la molécule de FAD est totalement oxydée tandis que celle de FMN est sous la forme semiquinone neutre ; la somme des couleurs des deux flavines, jaune plus bleue, donne une couleur verte à la protéine.

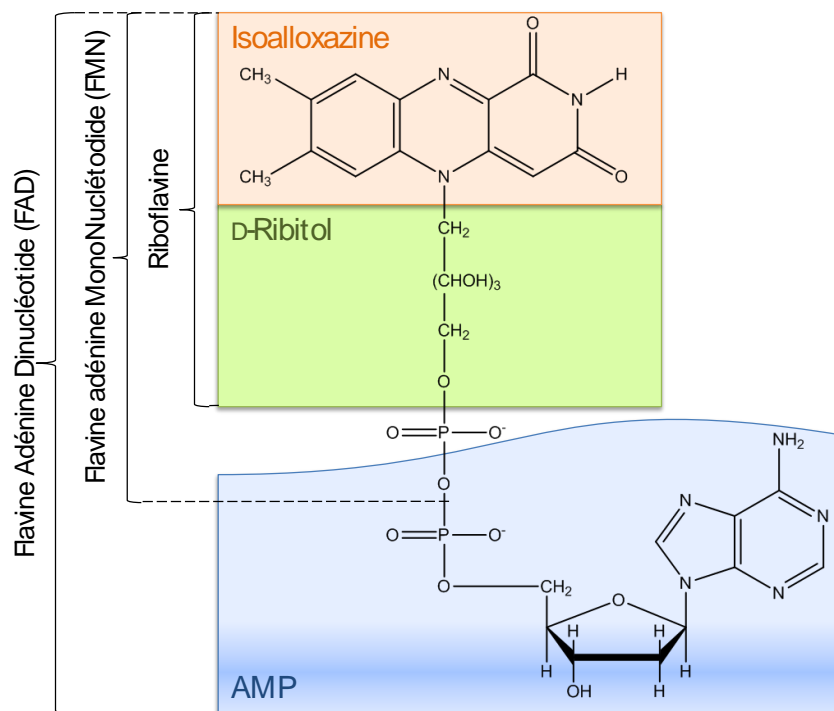


Figure 24 : Formule développée dans l'espace de la flavine adénine dinucléotide (FAD) qui contient celle du flavine adénine mononucléotide (FMN).

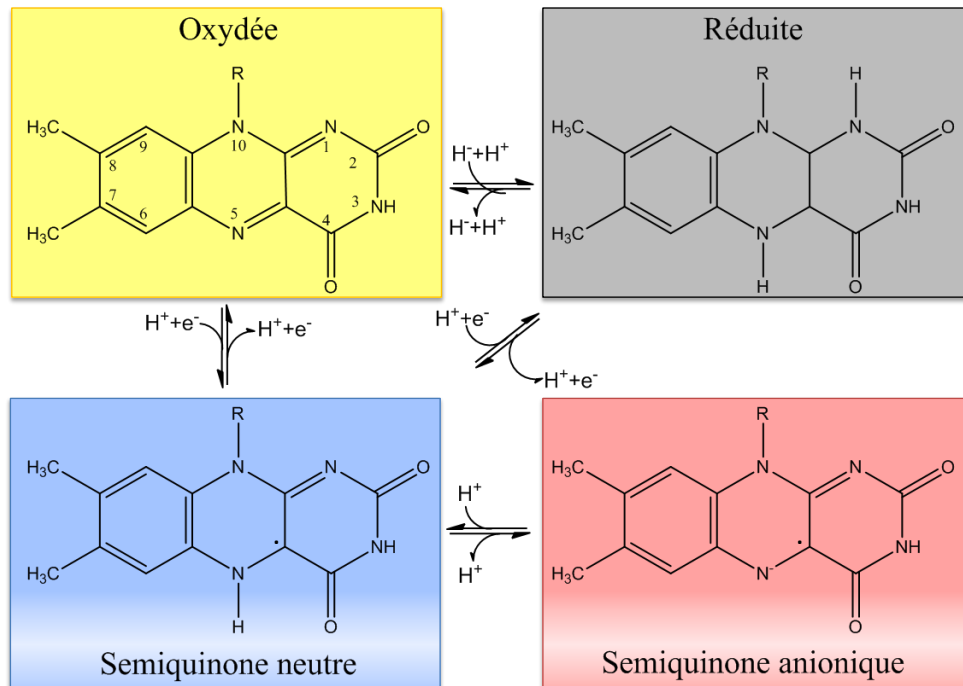


Figure 25 : Les différents états rédox des flavines. La forme totalement oxydée en haut à gauche est de couleur jaune ($\lambda_{max} = 455 \text{ nm}$). En bas, les deux formes semiquinones neutre et anionique sont respectivement bleue et rouge ($\lambda_{max} = 600 \text{ nm}$ et 490 nm). La forme réduite, en haut à droite, est incolore.

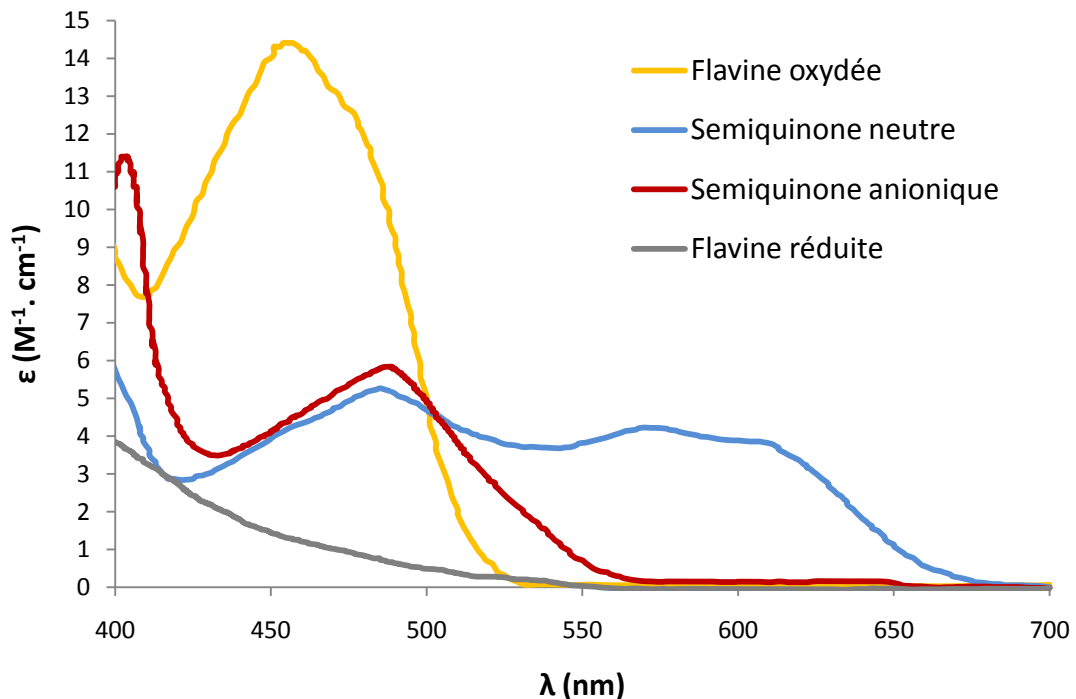


Figure 26 : Spectre d'absorption des flavines sous leurs différents états rédox.

Tandis que les CPR de mammifères ne stabilisent pratiquement que la semiquinone bleue du FMN (Vermilion and Coon, 1978b), celles issues d'insectes forment à peu près autant de semiquinones anioniques que de semiquinones neutres (Murataliev and Feyereisen, 1999; Murataliev et al., 2004). La stabilisation de telle ou telle espèce chez une CPR ne peut s'expliquer trivialement. En effet, elle dépend non seulement du potentiel rédox des flavines dans cette CPR

(voir § 4.3.2.2), mais également des résidus mis en jeu dans la fixation des cofacteurs via des interactions de π stacking (Shen et al., 1999). D'autres phénomènes comme la mobilité de la protéine et l'exposition des flavines au solvant, principalement celle du FMN, sont aussi certainement déterminants.

4.3.2.2. Les potentiels d'oxydoréduction des cofacteurs

Les potentiels rédox des cofacteurs flaviniques varient fortement selon l'origine des CPR. Leurs valeurs ont été déterminées à l'équilibre via des méthodes de titrage potentiométrique ou de spectroélectrochimie pour plusieurs CPR issues d'organismes variés telles que la CPR de rat, humaine, de levure, ou encore la partie réductase du système P450-BM3 (Daff et al., 1997; Finn et al., 2003; Louerat-Oriou et al., 1998; Munro et al., 2001; Noble et al., 1999; Ostrowski et al., 1989; Wolthers et al., 2003). Comme le montre la **Figure 27**, non seulement les valeurs mais également l'ordre des potentiels sont différents.

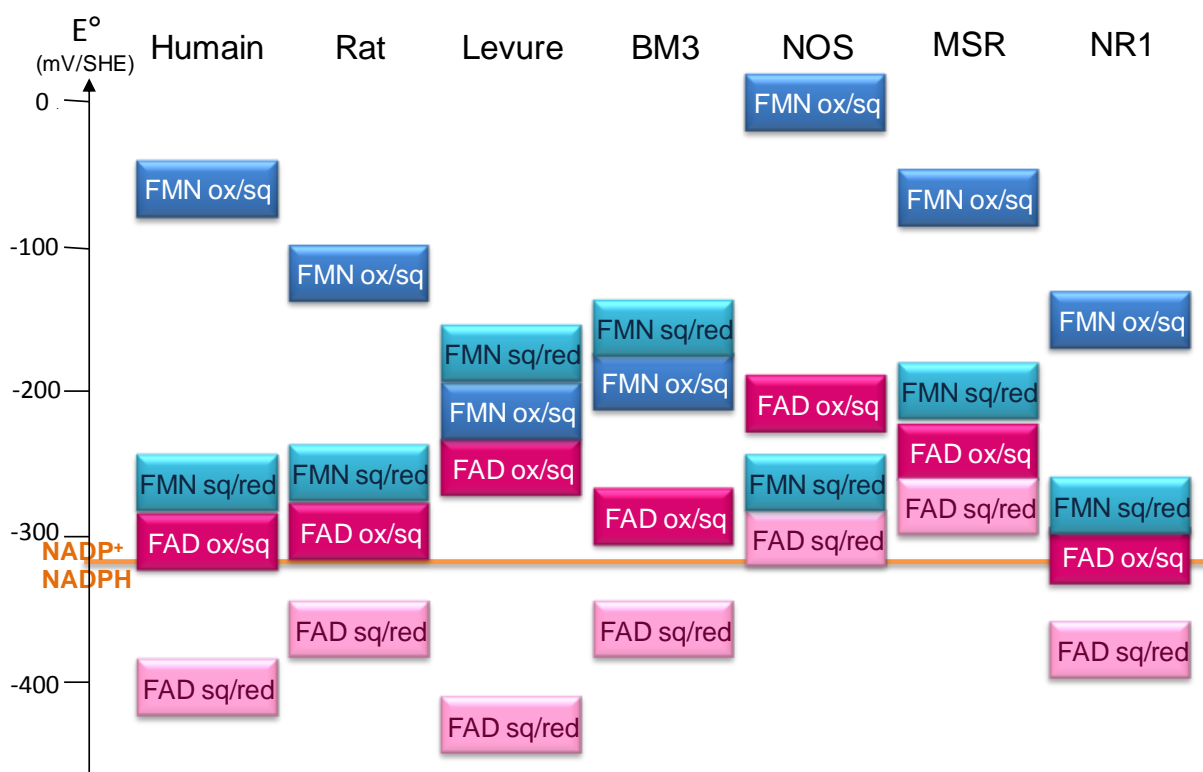


Figure 27 : Potentiels redox des plusieurs CPR et autres diflavines réductases déterminés par titrage potentiométrique à l'équilibre. La nitrique oxyde synthase (NOS), la méthionine synthase réductase (MSR) et la protéine NR1 sont trois protéines multidomaines diflavoniques analogues à la CPR (voir § 4.5)

Ces mesures à l'équilibre permettent de comparer les propriétés redox des réductases entre elles. Elles peuvent aussi expliquer la stabilisation de telle ou telle espèce chez une CPR particulière. Mais il serait difficile, voir hasardeux, d'essayer de relier ces valeurs de potentiels à des propriétés catalytiques de transfert aux P450 ou encore à un mécanisme réactionnel particulier car il faut distinguer les composantes thermodynamiques et cinétiques de ces systèmes.

Le P450-BM3 est un bon exemple des paradoxes rencontrés chez les réductases. En effet, il est communément admis que la forme totalement réduite ou hydroquinone du FMN est catalytiquement inactive dans ce système. Pourtant si l'on se base sur les mesures de ses potentiels,

la production de la forme FMNH_2 devrait être très favorable (Daff et al., 1997). Ainsi la formation de cette espèce inactive, grâce à une vitesse de transferts interflavines élevée, conduirait rapidement à l'inactivation du P450-BM3. Or ce système, qui possède par ailleurs la meilleure constante catalytique connue de tous les P450, peut tourner pendant plusieurs minutes sans qu'aucune perte d'activité ne soit détectable. Il semble donc que l'espèce hydroquinone du FMN ne soit pas préférentiellement formée lors de la catalyse, contrairement à ce que les caractérisations électrochimiques à l'équilibre pourraient laisser supposer.

Plusieurs autres contradictions sont à noter, comme l'existence de transferts thermodynamiquement défavorables, associés à des changements de potentiels négatifs. Une explication serait que les valeurs de potentiels mesurées à l'équilibre, dans des conditions d'anaérobiose nécessaires aux mesures de potentiométrie, diffèrent de celles existant réellement sous des conditions de catalyse, alors que l'enzyme fonctionne à une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde, et subit très probablement des réorganisations conformationnelles importantes et constantes (Murataliev et al., 2004).

4.3.2.3. Les cycles électroniques

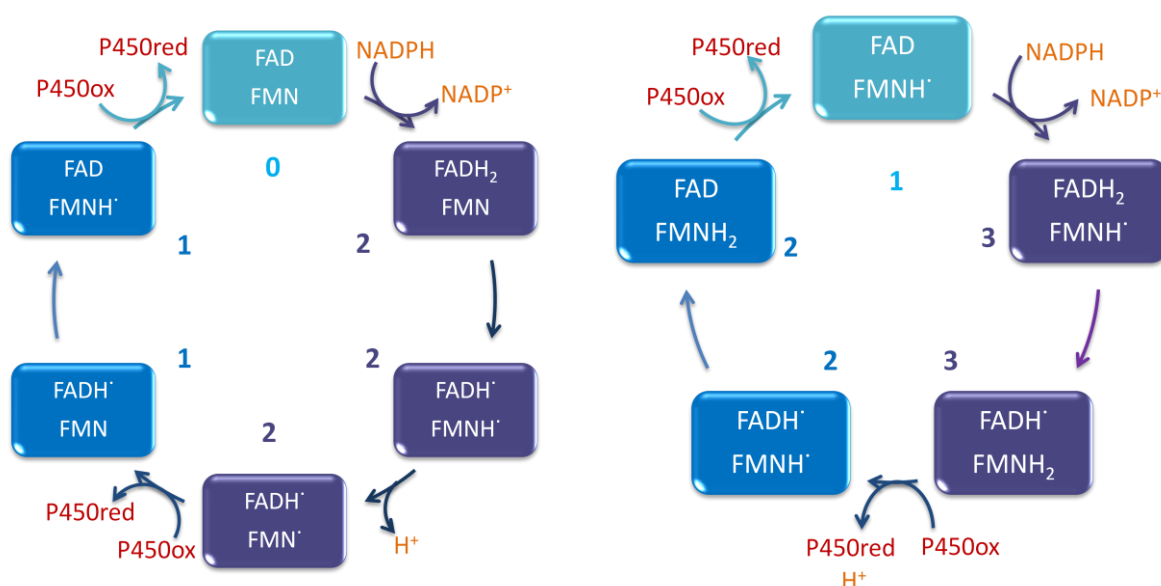


Figure 28 : Les deux cycles électroniques possibles de la CPR : 0-2-1-0 ou 1-3-2-1, respectivement à gauche et à droite.

Ces propriétés électrochimiques différentes entre chaque CPR ont des répercussions sur leurs cycles électroniques qui varient eux aussi en fonction de l'organisme dont la CPR est issue (**Figure 28**). Plusieurs mécanismes sont proposés en fonction de l'espèce initiale qui accepte l'hydrure du NADPH. Si cette forme de départ correspond à la CPR totalement oxydée, comme c'est le cas pour les CPR d'insectes, de la levure, ou celle de BM3, alors le cycle électronique est 0-2-1-0, où les chiffres correspondent aux nombres d'électrons sur la CPR (Murataliev and Feyereisen, 1996; Murataliev and Feyereisen, 1999). Par contre si l'espèce stable comprend déjà un électron, avec un FAD oxydé et un FMN semiquinone, le cycle électronique est alors 1-3-2-1. Ce dernier cycle correspond plutôt aux CPR de mammifères (Vermilion et al., 1981). Ces cycles électroniques sont encore sujets à débat, mais il est communément admis que l'espèce totalement réduite de la CPR (4 électrons), contenant les deux flavines sous leur forme hydroquinone, est inactive et n'apparaît donc jamais au cours des cycles de la CPR.

4.3.3. Les cinétiques de transferts d'électrons

Le cyt *c* et le ferricyanure sont deux accepteurs non physiologiques de la CPR utilisés comme références afin de pouvoir comparer les activités de CPR issues de organismes différents ou encore celles d'enzymes natifs et mutants. Tandis que le cyt *c* reçoit des électrons provenant du cofacteur FMN, le ferricyanure est réduit directement par le FAD, court-circuitant ainsi le transfert interflavine et le domaine FMN (Smith et al., 1994; Vermilion et al., 1981). Dans les deux cas, la CPR a un comportement michaelien où le k_{cat} permet de décrire la vitesse de la réaction de réduction de l'accepteur artificiel, tandis que le K_m reflète l'affinité de la CPR pour celui-ci. La notion d'affinité réelle pour le cyt *c* reste discutable sachant que la formation d'un complexe stable n'est peut-être pas nécessaire au transfert électronique. Certains auteurs choisissent alors le terme de pseudo-affinité et de $K_{1/2}$ plutôt que celui de K_m . Par contre, la fixation du NADPH au niveau de son site de fixation sur le domaine FAD/NADPH de la CPR autorise certainement la mesure d'une affinité.

Les CPR les plus rapides, que ce soit vis-à-vis du cyt *c* ou du ferricyanure, sont celles issues de plantes et de la levure. Elles présentent des valeurs de k_{cat} de l'ordre de 200 s^{-1} pour les deux accepteurs (Louerat-Oriou et al., 1998). Suit ensuite la CPR de rat avec un $k_{cat}^{\text{cyt } c}$ proche de 90 s^{-1} (Hubbard et al., 2001; Shen et al., 1999), et enfin les CPR d'insectes et humaine qui atteignent $\sim 50 \text{ s}^{-1}$ pour la réduction du cyt *c* et 111 s^{-1} pour celle du ferricyanure (Louerat-Oriou et al., 1998; Murataliev et al., 1999). Concernant l'« affinité » des CPR pour ces accepteurs ainsi que le NADPH, les valeurs de $K_{1/2}^{\text{cyt } c}$ varient entre $4,6 \mu\text{M}$ pour la CPR de mouche et $32 \mu\text{M}$ pour l'humaine et celles du K_m^{NADPH} vont de $0,46 \mu\text{M}$ chez l'humain à $6,2 \mu\text{M}$ chez le rat. Ainsi la CPR humaine correspond à la CPR la moins efficace avec la plus faible vitesse de transfert et la moins bonne affinité vis-à-vis de la source d'électrons et du cyt *c*. A l'inverse, la CPR de levure ou celles issues de certaines plantes présentent des constantes catalytiques optimales (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Constantes cinétiques de CPR issues d'organismes différents.

Organisme d'origine des CPR	Activité cyt <i>c</i> réductase			Activité ferricyanure réductase		Référence
	k_{cat} (s^{-1})	K_m^{NADPH} (μM)	$K_{1/2}^{\text{cyt } c}$ (μM)	$k_{cat}/K_{1/2}$ ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	
Insecte	$50,4 \pm 6,0$	$0,96 \pm 0,16$	$4,6 \pm 1,2$			(Murataliev et al., 1999)
Plante	213 ± 20	$2,2 \pm 0,3$	17 ± 2	$3,5 \pm 0,3$	200 ± 10	(Louerat-Oriou et al., 1998)
Humain	48 ± 10	$0,46 \pm 0,05$	32 ± 3	12 ± 1	111 ± 10	
Levure	200 ± 20	$3,2 \pm 0,4$	21 ± 3	$1,3 \pm 0,1$	200 ± 10	
Rat	$85,4 \pm 1,2$	$6,2 \pm 0,7$	$16,3 \pm 1,7$			(Hubbard et al., 2001)
Rat	$90,4 \pm 1,3$	$6,3 \pm 0,7$	$16,3 \pm 1,7$			(Shen et al., 1999)
Activité spécifique (As) des microsomes de foie de rat ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine)		$As_{\text{cyt } c} = 51 \pm 9,0$		$As_{\text{ferricyanure}} = 102 \pm 7,9$		

Des études de cinétique rapide via des expériences de stopped-flow ou de sauts de température couplés à de la spectrométrie d'absorption permettent également de déterminer les constantes des deux premiers transferts électroniques, $k1$ correspondant à la réduction du FAD par le NADPH tandis que $k2$ reflète le transfert interne entre les deux flavines (**Tableau 2**).

La vitesse des transferts d'électrons au sein des CPR est généralement supérieure aux constantes catalytiques des P450. Et ce ne sont pas les transferts internes à la CPR mais plutôt celui entre la CPR et le P450 lui-même qui constitue une étape cinétiquement déterminante (ECD) de ces systèmes. Quoiqu'il en soit, la détermination de l'ECD au sein même de la CPR a longtemps été débattue. Les premières mesures désignaient le tout premier transfert correspondant à la réduction du FAD par le NADPH comme étant limitant. Mais l'optimisation des appareils et l'apparition de nouvelles méthodes telles que le saut de température ont permis la mesure de transferts plus rapides, et le transfert interne entre les deux flavines de la CPR s'est alors révélé plus lent que le premier. Cette dernière hypothèse est également appuyée par un effet isotopique assez faible (Shen et al., 1999) et une diminution de la vitesse de transfert lors de l'augmentation de la viscosité du tampon réactionnel (Gutierrez et al., 2002). Étonnamment, la fixation du NADPH ou NADP⁺ a une influence directe sur le second transfert interflavines qui est fortement ralenti lorsque l'enzyme est réduite chimiquement par du dithionite à la place de nucléotide physiologique. Enfin des molécules analogues au NADPH telles que le adénine-2',5'-diphosphate (ADP) et le adénine-2'-monophosphate (AMP) miment l'effet allostérique du ligand (Gutierrez et al., 2003).

Tableau 2 : Constantes de vitesse des transferts électroniques du NADPH au FAD (k_1) et du FAD au FMN (k_2) mesurées par stopped-flow ou saut de température. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la deuxième constante cinétique lorsque les données sont modélisées par des doubles exponentielles.

Organisme	k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	Remarques	Références
Lapin	28 (5,4)	28 (5,4)	Transfert NADPH → FAD limitant	(Oprian and Coon, 1982)
Insecte	26,1 ± 1,4		Transfert NADPH → FAD limitant	(Murataliev et al., 1999)
Plantes	40 ± 5	34 ± 5		(Louerat-Oriou et al., 1998)
Levure	42 ± 5			
Humain	4,5 ± 1	10 ± 2		
Humain	202 (3,5)			(Gutierrez et al., 2001)
Humain	20		Stopped-flow	(Gutierrez et al., 2002)
	70	55	Sauts de température. La réduction du FAD n'est plus limitante	
Humain		55 ± 2	CPR réduite à 2 e ⁻ via du NADPH	(Gutierrez et al., 2003)
		11 ± 0,5	CPR réduite à 2 e ⁻ via du dithionite	
		35 ± 0,2	CPR réduite à 2 e ⁻ via du dithionite en présence de 2',5'-ADP	
		32 ± 0,6	CPR réduite à 2 e ⁻ via du dithionite en présence de 2'-AMP	
Rat		15 ± 2		(Hubbard et al., 2001)

4.4. Le domaine de connexion

Lors de la fusion des gènes flavodoxine et ferrédoxine réductase, un domaine de connexion (en rose sur la **Figure 29**) a été introduit entre les deux domaines catalytiques de la CPR. Ce domaine n'est pas simplement une boucle qui jouerait le rôle de connecteur dans le seul but de rapprocher physiquement les composants du système ; il possède une structure secondaire propre, composée de 7 hélices α reliées entre elles par 7 boucles. Cette dernière caractéristique est commune à un grand nombre de domaines de connexion structurés contenant presque exclusivement des hélices α (George and Heringa, 2002). Mais une recherche approfondie d'autres domaines structurellement homologues par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ne

révèle aucune séquence analogue à celle du domaine de connexion des diflavines réductases dans toute la Protein Data Bank (PDB). Celle-ci est donc spécifique de ce connecteur qui relie les modules fixant le FAD et le FMN (Gruez et al., 2000). Et si les deux domaines catalytiques de la CPR possèdent des séquences et des repliements très classiques et caractéristiques des protéines flaviniques, la structure du domaine de connexion semble assez particulière et unique.

Le rôle exact de ce domaine de connexion chez la CPR reste encore peu compris. On ne peut nier son caractère nécessaire voir indispensable à l'activité de l'enzyme, puisque la dissection de celle-ci en deux domaines catalytiques distincts, avec d'un côté le domaine FMN et de l'autre les domaines de connexion et FAD, ne permet de retrouver que 2 % de l'activité native (Smith et al., 1994). Or, bien que le domaine de connexion accolé au domaine FAD ait été conservé lors de ces expériences, la fragmentation de l'enzyme l'a apparemment annihilé. Ce domaine serait donc non seulement impliqué dans la communication entre les domaines catalytiques, facilitant les transferts internes de l'oxydoréductase au transporteur, mais il ne pourrait assurer son rôle que lorsque les domaines sont reliés physiquement.

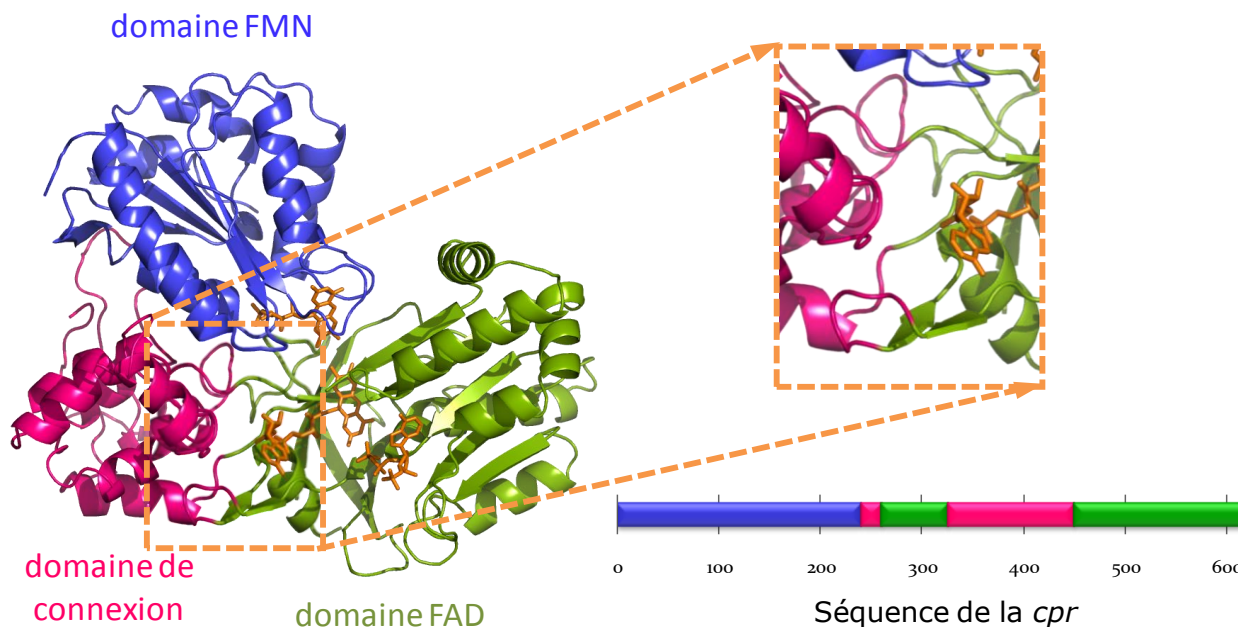


Figure 29: Dans la structure de la CPR, la chaîne d'acides aminés sort du domaine de connexion (rose) pour entrer dans le domaine FAD (vert), puis ressort du domaine FAD pour revenir à nouveau dans le domaine de connexion, et ce à deux reprises. En d'autres termes, les séquences codant pour ces parties de la protéine ne sont pas linéaires, mais sont entremêlées.

D'autres particularités attirent l'attention sur ce connecteur. Lors de la fusion des gènes *Fldx* et *FdR*, le gène codant pour le domaine de connexion n'a pas été introduit sous la forme d'un bloc unitaire. Celui-ci se retrouve en effet entremêlé avec le domaine FAD, la chaîne d'acides aminés passant d'un domaine à l'autre à plusieurs reprises (**Figure 29**) et les points de jonction se trouvant aux abords des résidus 326 et 450 dans la séquence de la CPR de rat. Cette caractéristique permet probablement au domaine de connexion de « sentir » des changements conformationnels au niveau du domaine FAD et de les répercuter sur le reste de la protéine. De telles modifications pourraient être causées soit par le changement de l'état rédox du FAD, cette molécule subissant alors des remaniements au niveau de la planéité de son cycle isoalloxazine (Duchstein et al., 1979; Ghisla et al., 1974; Muller et al., 1972); soit par la fixation du NADPH sur l'enzyme (Gutierrez et al., 2003;

Gutierrez et al., 2002). Ainsi, ce domaine si particulier pourrait correspondre à une charnière sensible, capable non seulement de sentir l'état rédox de certains cofacteurs de la CPR, mais également de transmettre cette information à l'ensemble des domaines catalytiques.

Les résultats de plusieurs études appuient cette hypothèse et mettent en évidence le rôle significatif du domaine de connexion sur la mobilité générale des domaines catalytiques de la CPR. Ces recherches se focalisent principalement sur le linker reliant le domaine de connexion au domaine FMN. Les résidus de cette boucle souple présentent des facteurs B (indices correspondant à la précision de leur localisation) élevés, traduisant une grande flexibilité de ce linker. La délétion de plusieurs résidus de cette boucle chez la CPR humaine, ou encore leur remplacement par des polyprolines (mutant 10P), conduisent à une chute de l'affinité pour le cofacteur NADPH qui se fixe sur le domaine FAD de la CPR via son groupement 2',5'-ADP (adénosine-2',5'-diphosphate) (Grunau et al., 2007). Ces mutations ont également pour conséquence de diminuer d'un facteur 50 la cinétique du transfert interne FAD→FMN, et de réduire drastiquement la capacité du variant à transférer des électrons à des accepteurs tels que le cyt *c*. Des expériences de SAXS démontrent que la mobilité diffusionnelle relative des domaines est grandement diminuée chez le mutant P10 (**Figure 30**). Non seulement des mouvements entre les domaines catalytiques de la CPR semblent exister, mais ils apparaissent même comme nécessaires au bon fonctionnement de l'ensemble. Une restriction de ces propriétés dynamiques expliquerait alors que des mutations dans une boucle localisée à plus de 60 Å du site de fixation du NADPH affectent l'affinité de la protéine pour ce cofacteur puissent se répercuter sur l'ensemble de la protéine.

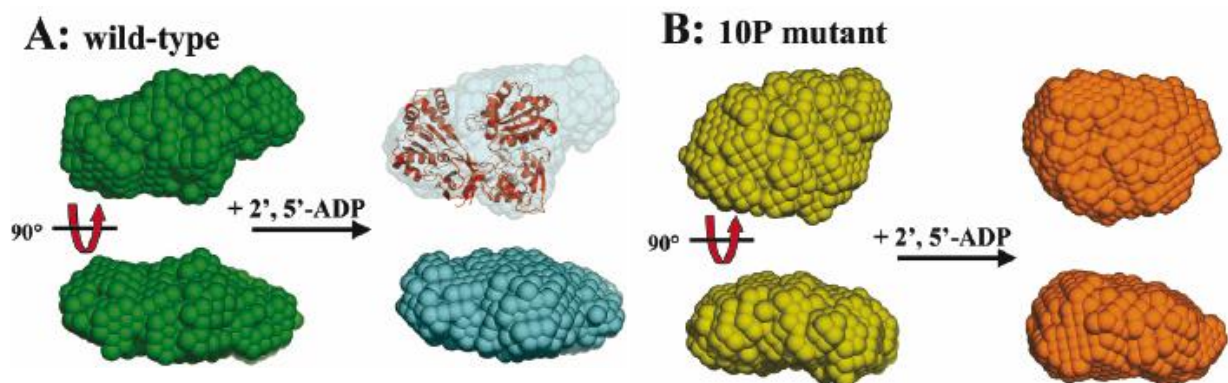


Figure 30 : Représentations ab initio des enveloppes de la CPR humaine native (A) et du mutant 10P (B) dont une partie du linker reliant le domaine de connexion au domaine FMN a été remplacé par une suite de prolines, augmentant ainsi la rigidité de cette boucle. Ces données sont issues d'expériences de SAXS. Les structures à droite correspondent aux protéines sans ligands, tandis que celles de gauche correspondent aux conformations en présence de 2',5'-ADP. La structure cristallographique en rubans de la CPR de rat a été superposée pour permettre la comparaison (Grunau et al., 2007).

Finalement, des interactions entre ce domaine de connexion et le P450-2B6 ont été révélées grâce à des expériences de cross-linking (Bumpus and Hollenberg, 2010). Le domaine de connexion qui pourtant ne fixe aucun cofacteur, aurait une influence majeure sur la dynamique de la CPR, et serait également impliqué dans la reconnaissance d'accepteurs. Ces deux caractéristiques peuvent être reliées : ce domaine, capable de détecter la présence d'un accepteur électronique, pourrait en conséquence dicter les changements conformationnels au sein de la CPR afin d'autoriser les différents TE nécessaires au fonctionnement du système P450.

4.5. Les protéines multidomaines analogues

Les flavoprotéines représentent 1 à 3 % de la totalité des protéines procaryotes et eucaryotes (Stuehr et al., 2009), et environ la moitié des protéines impliquées dans le transfert d'électrons (Gomez-Moreno, 2009). La CPR fait partie de la famille des diflavines réductases au même titre que les sous-unités flavoprotéiques de la sulfite réductase (SiR) bactérienne, de la méthionine synthase réductase (MSR) mammifère, des nitrique oxyde synthases (NOS), du cytochrome P450-BM3, ou encore la protéine cytoplasmique NR1. La fonction physiologique de cette dernière reste encore inconnue mais son taux d'expression augmente dramatiquement dans les cellules cancéreuses. Toutes ces protéines sont issues de la fusion des gènes Fdx et FdR, et portent respectivement les mêmes groupes prosthétiques FMN et FAD permettant d'acheminer le flux électronique des pyridines nucléotides (NADH ou NADPH) vers des accepteurs. Ces derniers sont soit disjoints de leur réductase, par exemple les cytochromes P450 microsomaux qui sont indépendants de la CPR, ou encore la MSR et la SiR ; soit fusionnés à celles-ci pour former des entités autonomes telles que le P450-BM3 et la NOS.



Figure 31 : Agencement des domaines structuraux des diflavines réductases. Trois domaines sont communs à toutes les protéines de cette famille : le domaine FMN (bleu clair), analogue à une flavodoxine, le domaine FAD/NADPH (bleu foncé), analogue à une ferrédoxine réductase, et le domaine de connexion (rose) dont le repliement est unique. Les réductases de BM3 et de la NOS sont fusionnées au domaine hémique (rouge). La NOS possède également des éléments structuraux absents des autres réductases et capables de réguler le flux électronique : une séquence de fixation de la calmoduline (CaM, violet) entre les domaines hémique et FMN, une boucle d'auto-inhibition (AI, vert clair) au milieu du domaine FMN, une séquence de β -fingers (orange) dans le domaine de connexion, et enfin une queue C-terminale (CT, vert foncé).

Les diflavines réductases partagent une similarité de séquence variant entre 30 et 50 % selon les protéines comparées. Par exemple, la réductase de BM3 et la CPR humaine présentent 35 % d'identité de séquences. La CPR de rat et celle de la NOS neuronale partagent 58 % d'identité de séquences (Wang et al., 1997). Cette conservation entre différents membres de la famille des diflavines réductases n'est d'ailleurs pas plus faible qu'entre des CPR issus d'organismes éloignés comme l'humain et la levure. Les motifs responsables de la fixation des cofacteurs flaviniques sont par contre tous conservés. Concernant les accepteurs, le domaine oxygénase de BM3 présente 25 % d'identité de séquence avec les P450 mammifères catalysant la même réaction d'hydroxylation des acides gras (Sevrioukova and Peterson, 1995).

La mesure de l'activité cyt c réductase de ces protéines, bien que non physiologique, permet à nouveau de les comparer entre elles. Si, comme nous l'avons déjà vu, la réductase du BM3 possède la constante catalytique la plus élevée (de 150 à 400 s⁻¹ selon les conditions réactionnelles), celle de la SiR et de la CPR varient entre 30 à 200 s⁻¹ selon l'organisme dont elles sont issues. Viennent ensuite la NOS, entre 3 et 50 s⁻¹; et finalement la MSR et la NR1 qui présentent les constantes catalytiques les plus lentes avoisinant 1 s⁻¹ (Murataliev et al., 2004).

4.5.1. L'oligomérisation de certaines diflavines réductases

Certains de ces systèmes tels que la NOS, le P450-BM3 ou encore la SiR, sont sujets à oligomérisation. Leurs modes d'assemblage et leur mécanisme de transferts d'électrons font encore l'objet de débats. Concernant le P450-BM3, des mesures par sédimentation et par chromatographie d'exclusion de taille démontrent que l'enzyme est stable sous la forme de dimères (Black and Martin, 1994). De plus son activité chute dramatiquement à très basse concentration, ce qui correspond à la séparation de ce dimère actif. Par contre, la conservation de l'activité réductase de l'enzyme dans ces conditions de forte dilution démontrerait que le TE interflavine ne serait pas affecté, suggérant un transfert intramoléculaire (Neeli et al., 2005). Ces derniers résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle le premier transfert entre le FAD et le FMN aurait lieu au sein d'une même protéine, tandis que le transfert du FMN à la partie oxygénase du système mettrait en jeu les deux sous unités du dimère (**Figure 32 A**). Mais une autre étude par mutagenèse dirigée prouve que lorsque le transfert FAD→FMN est bloqué au sein de chaque unité du dimère, mais reste possible de façon intermoléculaire, l'activité de l'ensemble est alors inchangée (Kitazume et al., 2007). Dans ce cas, le transfert interflavine aurait plutôt lieu entre les deux unités d'un dimère, tandis que les parties oxygénases accepteraient des électrons provenant aussi bien de la même protéine que de l'autre unité (**Figure 32 B**).

Tout comme le P450-BM3, la NOS forme des dimères stables indispensables à son activité (Pant and Crane, 2005). Mais, dans ce cas, les résultats de plusieurs études de mutagenèse et d'ingénierie protéique s'accordent quant aux chemins empruntés par les électrons dans l'homodimère. Ces TE suivent probablement le model présenté dans la **Figure 32 B**, avec un transfert intramoléculaire au sein de la partie réductase, et un transfert intermoléculaire entre le FMN et l'hème de chaque unité (Stuehr et al., 2009).

Certaines de ces diflavines réductases formant des oligomères ont la particularité de devoir fournir plus de deux électrons à leurs accepteurs finaux pour soutenir les réactions qu'ils catalysent. Ainsi, la NOS, active sous la forme de dimère, permet à sa partie réductase de transférer six électrons issus de trois molécules de NADPH, vers les deux domaines oxygénases ; chacun ayant besoin de trois électrons pour catalyser la synthèse de deux molécules de NO. De la même façon, la SiR forme des octamères afin de fournir les 24 électrons nécessaires à la formation de sulfite dans le site catalytique de l'accepteur. Il serait intéressant de déterminer si ces oligomérisations permettent aux domaines hémique de recevoir des électrons provenant de différentes sous-unités réductases ; ou encore si des transferts électroniques inter-réductases sont possibles afin d'éviter l'accumulation de sous-unités partiellement réduites, et la formation de ROS lorsque la concentration en NADPH est faible (Murataliev et al., 2004).

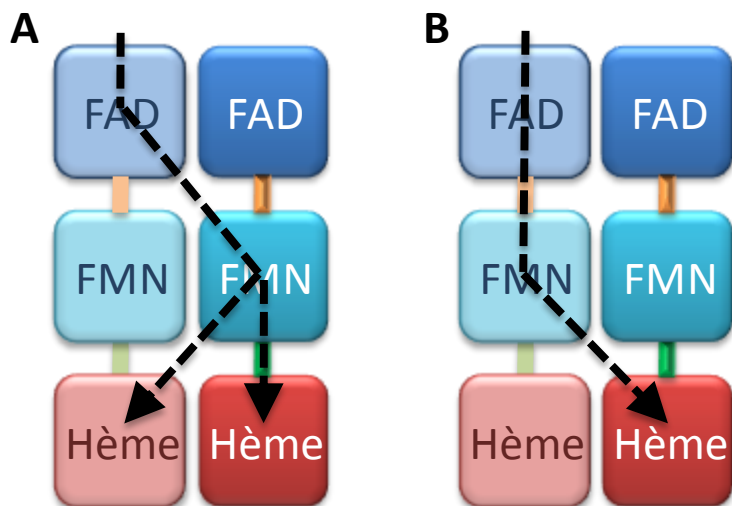


Figure 32 : La NOS et le P450-BM3 ne sont actifs que sous la forme de dimères. Tandis que les voies des TE chez la NOS sont bien identifiées et correspondent au schéma B, celles du P450-BM3 restent encore débattues. En effet des résultats contradictoires ne permettent pas de trancher entre les deux modèles A et B. Dans le modèle A, le premier TE du FMN au FAD est intermoléculaire entre les deux unités du dimère ; tandis que le second TE FMN→hème est soit inter- soit intramoléculaire. Dans le modèle B, le premier TE entre les deux flavines est intramoléculaire ; tandis que le second TE du domaine FMN au domaine oxygénase est intermoléculaire et a donc lieu entre la flavine et l'hème de chacune des unités d'un dimère.

4.5.2. Les particularités de la réductase du P450-BM3

Plusieurs propriétés biochimiques du P450-BM3 sont notables voir même extraordinaires, comme sa constante catalytique atteignant les 400 s^{-1} dans des conditions optimales. Mais une autre caractéristique attire l'attention : la partie réductase du P450-BM3 est la seule à ne pas stabiliser la semiquinone bleue du cofacteur FMN (Noble et al., 1999). En effet, lors de la réduction partielle de la partie réductase entière ou du domaine flavodoxine isolée, aucune semiquinone stable n'est observée au niveau du FMN. Ce comportement est typique des transporteurs biélectroniques, et contraste avec les propriétés rédox des diflavines réductases et des flavodoxines. A l'inverse, la semiquinone bleue du FMN est présente chez l'espèce stable à l'air de la CPR de mammifère.

Une particularité structurale de BM3 peut expliquer l'accumulation de l'espèce semiquinone anionique du FMN. Cette réductase est en effet la seule à ne pas posséder de glycine au niveau du site de fixation du cofacteur FMN, ce résidu étant pourtant extrêmement bien conservé chez les autres membres de la famille. Il en résulte une boucle plus courte et bien moins flexible qui faciliterait alors des interactions du type liaison hydrogène absentes des autres diflavines réductases. Cette hypothèse est validée par des travaux de mutagénèse dirigée prouvant que l'ajout de la glycine manquante engendre immédiatement une accumulation de la forme neutre de cette semiquinone dans le variant du P450-BM3 (Chen and Swenson, 2008).

Les caractérisations thermodynamiques et cinétiques du P450-BM3 permettent également d'avancer quelques hypothèses quant aux causes de son comportement singulier. Le TE du NADPH à la réductase doit engendrer la formation de la semiquinone rouge du FMN. La présence d'un excès d'agent réducteur permet de réduire à nouveau cette dernière en hydroquinone, mais avec une constante assez lente de 1 s^{-1} . Ainsi cette semiquinone anionique, bien que thermodynamiquement instable, serait cinétiquement piégée, et correspondrait à l'espèce transférant des électrons aux cytochromes lors des cycles catalytiques. L'espèce hydroquinone, lorsqu'elle est générée, reste toujours catalytiquement inactive. Les transferts électroniques à travers le P450-BM3 nécessitent un donneur à bas potentiel capable de réduire l'hème. Mais les caractérisations actuelles du cofacteur FMN de cet enzyme ne permettent pas d'expliquer comment celui-ci est en mesure d'assurer ce transfert vers le cytochrome (Hanley et al., 2004).

4.5.3. Les particularités de la Nitrique Oxyde Synthase (NOS)

La NOS catalyse l'oxydation de la *L*-arginine afin de générer du NO et de la citrulline. Bien que des recherches récentes aient permis d'identifier chez des organismes procaryotes des protéines homologues aux NOS mammifères, ces dernières restent bien plus étudiées et donc bien mieux connues. Il existe trois isoenzymes de la NOS chez les mammifères, chacun jouant un rôle crucial mais distinct : la NOS neuronale (nNOS) qui participe aux phénomènes de neurotransmission, la NOS endothéliale (eNOS) jouant un rôle dans l'homéostasie vasculaire, et la NOS inductible (iNOS) qui catalyse la synthèse du NO en réponse à des stress immunitaires. Chez la nNOS et eNOS, la production de NO est activée par la calmoduline (CaM), une protéine fixant le Ca^{2+} . Les premières études comparées des NOS avec d'autres diflavines réductases ont révélé des comportements biochimiques assez singuliers. Par exemple, l'effet isotopique du deutérium ou la variation de la force ionique influent de façon totalement différentes voir même opposées les activités cyt *c* réductase de la nNOS et de la CPR humaine, suggérant des divergences dans les modes de régulation de ces diflavines (Miller and Hinck, 2001).

La résolution des premières structures de NOS a permis d'éclairer ces phénomènes en identifiant chez cette enzyme des domaines ou motifs structuraux absents des structures d'autres diflavines réductases (**Figure 31** et **Figure 34**) :

- une queue C-terminale de 20 à 40 résidus capable de bloquer le transfert des électrons en figeant le domaine FMN dans une position d'attente d'électrons ;
- un site de fixation de la CaM positionné entre les domaines FMN et hémique, et autorisant le transfert FMN→hème lorsque la concentration en Ca^{2+} est suffisante ;
- une boucle d'auto-inhibition (AI), comprenant une quarantaine de résidus situés entre le domaine FMN et le domaine FAD. Le positionnement de cette boucle répond à la fixation de la CaM et lève en conséquence l'inhibition sur les transferts intra- et intermoléculaires ;
- un motif en β -fingers inséré dans le domaine de connexion qui relie les domaines FAD et FMN, et interagissant également avec le site de fixation de la CaM (Garcin et al., 2004).

Les trois derniers motifs ne sont présents que chez les nNOS et eNOS. Toutes deux ont donc une très forte similarité de structures, mais présentent des activités NO synthase ou cyt *c* réductase différentes. Ces variations sont probablement dues au mode de régulation par la CaM qui s'avère assez complexe : en l'absence de CaM, l'enzyme libre adopte une conformation « blindée » (shielded) dans laquelle le domaine FMN est figé dans la position d'attente d'électrons provenant du domaine FAD ; lors de la fixation de la CaM, l'enzyme prend une conformation « déblindée » (deshielded) autorisant le transfert FMN→hème (**Figure 33**). Les constantes correspondant à ces changements conformationnels ne sont pas identiques chez la nNOS et la eNOS, ce qui expliquerait leurs différences d'activités (Stuehr et al., 2009).

Des études concernant les équilibres reliant ces états conformationnels extrêmes démontrent que les interactions entre les domaines FMN et FAD (analogues à l'interface entre domaines catalytiques chez la CPR) sont bien plus fortes que celles entre les domaines FMN et hème. Cette caractéristique tire donc les équilibres A et B (**Figure 33**) vers la gauche en l'absence de CaM. La fixation de celle-ci déstabilise au contraire la conformation blindée de la NOS, et en augmente ainsi l'activité cyt *c* réductase (Ilagan et al., 2009).

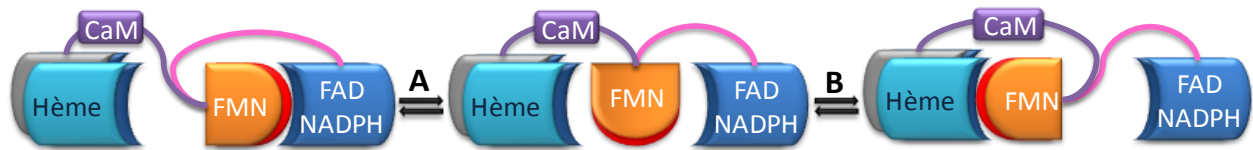


Figure 33 : Le modèle à trois états et deux équilibres décrivant les mouvements du domaine FMN de la NOS au cours du transfert des électrons. A gauche, la conformation blindée de la NOS dans laquelle le domaine FMN est figé dans une position d'attente d'électrons. A droite, la conformation déblindée dans laquelle le domaine FMN est en position pour transférer des électrons à la partie oxygénase de la NOS (hème). Les différents facteurs de régulation déplacent les équilibres A et B. La fixation du CaM lève la répression du transfert d'électrons et déplace fortement l'équilibre B vers la droite. La même face électro négative du domaine FMN (rouge) interagit avec les deux partenaires rédox électropositifs (bleu).

L'état redox du FMN, qu'il soit à 0, 1 ou 2 électrons, n'a par contre aucun impact sur le caractère blindé ou déblindé de l'enzyme. D'autre part, la surface du domaine FMN de la NOS entourant le site de fixation du cofacteur est chargée de façon électro négative afin d'interagir par complémentarité de charges avec les domaines oxygénase et FAD. Ce phénomène est d'ailleurs analogue au mode de reconnaissance des composants des systèmes P450 (voir § 3.2.1). Lors des mouvements de va-et-vient du domaine FMN entre la forme blindée et déblindée, celui-ci interagit avec les deux autres partenaires rédox au travers de la même surface correspondant à la zone de fixation du cofacteur. Ceci implique une rotation complète du domaine FMN lors des transitions entre les équilibres A et B (**Figure 33**). Dans la conformation déblindée de la NOS, la molécule de FMN d'une unité du dimère n'est qu'à 12-17 Å de l'hème de l'autre unité. Cette distance est suffisamment petite pour autoriser un transfert électronique FMN→hème (Ilagan et al., 2009). Mais l'interface des domaines FMN/hème est plus réduite et moins protectrice que celle entre les domaines FMN/FAD.

Ces dernières années, de nouvelles NOS ont été identifiées chez des procaryotes. Chez ces organismes, d'autres voies de production de NO existent. De la même façon, une chimie indépendante de toute NOS permet de convertir l'arginine en citrulline au cours du cycle de l'urée. Pour ces raisons, il est particulièrement difficile d'assigner les activités de type NOS observées chez ces organismes à de réelles homologues de la NOS sans des études biochimiques et génétiques complémentaires. De manière très intéressante, la découverte de ces nouvelles NOS bactériennes révèle l'existence de plusieurs systèmes différents. En effet, chez les bactéries, les différents composants de la partie réductase et de la partie oxygénase ne sont pas reliés de façon covalente, contrairement aux NOS mammifères (Crane et al., 2010). On peut alors faire le parallèle entre les systèmes NOS et les classes de P450, les NOS mammifères correspondant aux systèmes P450 de classe VIII tandis que les NOS procaryotes seraient analogues aux systèmes de classe III.

La présentation des caractéristiques parfois singulières de diflavines réductases, autres que la CPR, révèle à nouveau la modularité de ces systèmes qui semblent *a priori* très complexes, mais ne résultent finalement que de l'évolution de deux domaines ancestraux communs via des fusions, des insertions de motifs, et des phénomènes d'oligomérisation. Les différents types de NOS montrent bien que la notion de puzzle à partir de composants capables d'engendrer toute une série de systèmes d'architecture analogue mais de natures différentes ne concerne pas uniquement les classes de P450. Les diflavines réductases ne sont donc pas des entités structurales figées.

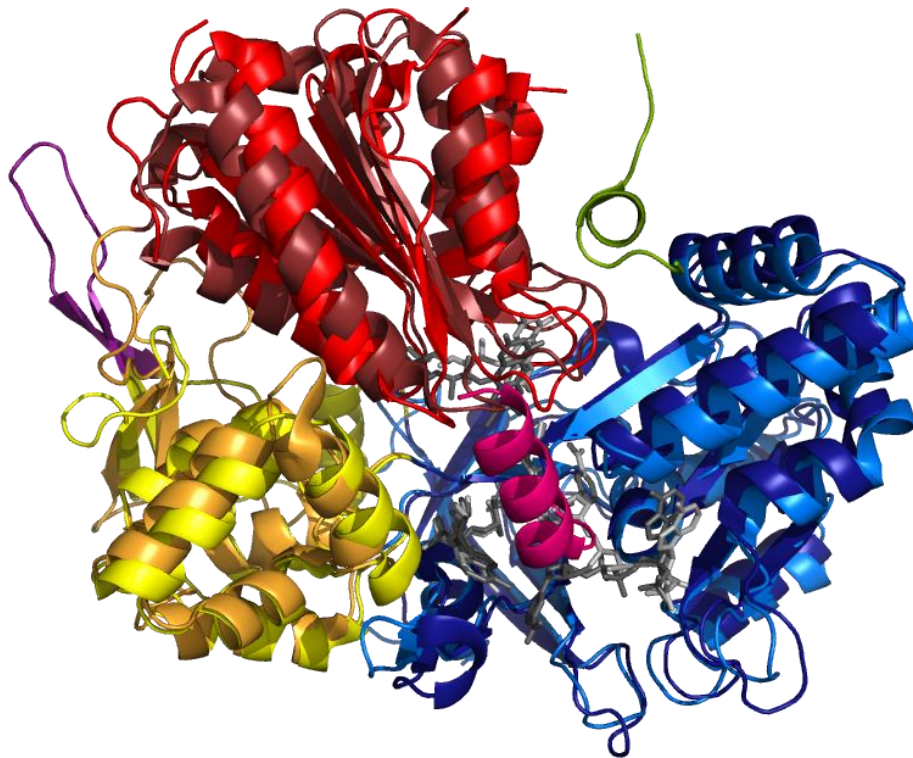


Figure 34 : Alignement des structures de la NOS réductase endothéliale de rat (1TLL) et de la CPR de rat (1J9Z). Les deux diflavines réductases gardent en commun les domaines FMN, FAD et de connexion, respectivement en rouge, bleu et jaune. Les motifs régulateurs supplémentaires de la NOS sont la boucle d'auto-inhibition en vert, la queue C-terminale en rose, et les β -fingers en violet.

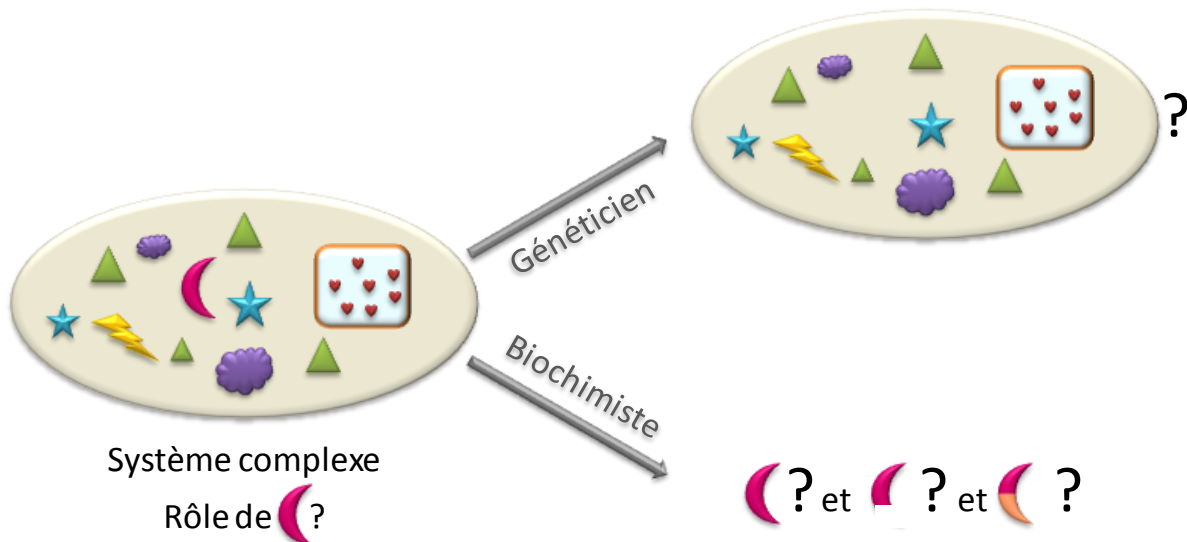
Des phénomènes dynamiques semblables aux mouvements supposés des domaines de la CPR ont été démontrés chez d'autres protéines de la famille des diflavines réductase. On peut ainsi faire une analogie entre les conformations blindées *versus* déblindées de la NOS et la conformation fermée de la CPR *versus* une possible conformation plus ouverte et plus accessible aux cytochromes. Des phénomènes similaires ont aussi été identifiés chez la MSR. Des études de RMN ont effectivement permis de caractériser des mouvements du domaine FMN entre deux conformations extrêmes dans lesquelles il forme un complexe soit avec le donneur, soit avec l'accepteur d'électrons. Tout comme chez la NOS, la partie flavodoxine de la MSR interagit avec ses partenaires rédox via la même surface de contact, impliquant une rotation totale du domaine au cours du transfert électronique (Hall et al., 2001; Wolthers et al., 2007). Sans bien sûr apporter une preuve définitive, les caractéristiques de ces protéines confortent les hypothèses avancées concernant les réarrangements structuraux que pourrait subir la CPR.

5. Présentation du sujet de thèse : La construction de chimère, une approche rationnelle pour l'étude de protéines multidomaines

5.1. Le domaine comme unité de construction

La fonction d'une entité telle qu'un gène, une protéine, ou un résidu précis est difficilement appréhendable de façon directe tant ces objets et le réseau d'interactions qui les relie, sont complexes. Certains d'entre eux sont clairement indispensables, d'autres permettent juste de moduler ou d'optimiser l'activité de l'ensemble, quand d'autres peuvent même paraître superflus. L'approche la plus courante pour aborder une telle problématique consiste à déstabiliser sciemment la fonction étudiée avant de mesurer les conséquences de cette modification. Pour cela, nous devons juste être capables de remanier de façon ciblée et/ou contrôlée ces objets. C'est la force de la biologie moléculaire, par sa simplicité, sa rapidité, et sa fiabilité d'offrir aujourd'hui tout un panel d'outils permettant d'introduire ces modifications, que ce soit de façon prédéfinie ou aléatoire.

Quand le généticien choisit de déléter un gène et de suivre l'influence de cette modification sur le phénotype de l'organisme étudié, le biochimiste préfère isoler cette fonction d'intérêt, en étudiant seulement la protéine ou juste le domaine protéique concerné, avant d'y introduire des mutations et d'en mesurer les répercussions. Il existe en réalité toute une gamme de techniques permettant d'introduire des mutations ponctuelles ou plus globales au sein d'une protéine : la mutagenèse dirigée en utilisant des oligonucléotides synthétiques, la mutagenèse aléatoire via des « error-prone » PCR, la mutagenèse *in vivo* via des composés mutagènes, ou encore le DNA-shuffling (Fox and Huisman, 2008; Parales and Ditty, 2005; Wang et al., 2006; Yuan et al., 2005). Cette dernière méthode consiste en une fragmentation aléatoire d'échantillons d'ADN parentaux suivie d'une recombinaison de ces fragments.



Mais les méthodes de mutagenèse ne s'adressent qu'à un gène parental unique et sont très dépendantes de la propension de ce gène à accepter des mutations (Wang et al., 2006) ; elles ne s'appliquent donc qu'à l'étude d'un nombre restreint d'acides aminés, comme par exemple les résidus d'un site catalytique. De plus, le taux de mutants inactifs produits est malheureusement souvent élevé.

Tout comme les méthodes de mutagénèse, le DNA-shuffling ne nécessite pas obligatoirement une connaissance structurale précise de la protéine étudiée, mais il n'est applicable que si les gènes parentaux partagent des homologies de séquences suffisamment élevées (> 70 %) afin d'assurer un bon taux de recombinaison efficace. De plus, ces méthodes dites aléatoires produisent un très grand nombre de variants et la caractérisation de ces bibliothèques nécessite alors un test de fonctionnalité dont la mise en œuvre doit être rapide et peu coûteuse.

La CPR est une protéine multidomaine qui transfère des électrons au travers de deux domaines catalytiques distincts. Lorsqu'on s'interroge sur le fonctionnement global d'une telle protéine, il ne s'agit plus de cibler les quelques résidus d'un site actif précis, la CPR ne possédant d'ailleurs pas de site actif à proprement parler. Notre démarche vise plutôt à comprendre le rôle de chacun des domaines, catalytiques ou connecteurs, et leur mode de « communication ». Les zones d'intérêts de la protéine correspondent alors aux interfaces entre ces domaines, lieu de la reconnaissance et des interactions. La chimérogénèse semble alors la méthode idéale pour interroger ces interfaces entre domaines sans en perturber le repliement propre.



Figure 35 : Poussins de caille, de chimère caille-poulet et de poulet (Teillet et al., 2008).

Une problématique assez semblable a été brillamment abordé par Nicole Le Douarin à l'échelle non pas de la molécule mais de l'organisme entier. N. Le Douarin a développé la fabrication de chimères cailles-poulets au niveau embryonnaire (**Figure 35**) afin de suivre le destin de cellules de caille, dont le développement est tout à fait intégré à celui de l'embryon de poulet, mais dont les noyaux cellulaires sont discernables. Cette technique a révolutionné le domaine du développement embryonnaire, en

permettant des observations très importantes, en particulier sur le devenir de la crête neuronale (Le Douarin et al., 2004; Teillet et al., 2008). Le rôle de telle ou telle partie de cette crête neuronale et leur devenir au cours du développement embryonnaire ont ainsi pu être suivis et attribués.

Notre démarche de chimérogénèse à l'échelle de la protéine est assez analogue : combiner les gènes de deux protéines multidomaines, *a priori* compatibles puisque correspondant à la même fonction et à des structures très proches, mais clairement différenciables par leurs comportements biochimiques. En modifiant de façon réfléchie des protéines, tout en respectant la conservation de certaines séquences ou certaines relations structure-fonction, les variants ainsi construits sont non seulement moins nombreux que via des méthodes de mutagénèse aléatoire, mais surtout plus pertinents (Fox and Huisman, 2008). Ce design rationnel appliqué à des protéines multidomaines revient finalement à définir les domaines comme des entités non fragmentables mais pouvant facilement s'associer et se substituer les uns aux autres. Il est alors possible de suivre le devenir d'un domaine « transplanté » dans une protéine analogue mais issu d'un organisme différent, et de comprendre au travers du comportement biochimique de cette nouvelle chimère le rôle de ce domaine précis.

La chimérogénèse de protéines multidomaines permet alors de répondre à des interrogations :

- Est-il possible d'échanger des domaines ayant évolué séparément depuis plusieurs millions d'années ?
- Existe-t-il dans une protéine multidomaine un domaine directeur qui imposerait son comportement au reste de la protéine ?
- Sommes-nous capables au niveau ingénierie des protéines de mélanger des fonctions ayant évolué parallèlement ?

Les réponses à ces questions permettraient de mieux comprendre les règles régissant l'association de domaines en protéines multidomaines. Ces domaines sont presque par définition des entités capables de se combiner à partir du moment où leur structure interne reste intacte (Apic et al., 2001; Friedberg, 2010). Leur assemblage décrit alors l'architecture d'une protéine (Chothia and Gough, 2009). Bashton et Chothia font une analogie entre les règles de grammaire qui régissent une langue et celles s'appliquant à la combinaison de gènes et à l'architecture de protéines multidomaines (Bashton and Chothia, 2007). Les modifications subies par un domaine dans telle ou telle protéine sont dues au positionnement de ce domaine dans une nouvelle architecture protéique ou « syntaxe » ; la présence d'autres domaines pouvant augmenter, altérer ou moduler la fonction de ce premier domaine. En grammaire, la syntaxe dicte l'ordre des mots formant une phrase. La signification de chacun prend alors sens au sein de cette nouvelle phrase, et peut être modifiée par l'ajout ou le remplacement de certains mots appropriés ; tandis que l'ajout de mots inappropriés rendrait cette même phrase absurde. De la même façon, la chimérogénèse interroge les règles grammaticales régissant la syntaxe de la combinaison de domaines, les possibilités d'échanger ou de rajouter des nouveaux domaines, et leurs implications sur l'activité globale d'une protéine multidomaine (George and Heringa, 2002; Grunberg et al., 2010; Hurt et al., 2003).

5.2. La chimérogénèse des systèmes P450

La diversification des systèmes P450 constitue en soi un exemple de chimérogénèse naturelle au cours de l'évolution. La compatibilité des systèmes de transports d'électrons qui s'avèrent souvent interchangeables, associée à la variété de P450 existants font de ces systèmes des sujets idéaux de chimérogénèse. En 2009, Hlavica référence une vingtaine d'exemples de systèmes P450 synthétiques indépendants issus de la fusion ou de la substitution de différents types de composants connus (Hlavica, 2009). La plupart de ces travaux prennent pour modèle le P450-BM3, et présentent des fusions de systèmes de transports d'électrons indépendants avec différents cytochromes (Shiota et al., 2000). Ces derniers présentent d'ailleurs des activités voisines, voir même légèrement supérieures à celles des systèmes reconstitués à partir des composants isolés (Dodhia et al., 2006; Sakaki et al., 1994).

La substitution de domaine est également utilisée pour aborder le rôle des interactions membranaires dans la formation des complexes CPR-P450 et cyt b_5 -P450. Ainsi le remplacement de la partie N-terminale de la CPR de rat par la partie C-terminale du cyt b_5 , toutes deux ayant le même rôle d'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique, conserve l'activité native chez la CPR chimérique. Cette dernière assure correctement le transfert électronique vers différents P450 mais sa spécificité s'en trouve par contre modifiée (Gilep et al., 2001a). Les fusions plus globales de CPR avec la totalité d'un cyt b_5 , ou même tripartite entre CPR, cyt b_5 et P450 mettent aussi en évidence la

capacité de la CPR à réduire le cyt b_5 avant que celui-ci ne transfère les électrons vers le P450 (Gilep et al., 2001b; Inui et al., 2007).

Ces nombreux exemples de fusions de composants au sein des systèmes P450 ciblent généralement soit une possible augmentation ou spécification de l'activité catalytique du cytochrome, soit une meilleure compréhension des interactions globales et de la reconnaissance entre ces partenaires. Mais rares sont celles s'adressant au rôle spécifique de chacun des domaines ou encore à la nature dynamique de ces complexes. Cette approche a par contre été utilisée à maintes reprises au sujet de la NOS. De nombreuses chimères contenant des domaines issus des trois différents types de NOS mammifères (voir § 4.5.3) ont été construites et étudiées (Adak et al., 2001; Haque et al., 2007; Ruan et al., 1996). Ces travaux ont permis de mieux appréhender le rôle de différents domaines, leur interdépendance, et l'origine des divergences biochimiques entre les NOS (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Activité nitrique oxyde synthase (NOS) des chimères de NOS endothéliale (eNOS, vert clair) ; neuronale (nNOS, vert) et inducible (iNOS, vert foncé). La description de la nature des domaines fait référence à la couleur des NOS parentales. Hème : domaine oxygénase ; CaM : domaine de fixation de la CaM, FMN : domaine FMN ou transporteur et FAD : domaine FAD/NADPH ou oxydoréductase. Les activités sont indiquées en pourcentage par rapport à l'activité de la iNOS qui est la plus active des trois isoenzymes.

Diflavine réductase	Nature des domaines				% Activité NOS	Référence
	Hème	CaM	FMN	FAD		
eNOS					10	
nNOS					60	
iNOS					100	
iNOS-nCaM					100	(Ruan et al., 1996)
nNOS-iCaM					30	(Ruan et al., 1996)
iOx-nRed					100	(Ruan et al., 1996)
nOx-iRed					0	(Ruan et al., 1996)
eOx-nRed					60	(Adak et al., 2001)
nOx-eRed					20	(Adak et al., 2001)
eNOS-nCaM					40	(Haque et al., 2007)

Par ailleurs, des chimères mélangeant des domaines de la nNOS et de la CPR de rat ont été construites (**Tableau 4**) (Roman et al., 2003). Bien que ces travaux s'intéressent plutôt au rôle des différents domaines sur l'activité NO synthase, ils démontrent également que la présence du domaine oxygénase (hème) affecte fortement l'activité de la réductase ; le domaine FMN de la CPR ne pouvant pas remplacer celui de la nNOS même en conservant le domaine de fixation de la CaM. Les domaines FAD sont par contre parfaitement interchangeables. Des publications postérieures font même référence à une chimère CPR-NOS dont l'activité cyt c serait augmentée d'un facteur 7 par rapport à celle de la NOS parentale (Porter et al., 2005), mais ces résultats ont été publiés sans aucune précision.

Tableau 4 : Activité nitrique oxyde synthase (NOS), cyt *c* et ferricyanure (ferric.) réductases des chimères de nNOS (rose) et de CPR de rat (vert). La description de la nature des domaines fait référence à la couleur des diflavines réductases parentales. Hème : domaine oxygénase ; CaM : domaine de fixation de la CaM, FMN : domaine FMN ou transporteur et FAD : domaine FAD/NADPH ou oxydoréductase. Les activités sont indiquées en pourcentage par rapport à l'activité de la nNOS.

Diflavine réductase	Nature des domaines				% Activité			Référence
	Hème	CaM	FMN	FAD	NOS	cyt <i>c</i>	ferric.	
nNOS					100	100	100	
CPR						75	20	
NNC					>100	50	50	(Roman et al., 2003)
NCN					≈0	15	>100	(Roman et al., 2003)
NCC						>100	50	(Roman et al., 2003)

Ces différentes chimères entre isoformes de la NOS et entre NOS et CPR démontrent bien la possibilité d'interchanger des domaines de diflavines réductases assez éloignées tout en conservant totalement ou partiellement leur activité catalytique. Il est donc possible d'appliquer une telle chimérogénèse à des CPR issus d'organismes tels que l'humain et la levure afin de déterminer le rôle de chacun des domaines sur le comportement général de l'enzyme.

5.3. Construction de CPR chimères

Le projet de recherche de mon doctorat consiste en l'élaboration de CPR chimériques et la comparaison des propriétés structurales et biochimiques de ces chimères avec celles des protéines parentales. Ce projet se basait à l'origine sur deux observations considérées comme des gages de réussite :

- Les systèmes P450 s'avèrent particulièrement flexibles, malléables et souples vis-à-vis de la substitution de certains composants ou de parties de ces composants.
- L'utilisation de domaine entier comme unité de construction est bien moins risquée que l'introduction de plusieurs mutations ponctuelles au sein de domaines protéiques.
- La construction de chimères apporte une information globale et directe sur la reconnaissance aux interfaces des domaines et le rôle spécifique de chacun.

Les CPR issus d'organismes éloignés tels que l'humain et la levure sont certes structurellement très similaires, mais présentent des caractéristiques biochimiques dissemblables, l'origine de ces divergences restant encore inconnue. Par ailleurs, plusieurs observations expérimentales et réflexions concernant les structures de CPR et leur mécanisme laissent penser que des changements conformationnels importants ont lieu entre les domaines de la CPR au cours de son cycle catalytique. La construction et l'analyse de CPR chimériques avaient alors pour but de s'adresser au caractère supposé dynamique de cette protéine multidomaine et au rôle de chacun de ses domaines sur le comportement global de la protéine. Concrètement, j'ai tenté de répondre au cours de ma thèse, aux questions suivantes :

- Quelle est l'origine de l'hétérogénéité des propriétés biochimiques des différentes CPR qui présentent pourtant des structures analogues ?

- Ces divergences sont-elles dues à un domaine particulier de la CPR capable de dicter son comportement au reste de la protéine ?
- Quel est la fonction du domaine de connexion ? Joue-t-il le rôle de transmetteur d'information entre les domaines catalytiques ? Subit-il une réorganisation conformationnelle au cours du cycle catalytique de la CPR ? Ou à l'inverse, impose-t-il de tels réarrangements ?
- Si des conformations différentes de celle déjà connue en 2007 (conformation fermée) existent, est-il possible de les piéger et de les caractériser ?
- Par ailleurs, est-il aussi possible de caractériser les propriétés dynamiques de la CPR *in vitro* ?

MATERIELS
ET
METHODES

1. Matériel

1.1. Souches

Les souches de bactéries *E. coli* utilisées sont de type TOP10 pour l'amplification des plasmides et DH5 α F'IQ, BL21-DE3, BL21-C41 et BL21-43 (Invitrogen) pour les différents tests d'expression de CPR recombinantes (Invitrogen). La souche *E. coli* ER2566 vendue dans le kit IMPACT™-TWIN (New England Biolabs) a permis la surexpression de chaque partie de CPR fusionnée à des intéines.

La souche de levure *S. cerevisiae* utilisées est la W(R) $\Delta\alpha$: *MAT α* , *ade2-1*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *his3-11, 15*, *ura3-1*, *YCPR ::TRP1*. Cette souche n'exprime pas le gène de la CPR membranaire endogène de levure (Ym) (Truan, Cullin et al. 1993).

Les levures peuvent être cultivées soit en milieu riche glucosé (YPG), galactosé (YPGal), avec de l'éthanol (YPGE), soit en milieu minimum synthétique glucosé (SW10) ou galactosé (SW5), les auxotrophies de chaque souche étant alors complémentées par les bases (A=adénine, B=uracile) ou les acides aminés adéquats. La croissance en SW10 inhibe la production de CPR recombinants inclus dans un vecteur de type pYeDP60, tandis que la croissance en SW5 induit cette expression.

1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés sont :

- Vecteurs commerciaux :
 - pPCR Script (Stratagène) pour le séquençage des produits de PCR ;
 - pET-15b (Novagen) pour l'expression des CPR solubles ;
 - pTWIN1 (New England Biolabs) pour l'expression des parties de CPR fusionnées aux intéines ;
- pYeDP60 (Pompon, Louerat et al. 1996) pour l'expression des CPR membranaires dans la levure.

2. Méthode

2.1. Construction de biologie moléculaire

2.1.1. PCR

2.1.1.1. Oligonucléotides

Tableau 5 : Liste des numéros, noms et séquences des différents oligonucléotides utilisés.

N°	Nom	Séquence
1	S-Y-FMN-H-FAD	GGTTTTGAAAGACGAACTGGGGGTGGAAGCCACTGGCGAGG
2	R-Y-FMN-H-FAD	CCTCGCCAGTGGCTTCCACCCCAGTTCGTCTTTCAAACC
3	S-H-FMN-Y-FAD	GGCCGTGTGTGAACACTTTCATTTGGACGAACAGGAAGCC
4	R-H-FMN-Y-FAD	GGCTTCTGTTCGTCCAAATGAAAGTGTTCACACACGGCC
5	R-H-FAD	GCGAGATCTTACTAGCTCCACACGTCCAGGG
6	R-Y-FAD	CGCAGATCTATTACCAGACATCTTCTTGG
7	S-H-FMN-sol	GACCTCGAGTCCTCTGTCTAGAGAGAGCAGC
8	S-Y-FMN-sol	GACCTCGAGAGCTCGGGCAACAGAGACATTG
9	S-H-FMN-memb	GCCACATGTCCGACTCCCACGTGGACACC
10	S-Y-FMN-memb	GCCACATGTCCTTTGGAATAGACAAC
30	S-H-FMN-sol	CAAGAACTGATGACCTGTGGCCGCTACTCCCTGGACG
32	R-H-FMN	GGTGGTTGCTCTTCCGCACATTTCCACCCAAAGTG
33	S-H-FAD	GGTGGTTGCTCTTCCAAGTGTGGCGACCACTGGACG
34	R-H-FAD	GCGGATCCCTACTACGTCCACACGTCCAGGGA
35	S-Y-FMN-sol	GCCATATGAGCTCGGGCAACAGAGACATTGC
37	R-Y-FMN	GGTGGTTGCTCTTCCGCACATGTCCAAATGCAGTTCGTC
38	S-Y-FAD	GGTGGTTGCTCTTCCAAGTGTGAAGCCAAGTTCACCTCTC
39	R-Y-FAD	GCAGATCTTTATTACCAGACATCTTCTTGGTA
41	S-H-memb-pGal	ACACAAATACACACACTAAATTACCGGATCATGGGAGACTCCCACGTGGACACC
42	R-H-memb-tPGK	CCCCGCGAATTCGAGCTCGGTACCCCTAGCTCCACACGTCCAGGG
43	S-Y-memb-pGal	ACACAAATACACACACTAAATTACCGGATCATGCCGTTTGGGAATAGACAAC
44	R-Y-memb-tPGK	AGTAGAGACATGGGAGATCCCCCGCAATTTTACCAGACATCTTCTTGG

2.1.1.2. Modes opératoires et programmes

Lors des amplifications par PCR, les échantillons d'un volume final de 50 μ L contenaient :

- un mélange équimolaire de dNTPs à 10 μ M
- l'ADN matrice à 0,2 ng/ μ L
- les oligonucléotides sens et reverse à 200 nM
- 1 μ L de Pfu Polymérase (Proméga).

Les domaines FMN solubles ou membranaires et FAD/NADPH des deux CPR parentales H et Y ont été amplifiés à partir des plasmides H-pYeDPV60 et Y-pYeDPV60 selon le programme LOUISE1 (**Tableau 7**). Les produits de cette première PCR ont servis de matrice lors de la seconde PCR fusion via le programme LOUISE2 (**Tableau 8**) avant leur introduction dans le vecteur d'expression bactérien pET-15b.

Les gènes des CPR chimères membranaires HYm et YHm ont été amplifiées selon le programme de PCR LOUISE7 (**Tableau 9**) afin d'être introduits dans le vecteur d'expression de levure pYeDPV60.

Les domaines FMN solubles et FAD/NADPH des Ys et Hs après mutagenèse dirigée (Ymut et Hmut, voir § 2.1.6) ont également été amplifiés selon le même programme de PCR LOUISE1 (**Tableau 7**) afin d'être introduit dans le vecteur pTWIN1.

Tableau 6 : Description des oligonucléotides utilisés pour chacune des amplifications.

Produit de PCR	N° oligo. sens	N° oligo. reverse	But
Y-FMN-sol.	8	2	Fusion avec H-FAD pour construire YH soluble
Y-FMN-memb.	10	2	Fusion avec H-FAD pour construire YH membranaire
Y-FAD	3	6	Fusion avec H-FMN pour construire HY
H-FMN-sol.	7	4	Fusion avec Y-FAD pour construire HY soluble
H-FMN-memb.	9	4	Fusion avec Y-FAD pour construire HY membranaire
H-FAD	1	5	Fusion avec Y-FMN pour construire YH
HY-sol.	7	6	Insertion dans pET-15b
HY-memb.	9	6	Insertion dans pET-15b
YH-sol.	8	5	Insertion dans pET-15b
YH-memb.	10	5	Insertion dans pET-15b
HY	41	44	Insertion dans pYeDPV60
YH	43	42	Insertion dans pYeDPV60
Ymut-FMN-sol	35	37	Insertion dans pTWIN1
Ymut-FAD	38	39	Insertion dans pTWIN1
Hmut-FMN-sol	30	32	Insertion dans pTWIN1
Hmut-FAD	33	34	Insertion dans pTWIN1

Tableau 7 : Programme de PCR pour l'amplification des domaines FMN solubles ou membranaires et FAD/NADPH de Y et H (Programme LOUISE1).

Etapes	Température (°C)	Temps (min)
Dénaturation	95	5
Dénaturation	95	1
Hybridation		1
Amplification	68	1,5
Amplification		5

30 cycles

Tableau 8 : Programme de PCR pour la fusion des domaines FMN solubles ou membranaires avec les domaines FAD/NADPH de Y et H afin de construire les gènes chimériques HY et YH solubles et membranaires (Programme LOUISE2).

Etapes	Température (°C)	Temps (min)
Dénaturation	95	5
Dénaturation	95	1
Hybridation		1
Amplification	68	2,5
Amplification		5

30 cycles

Tableau 9 : Programme de PCR pour l'amplification des CPR membranaires (Programme LOUISE7).

Etapes	Température (°C)	Temps (min)	
Dénaturation	95	5	
Dénaturation	95	1	25 cycles
Hybridation	59	1	
Amplification	68	2,5	
Amplification	68	5	

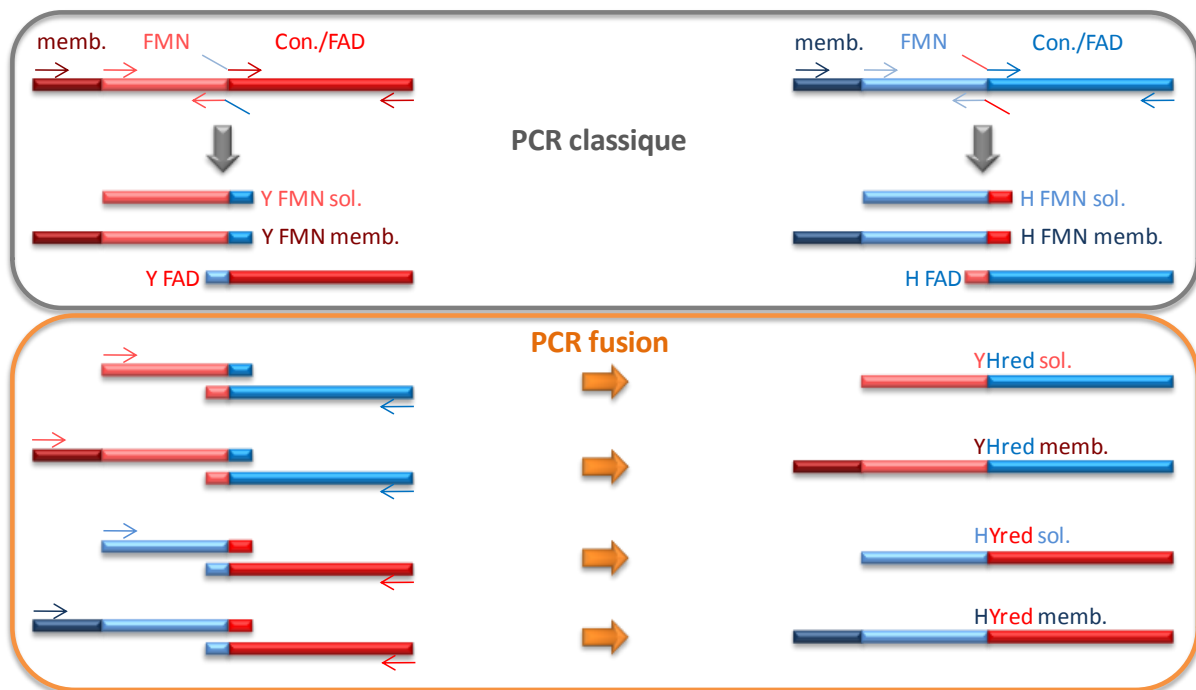


Figure 36 : Construction des gènes chimériques par PCR fusion. Les différentes parties des gènes de Y et H sont respectivement indiquées en rouge et bleu. Cadre gris : première PCR classique, chaque partie de chaque CPR est amplifiée séparément ; les oligonucléotides des extrémités correspondant aux futurs points de jonction dans les chimères possèdent des extrémités flottantes d'une vingtaine de paires de bases complémentaires de l'autre moitié de l'autre CPR (flèches bicolores rouges/bleues). Cadre jaune : seconde PCR, permet la fusion par hybridation complémentaire des deux séquences issues d'organismes différents.

Les gènes chimériques ont été construits par PCR fusion. Ce processus décrit dans la **Figure 36** comprend deux étapes successives d'amplification :

1. une première PCR au cours de laquelle les gènes de chacune des parties (FMN et connexion/FAD) sont amplifiés séparément. Le design d'oligonucléotides particuliers au niveau des futurs points de jonctions a permis la fusion de ces produits de PCR dans l'étape suivante.
2. une seconde PCR permettant la fusion des différents produits de la première amplification en utilisant comme matrice un domaine FMN et un domaine connexion/FAD d'origine différente.

2.1.2. Clonage

Après amplification, les produits de PCR ont été purifiés grâce au kit NucleoSpin Extract II (Clontech) avant d'être digérés par des enzymes de restriction tels que décrit dans le **Tableau 10**. Les inserts ainsi digérés ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. Une étape de ligation (T4 ligase) a ensuite permis l'introduction des inserts purifiés dans les vecteurs eux-mêmes digérés avec des enzymes de restriction soit identiques soit compatibles avec ceux utilisés pour les inserts. Les étapes suivantes des clonages sont alors la transformation permettant l'introduction de ces plasmides recombinants au sein de cellules hôtes (voir § 1.1 pour le choix des souches), l'extraction de l'ADN plasmidique amplifié (mini-prép.), son séquençage et, après vérification de l'absence de toute mutation dans la séquence du plasmide, son amplification et purification (Méthode Lacroute).

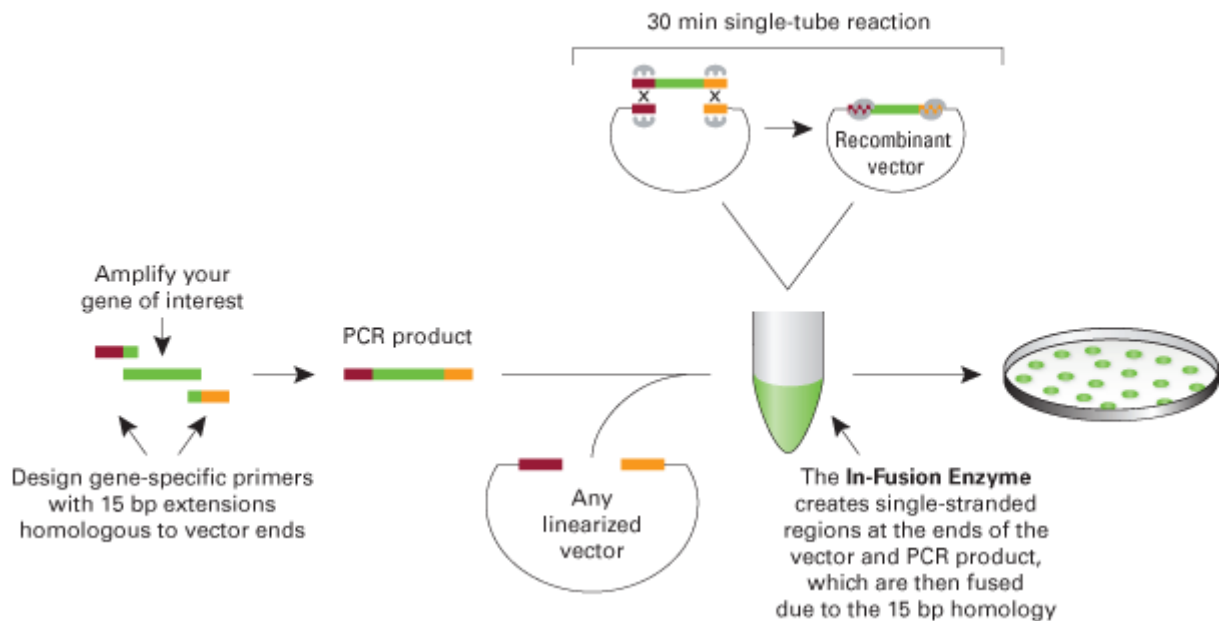


Figure 37 : Principe du clonage avec le kit In-fusion Advantage PCR cloning (Clontech).

Les gènes codant pour les CPR membranaires chimères, HYm et YHm, ont été clonés dans le vecteur d'expression pYeDPV60 via le kit In-fusion Advantage PCR cloning (Clontech). Les inserts ont été amplifiés avec des oligonucléotides particuliers comprenant des extrémités flottantes (15 pb minimum) homologues à la séquence du vecteur au niveau souhaité de l'insertion. Cette technique permet de s'affranchir des étapes de purifications, de digestions et de ligation d'un clonage classique. Seul le vecteur subit une digestion afin d'être linéarisé et de permettre l'insertion de la séquence cible (**Figure 37**). Les plasmides HYm-V60 et YHm-V60 ainsi construits ont ensuite été introduits dans la levure afin de permettre la surexpression et la purification des chimères membranaires.

Le principe du clonage au sein du vecteur pTWIN1 pour fusionner chaque partie des CPR parentales à une intéine est décrit dans la **Figure 38**. Les parties FMN et connexion/FAD ont été clonées dans le vecteur pTWIN1 de façon à fusionner les extrémités N- ou C-terminales des domaines FMN ou FAD avec le gène codant respectivement pour les intéines *Mxe* ou *Ssp* contenus dans la séquence de pTWIN1.

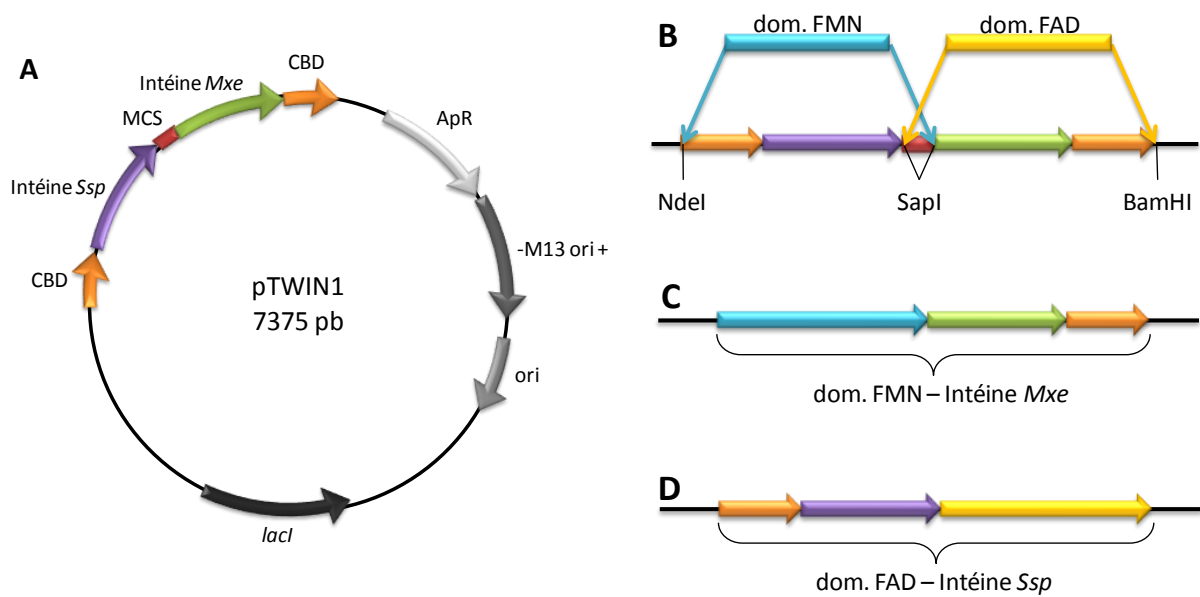


Figure 38 : Principe du clonage dans le vecteur pTWIN1. Flèches oranges : CBD : domaine de fixation à la chitine (chitin binding domain) ; flèches violettes : Intéine *Ssp* ; boîtes rouges : MCS : multi-cloning site ; flèches vertes : Intéine *Mxe*. A. Carte du vecteur pTWIN1 ; B. Les domaines FMN des CPR Ys ou Hs ont été clonés en amont de l'intéine *Mxe* après avoir retiré la séquence codant pour le premier CBD et l'intéine *Ssp*. Les domaines FAD ont été clonés de la même façon en aval de l'intéine *Ssp*, à la place de l'intéine *Mxe* et du second CBD ; C. Plasmide pTWIN1 après clonage des domaines FMN de Hs ou Ys. D. Plasmide pTWIN1 après clonage des domaines FAD.

Tableau 10 : Description des clonages et du choix des enzymes de restriction pour chaque insert et chaque vecteur.

Insert		Vecteur		Plasmide		
Nom	enz. 1	enz. 2	Nom	enz. 1	enz. 2	Nom
HY-sol.	XhoI	BglII	pET-15b	XhoI	BamHI	HYs-pET15b
HY-memb.	PciI	BglII	pET-15b	NcoI	BamHI	HYm-pET15b
YH-sol.	XhoI	BglII	pET-15b	XhoI	BamHI	YHs-pET15b
YH-memb.	PciI	BglII	pET-15b	NcoI	BamHI	YHm-pET15b
HY	-	-	pYeDPV60	EcoRI	BamHI	HYm-V60
YH	-	-	pYeDPV60	EcoRI	BamHI	YHm-V60
Ymut-FMN-sol	SapI	NdeI	pTWIN1	SapI	NdeI	Y-FMN-Mxe-pTWIN1
Ymut-FAD	SapI	BglII	pTWIN1	SapI	BamHI	Y-FAD-Ssp-pTWIN1
Hmut-FMN-sol	SapI	NdeI	pTWIN1	SapI	NdeI	H-FMN-Mxe-pTWIN1
Hmut-FAD	SapI	BamHI	pTWIN1	SapI	BamHI	H-FAD-Ssp-pTWIN1

2.1.3. Transformations

2.1.3.1. Transformation dans des bactéries chimio-compétentes

Fabrication de cellules chimio-compétentes :

- Piquer un aliquot de cellules souches (-80°C) sur une boîte de LB
- Culture 1 nuit à 37°C
- Strier la culture afin d'obtenir des clones uniques
- Culture 1 journée à 37°C
- Piquer un clone dans 50 mL de LB
- Culture une nuit à 37°C
- Diluer dans 100 mL de LB pour atteindre un $DO_{600nm} = 0,025$
- Quand la $DO_{600nm} \in [0,7 ; 0,8]$, refroidir la culture dans la glace

- Centrifuger 15 min à 3000 rpm à 4°C
- Diluer le culot dans 10 mL de CaCl₂
- Répéter les 2 étapes précédentes avec 5 mL puis 1 mL de CaCl₂
- Laisser à 4°C pendant 4-5 h
- Conserver des aliquots de 50 µL à -80°C dans 20 % glycérol
- Ajouter à un aliquot de cellules chimio-compétentes décongelées sur la glace 5 µL de produit de ligation
- Laisser 15 min dans la glace
- Choc thermique de 45 s à 42°C
- Laisser 2 min dans la glace
- Ajout de 1 mL de SOC préchauffé à 37°C
- Incuber 1h à 37°C
- Centrifuger 1 min à 6000 rpm
- Reprendre le culot dans 100 µL de SOC
- Etaler sur des boîtes de sélection
- Incuber 1 nuit à 37°C

SOC (pour 100 mL)

LB 2X

0,25 mL KCl 1M stérile

1 mL MgSO₄ 2M stérile

2 mL de glucose 20 % ou 1M stérile

2.1.3.2. Transformation dans des bactéries électro-compétentes

Fabrication de cellules électro-compétentes :

- Piquer des cellules souches (-80°C) sur une boîte de LB
- Culture 1 nuit à 37°C
- Strier la culture afin d'obtenir des clones uniques
- Culture 1 journée à 37°C
- Piquer un clone dans 50 mL de LB
- Culture 1 nuit à 37°C
- Diluer dans 2 L de tampon (1 L de LB + 5 mL de MgSO₄ + 5 mL de MgCl₂, 20 mM final en Mg) pour atteindre un DO_{600nm} = 0,025
- Quand la DO_{600nm} ∈ [0,7 ; 0,8], refroidir la culture dans la glace
- Centrifuger 20 min à 3000 rpm à 4°C
- Diluer et réunir les culots dans 1 L d'H₂O_{dd}
- Répéter les 2 étapes précédentes avec 500 mL et 250 mL d'H₂O_{dd} puis avec 125 mL, 40 mL, 25 mL, 10 mL et 2 mL d' H₂O_{dd} + 10 % glycérol
- Conserver des aliquots de 50 µL à -80°C

Transformation

- Ajouter à un aliquot de cellules électro-compétentes décongelées sur la glace 1 µL de produit de ligation
- Transférer dans des cuves d'électroporation refroidies dans la glace

- Choc électrique à 2500 V (constante de temps > 5)
- Reprendre les cellules dans 500 µL de SOC
- Incuber 1h à 37°C
- Centrifuger 1 min à 6000 rpm
- Reprendre le culot dans 100 µL de SOC
- Etaler sur des boîtes de sélection
- Incuber 1 nuit à 37°C

2.1.3.3. Transformation dans la levure

Fabrication des cellules compétentes :

- Ensemencer 50 mL de YPGA à la $DO_{600\text{ nm}}=0,2$
- Culture à 29°C jusqu'à $DO_{600\text{ nm}}=0,6$
- Centrifuger 3 min à 5000 rpm
- Reprendre le culot dans 2 mL d' H_2O_{dd}
- Transférer dans un eppendorf de 2 mL
- Laver 2 fois avec 2 mL d' H_2O_{dd} en centrifugeant 1 min à 5000 rpm
- Laver 2 fois avec 2 mL de TP lithium
- Reprendre dans 100-150 µL de TP lithium
- Incuber 15 min à 30°C

Transformation

- Mélanger :
 - 50 µL de cellules compétentes
 - 50 µg d'ADN de sperme de hareng dénaturé (à 100°C)
 - 1 à 2 µg d'ADN transformant (5µL max)
- Ajouter 350 µL de tampon PEG (ou 300 µL PEG 4000 50 % + 50 µL TP lithium 10X)
- Mélanger par inversion
- Incuber 30 min à 30°C
- Choc thermique 20 min à 42°C
- Ajouter 700 µL de Ringer
- Centrifuger 30 s à 5000 rpm
- Laver dans 2 mL de Ringer
- Reprendre dans 1 mL de Ringer
- Etaler 100 µL par boîte de sélection
- Culture de 72 h à 29°C

Tampon lithium	Tampon PEG	YPGA
100 mM acétate de lithium	40 % polyéthylène glycol 4000	1 % Yeast Extract
10 mM Tris-HCl	100 mM acétate de lithium	1 % peptone
1 mM EDTA	10 mM Tris-HCl pH 7,5	2 % glucose
	1 mM EDTA	40 mg/L adénine

2.1.4. Extraction et purification d'ADN plasmidique

2.1.4.1. Mini-préparations

Les mini-préparations d'ADN ont été effectuées avec le kit PureYield™ Plasmid Miniprep System de Proméga.

2.1.4.2. Méthode Lacroute

Les maxi-préparations d'ADN ont été effectuées selon la méthode mise au point par François Lacroute :

- Piquer un clone dans 200 µL de LB
- Etaler sur 2 boîtes de LB +Ampicilline
- Incuber 1 nuit à 37°C
- Reprendre les cellules avec 1 mL de TP STE dans un tube Corex de 15 mL
- Ajouter 2 mg de lysozyme
- Vortexer rapidement
- Incuber 2 min à T_{amb}
- Ajouter 5 mL de TP STET
- Mélanger par inversion
- Incuber 10-15 min à T_{amb}
- Incuber dans un bain marie à 100°C pendant 1 min 10 s
- Centrifuger 20 min à 14000 rpm
- Vider le surnageant dans un tube Corex de 15 mL
- Ajouter 5 mL d'isopropanol
- Mélanger par inversion
- Centrifuger 10 min à 14000 rpm
- Vider le surnageant et bien égoutter pendant 5 min sur du papier absorbant
- Reprendre dans 500 µL de TE pH8
- Transférer dans des eppendorfs de 1,5 mL
- Ajouter 20 µL de RNase 10 mg/mL
- Incuber 15 min à 45°C
- Incuber 15 min à 55°C
- Ajouter 50 µL de NaCl 5 M et 500 µL de phénol-chloroforme isoamylalcool (50 :49 :1) pH8
- Vortexer
- Centrifuger 2 min à 10000 rpm
- Recommencer une deuxième fois les 3 dernières étapes
- Précipiter le surnageant avec 1 mL d'éthanol 100 %
- Centrifuger 10 min à vitesse maximale
- Faire 2 lavages à l'éthanol 70 %
- Sécher
- Reprendre le culot dans 50 à 100 µL H₂O_{dd} ou de TE

Tampon STE	Tampon STET	LB
25 % glucose	8 % glucose	10 g de Tryptone
50 mM Tris-HCl pH8	50 mM Tris-HCl pH8	5 g de Yeast Extract
10 mM EDTA	10 mM EDTA	5 g de NaCl
	5 % Triton X 100	Ajuster de pH à 7,5 avec NaOH

2.1.5. Séquençage

Le séquençage a été effectué par l'entreprise GATC Biotech.

2.1.6. Mutagenèse dirigée

Grace au kit Multi-Site Directed Mutagenesis (Stratagène), jusqu'à 7 mutations ont pu être introduites dans une séquence de CPR. Concernant Ys, il s'agissait d'éliminer un site de restriction de NdeI (oligo n°16), de muter en sérine la cystéine de surface en position 93 (oligo n°17) et de muter en cystéine la sérine en position 683 afin de pouvoir fixer un fluorophore au domaine FAD (oligo n°18). La cystéine en position 135 à la surface du domaine FMN de Ys était déjà positionnée dans une région intéressante pour la fixation du second fluorophore et a donc été conservée. Concernant Hs, le site de restriction de SapI a du être muté (oligo n°19) ainsi que les nombreuses cystéines de surface en position 228, 363, 434 et 566 (respectivement oligo n°20, 21, 22 et 24). Enfin, les mutations Q157C et K668C (oligo n°40 et 25) ont été introduites sur les domaines FMN et FAD afin de permettre le double marquage.

Tableau 11 : Liste des numéros, noms et séquences des différents oligonucléotides utilisés lors des mutagenèses dirigées. Remarque : les oligonucléotides 59 et 60 ont juste permis de rattraper une mutation introduite par une erreur dans un autre oligonucléotide.

N°	Nom	Séquence
16	S-Y-a351c	CGATTTTTATCTCTACCTATGGTGAAGGAGACTTCCCCG
17	S-Y-t277a-C93S	CAACCTAAACGTGATGAGCGCAGATGTTGAGAACTACG
18	S-Y-c2048g-a2049t-S683C	CAAGATGCTCAAGACTTGTGGTAGATACCAAGAAGATGTC
19	S-H-c804t	GGGCCGGCTGAAGAGTTACGAGAACCAGAAGC
20	S-H-t682a-C228S	GCCGGCCGTGAGTGAACACTTTGGGGTGG
21	S-H-t1087a-C363S	GCACCCATTCCCGAGCCCTACGTCCTACC
22	S-H-t1300a-C434S	CCATCCTGCAGGACAGCCCGTCCCTGC
23	S-H-t1696a-C566S	GTACTACGGCAGCCCGCTCGGATGAGG
25	S-H-t1696a-C566S	CAAGAACTGATGACCTGTGGCCGCTACTCCCTGGACG
40	R-H-c469t-a470g-g471c-Q157C	CCAGAGAGATCCACGTCTGTCTCGCACAGCCAGTCGTAGAAG
59	S-H-T678S	CCCTGGACGTGTGGAGCTAGTAGGGATCCGGC
60	R-H-T678S	GCCGGATCCCTACTAGCTCCACACGTCCAGGG

2.2. Expression et purification

2.2.1. Les résines de chromatographie

2.2.1.1. Résine d'affinité pour les tags poly-histidines : TALON® Metal Affinity Resins (Clontech)

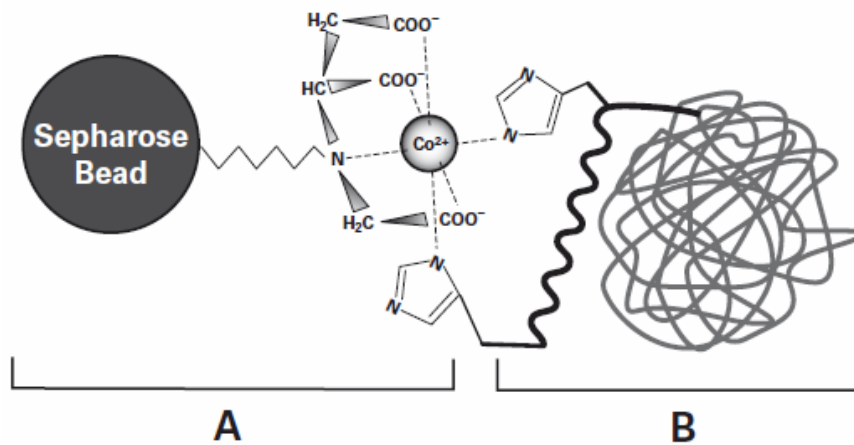


Figure 39 : Le système TALON ; A : Bille de sépharose portant le chélateur tétradentate de l'ion cobalt (Co^{2+}). B : La protéine portant un tag poly-histidine fixée à la résine.

2.2.1.2. Gel filtration : Superdex 200 (GE Healthcare)

La résine Superdex 200 est optimale pour la purification de protéine globulaire dont le poids moléculaire est entre $1,2 \cdot 10^2$ et $1,5 \cdot 10^3$ Da.

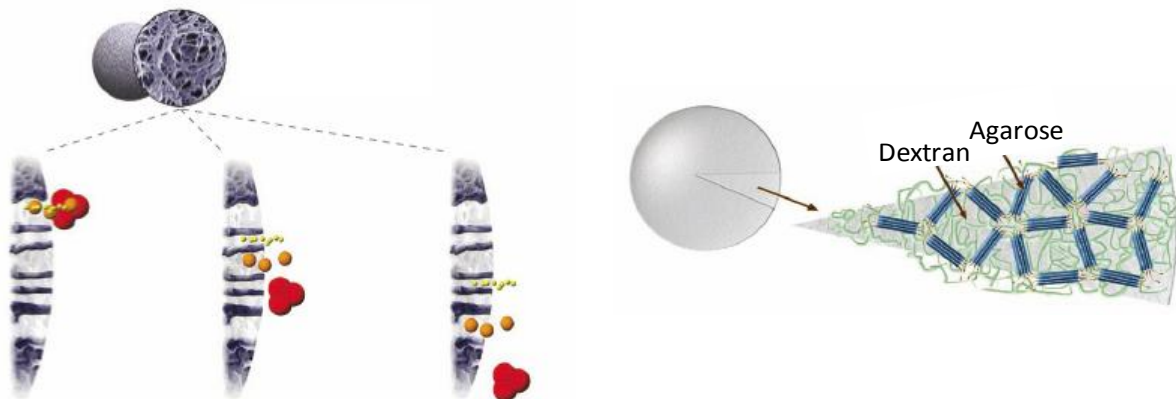


Figure 40 : Gauche : Principe de la gel-filtration. Les billes de résine poreuses retiennent les petites protéines tandis que les protéines plus volumineuses passent rapidement à travers le volume mort. Droite : Les billes de Superdex sont constituées de chaînes de dextran (vert) liées de façon covalente et crosslinkées dans une matrice d'agarose.

2.2.1.3. Les résines échangeuse d'anions : la DEAE Sephacel et la Mono-Q Sepharose

La DEAE Sephacel et la mono-Q Sepharose sont deux résines échangeuses d'anions, la première mettant en jeu des interactions plus faibles que la seconde.

Echangeurs d'anions		Groupe fonctionnel
Diéthylamioéthyl (DEAE)	faible	-O-CH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₂ CH ₂)
Ammonium quaternaire (Q)	forte	-O-CH ₂ N ⁺ H(CH ₃) ₃

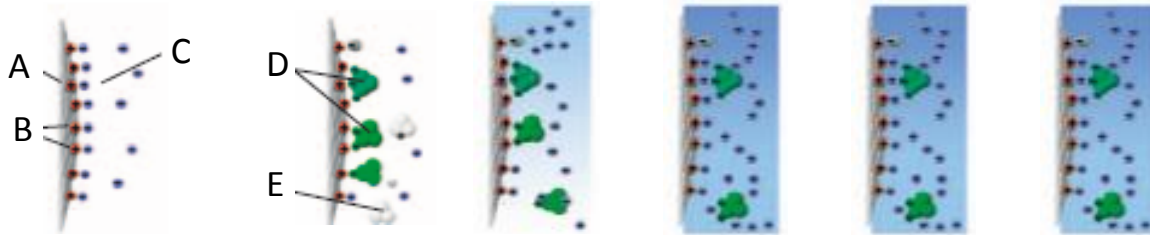


Figure 41 : Principe de la chromatographie échangeuse d'ions. A : Matrice, B : groupements fonctionnels chargés positivement, C : Tampon de faible force ionique, D : Protéines portant des charges négatives en surface, E : Protéines neutres ou chargées positivement. Les protéines chargées négativement remplacent les ions du tampon de faible force ionique en se fixant sur la colonne tandis que les protéines neutres ou chargées positivement ne sont pas retenues. Lorsque la force ionique (concentration saline) du tampon augmente, les protéines fixées sont éluées.

2.2.2. CPR solubles

Cultures :

- Ensemencer une préculture de 50 mL de LB+Ampicilline à partir d'aliquots conservés à -80°C
- Une nuit à 37°C
- Ensemencer une culture de 1 L de TB + Amp avec:
- 2 mL de riboflavine 0,5 mg/mL
- 2 mL de préculture
- 36 h à 29°C

Terrific Broth (TB) pour 1L, mélanger les 2 solutions extemporanément

12 g de tryptone	2,3 g de KH ₂ PO ₄ monobasique
24 g de Yeast Extract	12,5 g de K ₂ HPO ₄ dibasique
4 mL de glycérol	Ajuster le volume à 100 mL
Ajuster le volume jusqu'à 900 mL	

Purification : (toutes les étapes se font à 4°C)

- Centrifuger les cultures (centrifugeuse JA20 rotor JLA 19,1000) 10 min à 7500 rpm
- Reprendre dans 100 mL de 20 mM PO₄ + cocktail anti-protéases
- Lyse cellulaire avec le Cell Disruptor (Constant System LTD) en 2 passages consécutifs
- Centrifuger le lysat 1h à 8000 rpm
- Filtrer le surnageant sur un filtre papier
- Ajouter à la solution protéique 1 mM DTT + 0,25 M NaCl + 0,25 M KCl
- Colonne d'affinité pour les histidines tags (TALON® His-Tag Purification, Clontech) :
- Équilibrer en 20 mM PO₄ pH 7,4, 0,25 M NaCl, 0,25 M KCl
- Charger la solution protéique
- Laver avec du 20 mM PO₄ pH 7,4, 0,25 M NaCl, 0,25 M KCl

- Laver avec du 20 mM PO4 pH 7,4, 10 mM Imidazole
- Eluer avec du 20 mM PO4 pH 7,4, 250 mM Imidazole
- Concentrer la protéine avec des Vivaspinn 70 puis 15 (50.000 MWCO, Sartorius Stedium Biotech) pour atteindre un volume finale de 600 µL
- Colonne de tamisage moléculaire (résine Superdex 200 (GE Healthcare)) dans TP 20 mM PO4 pH7, 1 µM FMN, 1 µM FAD, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 % isoPrOH
- Changer le tampon sur une colonne de dessalage pour passer en du 10 mM Tris, 1 µM FMN, 1 µM FAD
- Conserver à 4°C

2.2.3. CPR membranaires

2.2.3.1. Expression dans la bactérie

Culture :

- Ensemencer une préculture de 50 mL de LBA avec un aliquot conservé à -80°C
- Culture à 37°C sur une nuit
- Ensemencer une culture de 1 L de TB + Amp avec:
 - 2 mL de riboflavine 0,5 mg/mL
 - 2 mL de préculture
- Culture de 36 h à 29°C

2.2.3.2. Expression et purification dans la levure

Culture :

- Ensemencer à partir de clones sur boîte une préculture en milieu minimum (SWA10) dans 1/20 du volume de la culture finale
- Culture de 24h à 30°C
- Ensemencer une culture avec la totalité de la préculture dans du milieu complet (YPGE)
- Culture de 48h à 30°C
- Induction au galactose (20 g/L)
- Surexpression sur la nuit à 30°C
- Préparation des microsomes : (toutes les étapes se font à 4°C)
- Centrifuger les cultures (1 L) 10 min à 6000 rpm
- Laver le culot de cellules avec 1/10 du volume initial d'H₂O
- Centrifuger 10 min à 5000 rpm à 4°C
- Reprendre les culots dans un 1/30 du volume initial de tampon TES (refroidi dans la glace)
- Ajouter environ 1 volume de microbilles de verre (sous le ménisque)
- Secouer vigoureusement pendant 5 min
- Rincer les billes 4 fois avec 10 mL de tampon TES froid
- Répartir dans des tubes de 50 mL avec des bouchons à vis
- Centrifuger 15 min à 12000 rpm
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 0,1 M final NaCl 5 M et 10 % final de PEG 4000 50 %

- Laisser précipiter 20 min dans la glace
- Centrifuger 10 min à 10000rpm maximum
- Éliminer le surnageant
- Rincer le culot avec 1 mL de tampon TEG
- Reprendre le culot avec 500 µL de tampon TEG avec une seringue de 1 mL
- Conserver à -20°C
- Purification (toutes les étapes se font à 4°C) :
- Colonne DEAE Sephacel (GE Healthcare)
- Équilibrer la colonne en 20 mM PO₄ pH7, 0,3 % cholate, 0,5 µM FMN, 0,5 mM DTT
- Charger la solution protéique
- Eluer avec un gradient de 0 à 1 M KCl
- Changer le tampon sur une colonne de dessalage afin de diminuer la concentration en KCl
- Concentrer la protéine avec des Vivaspin 70 puis 15 (50.000 MWCO, Sartorius Stedium Biotech) pour atteindre un volume finale de 1 mL
- Colonne Mono Q-Sépharose (GE Healthcare)
- Équilibrer la colonne en 20 mM PO₄ pH7, 0,3 % cholate, 0,5 µM FMN, 0,5 mM DTT
- Charger la solution protéique
- Eluer avec un gradient de 0 à 1 M NaCl
- Changer le tampon sur une colonne de dessalage afin de diminuer la concentration en KCl
- Conserver la protéine purifiée à -20°C dans 20 % glycérol.

2.2.4. Fusion CPR-intéines

L'expression, la purification sur résine de chitine et le clivage des protéines fusionnées aux intéines (plasmides Y-FMN-Mxe-pTWIN1, Y-FAD-Ssp-pTWIN1, H-FMN-Mxe-pTWIN1 et H-FAD-Ssp-pTWIN1) ont été réalisées dans la bactérie hôte *E. coli* ER2566 selon le protocole décrit dans le manuel du kit IMPACT™-TWIN (New England Biolabs).

2.3. Cinétique stationnaire suivie par spectroscopie d'absorption

Les paramètres cinétiques des CPR solubles ont été mesurés à 25°C en suivant l'activité cyt *c* et ferricyanure réductase respectivement à 550 nm ($\epsilon(\text{cyt } c \text{ ox.}) = 21,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et 420 nm ($\epsilon(\text{ferricyanide red}) = 1,020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La concentration en enzyme variait de 0,5 à 50 nM et les CPR étaient directement diluées dans la cuve du spectromètre contenant du tampon 20mM phosphate pH 7,4 complété par 0,5 unités de catalase et de super oxyde dismutase afin de prévenir la formation de ROS. La concentration en NADPH était de 200 µM lorsque le cyt *c* ou ferricyanure correspondait au substrat variable. Dans ces cas, la concentration du cyt *c* variait de 0,15 à 50 µM tandis que celle du ferricyanure allait de 0,3 à 1 mM. Lors de la mesure du K_m^{NADPH} , la concentration du cyt *c* était fixée à 50 µM, et celle du NADPH variait de 0,5 à 200 µM. La réaction était initiée par l'ajout de NADPH dans la cuve contenant déjà le substrat et l'enzyme, et la cinétique était suivie pendant 2 min dans un spectromètre Carry 100 Scan UV-Visible (Varian). Chacune de ces mesures a été effectuée en triplet, et le respect des conditions michaeliennes a également été vérifié en chaque point. Les paramètres cinétiques ont ensuite été déterminés par régression non-linéaire en utilisant

l'équation de Michaelis-Menten permettant d'accéder aux valeurs de K_m^{app} et k_{cat} . Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel SigmaPlot®11 (Systat Soft Ware, Inc., Chicago, US).

2.4. Déplétion du cofacteur FMN

Les CPR solubles ont été diluées jusqu'à 0,2 μ M dans du tampon 20 mM phosphate pH 8,5 contenant 2 M de bromure de potassium. Du charbon saturé en BSA a été ajouté à la solution afin de piéger les flavines libérées. Les échantillons ont été agités doucement à 4°C pendant la nuit. Après 10 min de centrifugation à 7500 rpm, les surnageants étaient concentrés et dessalés en utilisant des Vivaspin 15 (50.000 MWCO, Sartorius Stedium Biotech) pour atteindre une concentration finale de 6 μ M. Les activités cyt c réductase ont été effectuées comme décrit dans le point 2.3 avec des CPR déplétées en FMN, des échantillons témoins non déplétés, mais également avec des CPR déplétées en FMN auxquelles du FMN et/ou du FAD avait été rajouté à la concentration de 6 μ M.

2.5. Analyses d'HPLC-MS

2.5.1. Détermination de la stœchiométrie CPR :FMN :FAD

La quantité de chaque cofacteur flavinique pour chacune des CPR a été déterminée par analyse HPLC-MS après la purification des protéines. La dissociation des cofacteurs était induite par la dénaturation des CPR dans un volume de 50 μ L contenant 50 % de chlorure de guanidine 6 M pendant 10 min à température ambiante, avant une centrifugation de 10 min à 13200 rpm. La quantification du FMN et du FAD était réalisée par HPLC-MS en phase reverse sur une colonne XTerra® MS C18 (Waters) en utilisant des solutions pures de FMN et FAD comme standards.

2.5.2. Reconstitution de l'activité enzymatique P450 réductase

Les activités P450 réductases des différentes CPR ont été réalisées en systèmes reconstitués contenant des micelles lipidiques soniquées de dilauroylphosphatidylcholine (1 mg/mL) dans du tampon 10 mM MOPS pH 7,4. Chaque échantillon contenait 100 nM de P450-3A4 humain (Invitrogen™), 30 mM $MgCl_2$, 200 μ M de testostérone ou androstènedione, 3 mM de GSH et 200 nM de cyt b_5 . Les réactions étaient démarrées par l'ajout de 2 mM NADPH. Après 30 min d'incubation à 30°C, les réactions étaient stoppées par l'ajout d'un volume équivalent d'acétonitrile. Par ailleurs, des analyses de cinétique ont été réalisées en stoppant la réaction à différents temps d'incubation (de 0 à 30 min toutes les 5 min) afin de vérifier la cinétique linéaire de la réaction de métabolisation même au bout de 30 min d'incubation. Les conditions opératoires ainsi mises au point, des batteries de tests sur plaques de 96 puits ont pu être effectuées. La testostérone, la 6 β -hydroxytestostérone, l'androstènedione et la 16-hydroxyandrostènedione ont été quantifiées par HPLC-MS en phase reverse sur une colonne de XTerra® MS C18 (Waters) en utilisant des solutions pures de testostérone, 6 β -hydroxytestostérone, androstènedione et la 19-hydroxyandrostènedione comme standards.

2.6. Stopped-Flow

Les mesures des constantes catalytiques de transfert d'électrons en cinétique rapide ont été réalisées grâce à un stopped-flow séquentiel SX.18MV couplé à un spectrofluorimètre d'absorption (Applied Photophysics LTD). Les expériences ont été effectuées dans du tampon 20 mM phosphate pH 7,0 à température ambiante. L'oxygène contenu dans le tampon a été préalablement éliminé par des cycles répétés de dégazage sous vide et bullage d'argon purifié. Tandis que la première seringue du stopped-flow contenait une des CPR à la concentration de 20 μM , la seconde seringue était remplie de NADPH soit à 20 μM (ratio CPR :NADPH = 1 :1), soit à 200 μM (ratio 1 :10). Avant toutes mesures, les CPR ont été complètement oxydées par du ferricyanure puis purifiées sur des colonnes de Sephadex™ G-20 (GE Healthcare)

Des spectres ont été enregistrés entre 350 et 750 nm afin de suivre la réduction de l'enzyme au travers de la diminution de l'absorption autour de 455 nm et la production de semiquinone se traduisant par une augmentation de l'absorption autour de 585 nm. Les courbes correspondant à ces phénomènes transitoires ont été analysées au travers d'ajustements théoriques par les fonctions exponentielles appropriées grâce au logiciel StopW (développé au laboratoire) permettant la déconvolution des spectres.

Lors des expériences dans des conditions autorisant plusieurs cycles catalytiques, la première seringue du stopped-flow était remplie d'une solution de cyt c à 50 μM dans du tampon 20 mM phosphate pH 7,4 contenant également une concentration variable de CPR (entre 0,5 et 50 nM) ; tandis que la seconde seringue contenait une solution de NADPH à 200 μM dans le même tampon. La réduction du cyt c a été suivie au travers de la diminution de l'absorption à 550 nm. La courbe des vitesses initiales de transferts en fonction de la concentration en CPR a mis en évidence une dépendance linéaire.

2.7. Analyses par spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par Manuela Argentini et David Cornu à la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette). Les protéines purifiées et déposées sur gel SDS-PAGE étaient ensuite digérées par la trypsine et la technique d'identification des fragments était le MALDI-TOF ou la LC-MS/MS.

2.8. Titration des CPR en anaérobiose

L'oxygène présent dans le tampon phosphate 20 mM pH 7,4 a été préalablement éliminé par des cycles répétés de dégazage sous vide et bullage d'argon purifié. Des solutions de CPR à 45 μM ont été préparées avec du tampon déoxygené dans une cuve en anaérobiose. L'addition d'un aliquot de dithionite de sodium a permis la réduction progressive des CPR. Après chaque injection d'agent réducteur, un laps de temps permettant au mélange réactionnel d'atteindre l'équilibre a été observé jusqu'à ce que le spectre d'absorption soit totalement stabilisé. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Carry 300 Scan UV-Visible (Varian)

2.9. Dénaturations thermique et chimique suivies par fluorimétrie

La dénaturation thermique des CPR a été réalisée par augmentation de la température des échantillons par palier de 1°C de 22°C jusqu'à 70°C. Les échantillons de CPR 10 µM étaient préparés dans du tampon 20 mM phosphate. L'influence du NADPH et NADP⁺ à 300 µM a également été étudiée. La dénaturation chimique a été réalisée dans les mêmes conditions que la dénaturation thermique sur les CPR oxydées en utilisant comme agent dénaturant soit de l'urée entre 0 et 8 M, soit de la guanidine-HCl entre 0 et 6M

La dénaturation a été suivie via la différence de fluorescence entre les flavines libres et liées sur un spectrofluorimètre FLX-Xenius (Safas, Monaco). En effet, la fluorescence des flavines est complètement éteinte (quenchée par les résidus aromatiques fixant les cofacteurs) lorsqu'elles sont liées à la CPR, mais émettent de façon significative lorsqu'elles sont libres en solution ($\lambda_{\text{émission}} = 530$ nm, $\lambda_{\text{excitation}} = 465$ nm). Les mesures ont été corrigées en fonction de la fluorescence de solution de FMN et de FAD libres en présence des agents réducteurs ou de la température.

2.10. Mesure des potentiels d'oxydoréduction des CPR par spectroélectrochimie

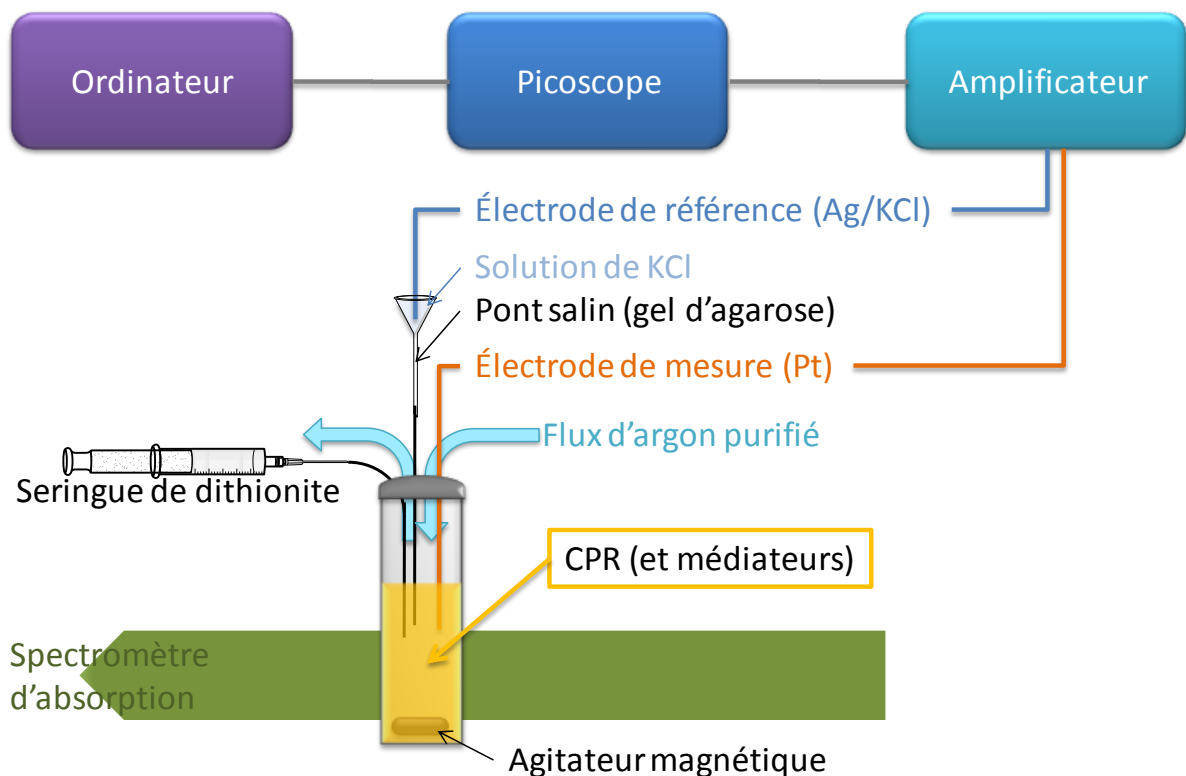


Figure 42 : Montage de mesure de potentiométrie par spectroélectrochimie. La cuve de spectrométrie anaérobie contient initialement de la CPR oxydée. Un flux constant d'argon purifié au travers d'une colonne Oxy-Trap (Alltech) permet de maintenir l'anaérobiose durant l'expérience. Le potentiel de la solution est mesuré en permanence entre une électrode de référence Ag/AgCl et une électrode de mesure en fil de platine. Les médiateurs permettent un meilleur couplage entre les électrodes et la protéine. Une seringue de dithionite de sodium traverse le bouchon en téflon de la cuve et permet d'introduire de petites quantités d'agent réducteur afin de réduire pas à pas la CPR. Une pause est observée entre chaque ajout de dithionite afin d'atteindre l'équilibre (potentiel et spectre constants). Le potentiel correspondant à chaque spectre est alors enregistré.

La titrage rédox des CPR parentales et chimériques a été réalisée dans des conditions d'anaérobiose en utilisant du tampon 100 mM phosphate pH 7,4 dégazé par des cycles successifs de vide et d'argon purifié. Un flux constant d'argon purifié au travers d'une colonne Oxy-Trap (Alltech) était maintenu tout au long des expériences dans la cuve en anaérobiose du spectromètre. La

concentration en CPR était de 50 μM , et 4 médiateurs étaient ajoutés dans les échantillons à la concentration de 0,5 μM chacun afin de faciliter la communication électrique entre l'enzyme et l'électrode : la safranine ($E^\circ = -280 \text{ mV}$), l phénosafranine ($E^\circ = -240 \text{ mV}$), la 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone ($E^\circ = -150 \text{ mV}$) et le benzylviologène ($E^\circ = -350 \text{ mV}$). Quelques unités de catalase et de superoxyde dismutase permettaient également de piéger toutes les ROS potentiellement produites. Les CPR étaient réduites séquentiellement par l'ajout de dithionite de sodium. Après chaque ajout d'agent réducteur, un laps de temps était observé afin d'autoriser l'équilibration du mélange réactionnel (spectre d'absorption et potentiel stables). L'évolution des absorptions à 455 nm (flavine oxydée), 585 nm (semiquinone), 430 nm (isobeste entre les semiquinones et les flavines réduites) et à 500 nm (isobeste entre les flavines oxydées et les semiquinones) en fonction de potentiel (mV) étaient mesurées via une électrode de référence Ag/KCL (210 mV/SHE) et une électrode de platine. Les données ont été analysées grâce au logiciel Electrofilter programmé par D. Pompon au laboratoire.

2.11. Cristallographie

2.11.1. Cristallogenèse

Les premiers tests de cristallisations ont été réalisés selon le principe de diffusion de vapeur en utilisant la technique classiquement mise en œuvre pour les protéines solubles de la goutte assise (**Figure 44 B**). Cette méthode s'appuie sur les propriétés sur diagramme de phases (**Figure 43**) selon lequel lorsque la concentration d'une protéine soluble augmente ainsi que celle d'agents précipitants présents dans la solution protéique, cette protéine se concentre jusqu'à potentiellement précipiter. La cristallogenèse est le travail d'identification des conditions pour lesquelles cette précipitation a lieu de façon ordonnée (cristal) plutôt qu'amorphe (précipité).

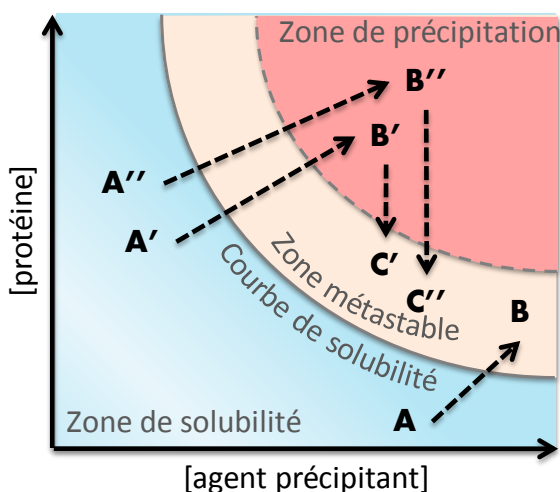


Figure 43 : Diagramme de phase. Lors des tests de cristallisation, plusieurs scénarios sont possibles. A : la goutte se concentre mais pas suffisamment pour permettre l'apparition de germes. La solution restera saturée (B) à cause d'une cinétique trop lente. A' : la goutte se concentre jusqu'à l'apparition de germes (B') qui sont dans le meilleur des cas cristallins plutôt qu'amorphes. Ces germes vont alors croître jusqu'à atteindre une taille maximale due à la diminution de la concentration en protéine (C'). A'' : la goutte se concentre de façon à atteindre la zone de précipitation loin de la zone métastable favorisant soit l'apparition d'une multitude de petits cristaux, soit la précipitation amorphe de la protéine (Thèse de Jérôme Dupuis, 2009).

Le robot nanodrop (CARTESIAN Proteomic solutions) de la plateforme de cristallographie du LEBS (CNRS, Gif-sur-Yvette) permet de tester en parallèle 96 conditions différentes sur des microplaques. De plus, pour chacune des conditions, le robot peut déposer au sein d'un même puits trois gouttes différentes permettant de tester des concentrations différentes ou l'influence d'un ligand. Nous avons ainsi réalisé des essais avec 10 ou 5 mg/mL de protéine dans du tampon Tris-HCL pH 7,4 10 mM contenant 0,5 μL de FMN. La troisième goutte contenait, en plus des 10 mg/mL de CPR, 1mM du

ligand NADP⁺. Les kits commerciaux PEG I, PEG II et Classics suite (QUIAGEN) ont été effectués grâce à ce robot à 20°C.

Après avoir identifié des conditions propices à la cristallisation grâce aux kits commerciaux, une optimisation manuelle de ces conditions a été réalisée sur des boîtes de 24 puits avec une quantité plus importante de protéine selon la technique de la goutte renversée (**Figure 44 A**). Pour chaque condition ayant permis l'apparition de cristaux avec les kits commerciaux, 24 essais autour de cette condition initiale étaient testés en faisant varier par exemple la concentration en sel le long des lignes et celle en PEG 6000 le long des colonnes. Pour chaque essai, les deux concentrations protéiques et l'ajout du ligand ont également été testés (3 gouttes par puits). Les cristaux ont finalement été améliorés aux travers d'un kit Additive Screen (Hampton Research) et d'autres tests manuels utilisant des solutions préparées au laboratoire. Le cristal utilisé pour la collecte des données de diffraction a été obtenu en présence de 8 % d'hexafluoroéthanol après équilibration contre une solution dans le réservoir contenant 0,01 M Tris-HCl pH 8,5, 20 % (w/v) PEG 6000 et 250 mM LiCl.

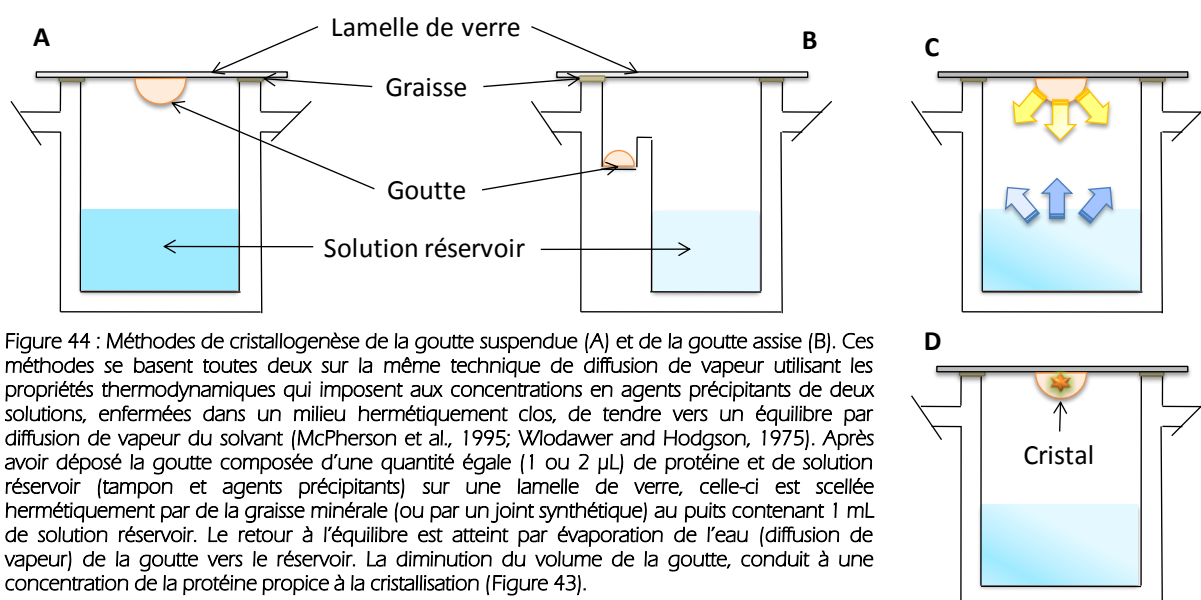


Figure 44 : Méthodes de cristallisation de la goutte suspendue (A) et de la goutte assise (B). Ces méthodes se basent toutes deux sur la même technique de diffusion de vapeur utilisant les propriétés thermodynamiques qui imposent aux concentrations en agents précipitants de deux solutions, enfermées dans un milieu hermétiquement clos, de tendre vers un équilibre par diffusion de vapeur du solvant (McPherson et al., 1995; Wlodawer and Hodgson, 1975). Après avoir déposé la goutte composée d'une quantité égale (1 ou 2 μ L) de protéine et de solution réservoir (tampon et agents précipitants) sur une lamelle de verre, celle-ci est scellée hermétiquement par de la graisse minérale (ou par un joint synthétique) au puits contenant 1 mL de solution réservoir. Le retour à l'équilibre est atteint par évaporation de l'eau (diffusion de vapeur) de la goutte vers le réservoir. La diminution du volume de la goutte, conduit à une concentration de la protéine propice à la cristallisation (Figure 43).

2.11.2. Collecte des données et attributions

Lors de la collecte des données de diffractions, les cristaux sont soumis à un rayonnement X très intense pouvant entraîner leur dégradation au cours de l'acquisition. La congélation à des températures inférieures à 140 K (azote liquide) permet de diminuer la propagation des radicaux libres dans le cristal. Cela empêche également la congélation de l'eau sous forme cristalline qui provoque par diffraction des rayons X l'apparition d'anneaux parasites sur les clichés de diffraction. Cette méthode permet en outre de faciliter la conservation et le transport des cristaux.

Les cristaux ont donc été rapidement congelés dans une solution cryoprotectrice contenant 0,01 M Tris-HCl pH 8,5, 250 mM LiCl 20 % PEG 6000 et 20 % PEG 400. La collecte des données a été réalisée à 100 K sur la ligne PROXIMA I du synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France). 180° de données ont été enregistrées par oscillations de 1° et avec une exposition de 1 s par fenêtre. Les intensités de

diffraction ont été analysées via le programme XDS (Kabsch, 1993) et d'autres traitements utilisant le programme CCP4 program suite (1994).

2.11.3. Remplacement moléculaire

Le remplacement moléculaire a principalement été effectué par Solange Moréra (Laboratoire d'enzymologie et de biologie structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette). L'unité asymétrique ne contient qu'une seule molécule de YHs correspondant à un coefficient de Matthews (Matthews, 1968) de 2,4 Å³.Da⁻¹ et une teneur en solvant de 49 %. Le remplacement moléculaire effectué avec le programme PHASER (Storoni et al., 2004) utilisait les deux structures modèles publiées suivantes : le domaine FMN de Ys (résidus 47 à 211 du fichier PDB 2BF4) et le domaine FAD de Rs (résidus 243-678 du fichier PDB 1AMO) qui partagent 90 % d'identité de séquence avec Hs. Le linker reliant le domaine de connexion au domaine FMN (résidus 212-242 de Hs) a été facilement reconstruit dans la carte de densité électronique. Le raffinement du modèle a été effectué grâce au logiciel Refmac et les cartes de densité électroniques ont été évaluées avec COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Dans le modèle final, les trois premiers résidus (44-46) en N-terminal, et les 5 résidus (481-485) et 3 résidus (587-580) appartenant à des boucles en surface sont désordonnés. Les coordonnées atomiques et les facteurs de structures (fichier PDB 3FJO) ont été déposés à la Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

3. Analyse

3.1. Logiciel d'analyse des données de potentiométrie : Electrofilter

Les données de potentiométrie couplée à de la spectrométrie d'absorption ont été analysées grâce au logiciel Electrofilter codé au laboratoire par Denis Pompon. Ce logiciel n'utilise pas directement l'équation de Nernst pour ajuster théoriquement les données expérimentales afin d'en extraire des potentiels standards redox des cofacteurs flaviniques des CPR étudiées. En se basant sur des valeurs initiales rentrées par l'utilisateur, le programme utilise pour chaque espèce redox i l'égalité suivante :

$$\Delta_r G^\circ = R \times T \times \ln\left(\frac{c_i}{c_0}\right) = -n \times F \times E^\circ$$

avec :

- R est la constante des gaz parfaits ;
- F est la constante de Faraday ;
- T est la température;
- n est le nombre d'électrons séparant les deux espèces redox du couple ;
- c₀ correspond à la concentration totale d'une espèce chimique (FMN ou FAD), c'est-à-dire la concentration en CPR ;
- c_i correspond à la concentration de cette espèce dans un état redox i (FMN_{ox}, FMN_{sq}, FMN_{red}...);
- Δ_rG° correspond à l'enthalpie libre de réaction ;
- E° correspond au potentiel standard.

Les valeurs c_i déduites de cette équation sont ensuite transcrites en OD via l'équation de Beer-Lambert et comparées aux données expérimentales. L'ajustement théorique utilise alors la méthode du moindre carré afin que les données calculées correspondent au mieux aux données mesurées. Le logiciel Electrofilter permet ainsi d'ajuster ou de bloquer non seulement les valeurs des potentiels standards des couples redox mais également les coefficients d'absorption des espèces.

3.2. Identification des interactions aux interfaces des domaines des CPR

Les interactions aux interfaces des domaines FMN, FAD et de connexion chez les CPR natives ont été identifiées à partir des structures cristallographiques de Ys (2BF4) et Rs (1J9Z) grâce au serveur internet PIC (« protein interaction calculator », <http://crick.mbu.iisc.ernet.in/~PIC/>). Les interactions sont détectées au travers de la distance entre les résidus des chaînes latérales et en fonction de la nature des interactions mises en jeu. Ainsi les interactions hydrophobes sont recherchées entre les résidus Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro ou Tyr à une distance de moins de 5 Å. Les liaisons hydrogènes concernent des distances donneur-accepteur inférieures à 3,5 Å et 4,0 Å pour les interactions oxygène/azote-hydrogène et soufre-hydrogène respectivement. Les interactions π -cations sont identifiées entre les chaînes latérales cationiques des Lys et Arg et les chaînes latérales aromatiques des Phe, Tyr ou Trp distantes de moins de 6 Å. Enfin, les ponts salins concernent les paires de résidus Arg, Lys, His, Asp, Glu à une distance maximale de 6 Å.

3.3. Modélisation de la forme fermée de YHs

La structure de YHs en conformation fermée analogue à celle des CPR parentales a été modélisée grâce au logiciel MODELER (<http://uml.sourceforge.net/>) à partir des fichiers PDB 1JA0, 1J9Z, 1AMO, 2BF4, 2BN4 et 2BPO des CPR Ys et Rs.

RESULTATS

Toutes les sciences ont leur chimère, après laquelle elles courent, sans pouvoir l'attraper ; mais elles attrapent en chemin d'autres connaissances fort utiles.

B. le Bovier de Fontenelle

1. Construction de CPR chimère

1.1. La définition des domaines et des points de jonction

En construisant des protéines chimériques, nous avons fait le choix d'utiliser le domaine protéique comme unité de base ou pièce d'un puzzle que serait la protéine multidomaine. Le design de chimère à partir de domaines issus de protéines d'origines différentes nécessitait tout d'abord une définition précise de chacun de ces domaines, c'est-à-dire des résidus exacts qui les composent et des bornes ou possibles zones de jonctions entre eux. Selon l'organisme dont elles sont issues, les CPR ne présentent pas exactement le même nombre d'acides aminés, mais elles gardent une architecture commune autorisant un découpage analogue des domaines. Pour cela, un alignement des structures des CPR, lorsqu'elles sont disponibles, ou de leur séquences, permet d'identifier les résidus équivalents d'une protéine à l'autre. En 2007, les deux seules structures cristallographiques de CPR natives connues correspondaient à la CPR de rat (Rs) (Wang et al., 1997) et de levure (Ys) (Lamb et al., 2006). Or nous souhaitions construire des chimères combinant les CPR humaines et de levure. Fort heureusement, les deux CPR mammifères Hm et Rm présentent 92,6 % d'identité de séquence. Nous avons donc pu utiliser Rs comme modèle afin de déterminer les bornes des domaines de la CPR humaine. La **Figure 45** présente l'alignement des trois séquences codant pour les CPR de rat (R), humaine (H) et de levure (Y), ainsi que les bornes délimitant chacun de leurs domaines.

Nous nous sommes basés sur la topologie structurale définie par Wang et al. lors de la publication de la structure de Rs pour définir les résidus appartenant à chacun des domaines. Il ressort de cette topologie 3 domaines principaux : le domaine FMN, celui de connexion et le domaine FAD/NADPH ; ce dernier se divisant en deux sous-domaines responsables respectivement de la fixation du NADPH et du FAD (Wang et al., 1997) (**Figure 46**). Cette carte de la CPR révèle à nouveau l'enchevêtrement des domaines de connexion et FAD. Le domaine FMN forme par contre une entité indépendante tant en termes de structure que de séquence. Il nous est donc apparu plus aisé de remplacer dans nos chimères les domaines FMN en définissant un point de jonction unique, tandis que la substitution du domaine FAD/NADPH ou du domaine de connexion aurait nécessité l'introduction respectivement de deux ou trois points de jonction.

Une autre constatation nous a aidés à déterminer le point de jonction exact entre d'une part le domaine FMN et d'autre part les domaines connexion/FAD dans nos chimères : les résidus du linker reliant le domaine FMN au domaine de connexion présentent dans les structures cristallographiques de Rs et Ys des facteurs B particulièrement élevés, synonymes de la grande flexibilité de cette zone de la chaîne d'acides aminés (**Figure 47**). L'introduction d'un point de jonction, et donc d'une perturbation potentielle, au tout début de cette partie assez souple et adaptable de la protéine semblait alors moins « risquée » que dans d'autres zones plus rigides telles que le cœur des domaines protéiques. Le point de jonction exact a donc été choisi à l'intersection de la dernière hélice du domaine FMN et de la boucle souple du linker, préservant ainsi chacun des éléments de structuraux.

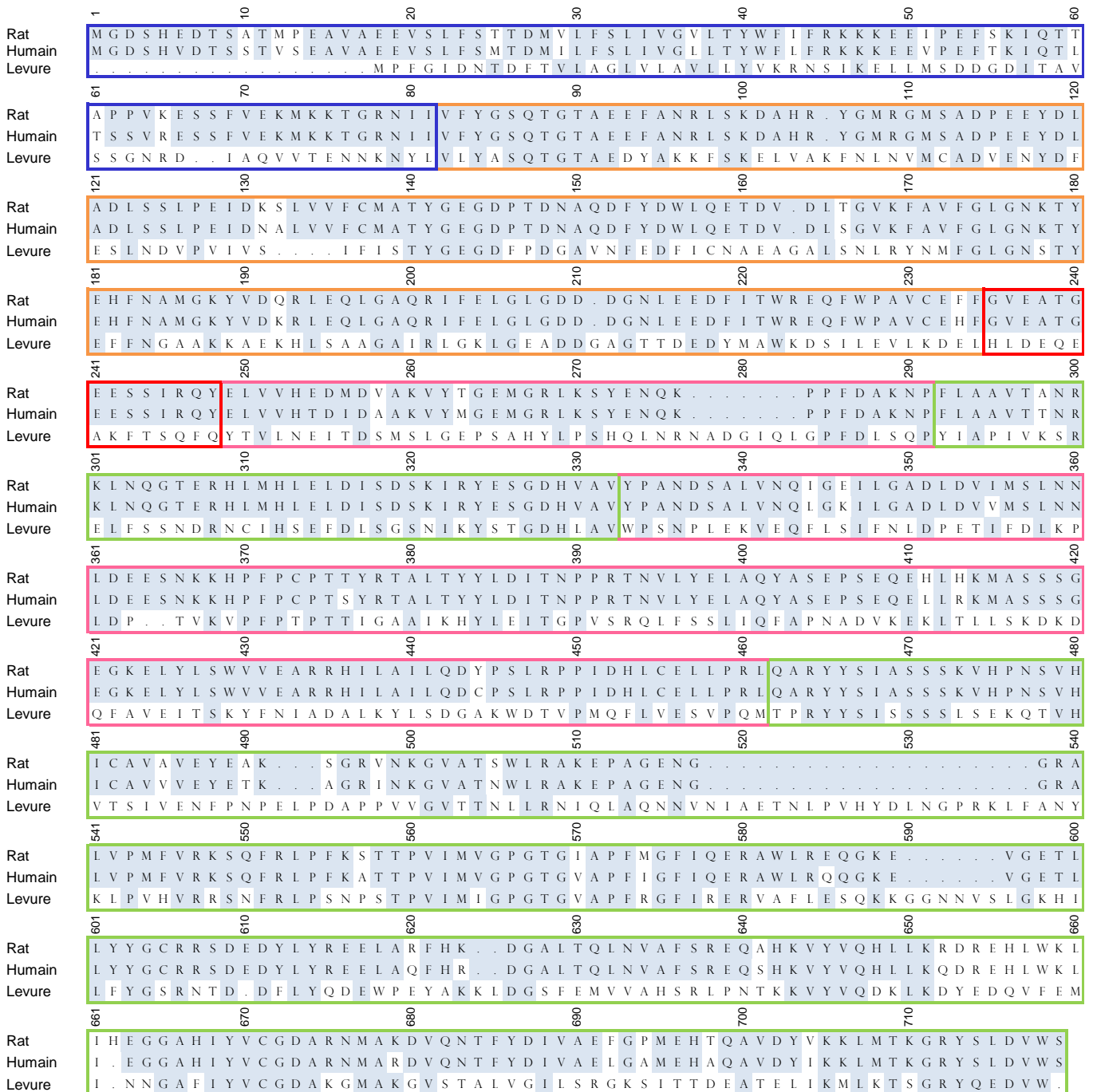


Figure 45 : Alignement des séquences des CPR de rat, humaine, et de levure. Les résidus conservés chez au moins deux des trois CPR sont colorés en bleu clair. Les différentes parties ou domaines de la CPR sont définies par des cadres : la partie membranaire du domaine FMN est entourée en bleu, le reste du domaine FMN en orange, le linker en rouge, le domaine de connexion en rose, et le domaine FAD/NADPH en vert.

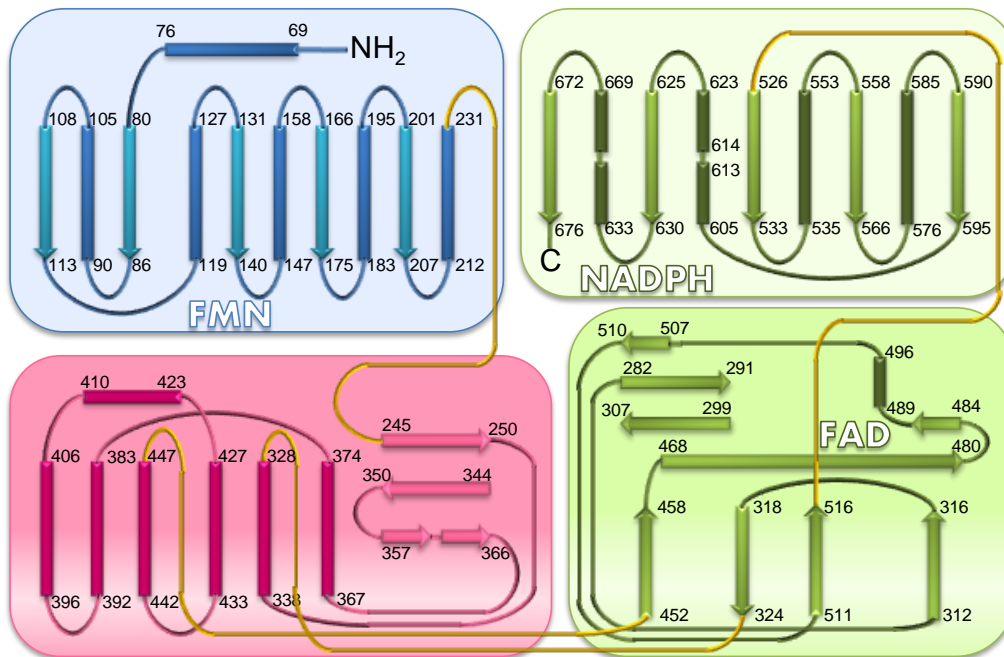


Figure 46 : Topologie de la CPR de rat. Les domaines FMN, de connexion et NADPH/FAD sont indiqués par des boîtes respectivement bleu, rose et vertes. Les hélices α sont représentées par des flèches, les brins β par des rectangles et les boucles reliant ces éléments de structure secondaire sont représentés par des lignes. Les numéros des résidus à leurs extrémités sont indiqués. Les boucles transdomaines sont de couleur jaune.

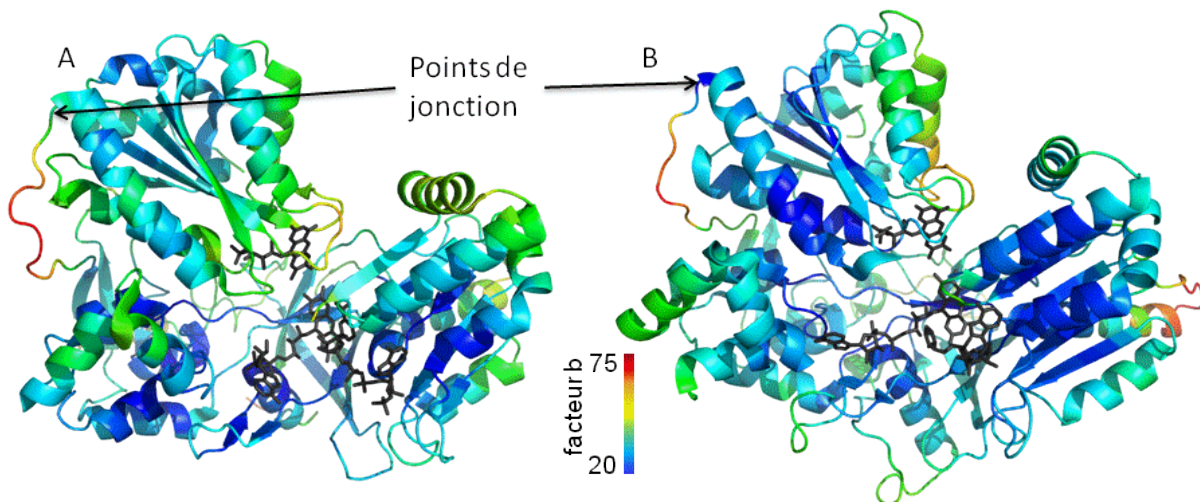


Figure 47 : Structures des CPR de rat et de levure. Les chaînes d'acides aminés sont colorées selon le facteur B des résidus dans les structures cristallographiques. A. Structure de la CPR de rat (1J9Z). B. Structure de la CPR de levure (2BF4).

En conséquence, les CPR humaine et de levure ont été « découpées » en deux parties comprenant d'une part le domaine FMN et d'autre part le domaine de connexion et le domaine FAD. Le point de jonction entre ces deux parties se trouve précisément au niveau des résidus 232 chez H et 212 chez Y qui correspondent dans les deux cas au premier acide aminé du linker (**Figure 45**). Deux types de chimères ont ainsi été conçus :

- la chimère YH pour « yeast-human » comprenant le domaine FMN de la CPR de levure et les domaines connexion/FAD de la CPR humaine (**Figure 48 C**) ;
- la chimère complémentaire HY comprenant le domaine FMN de la CPR humaine et les domaines connexion/FAD de la CPR de levure (**Figure 48 D**).

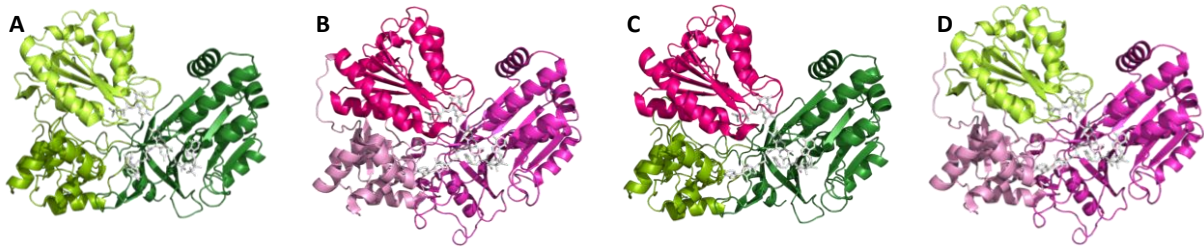


Figure 48 : Architecture des chimères. A : structure de Rs servant du modèle pour Hs (vert), B : structure de Ys (rose), C : architecture de la chimère YHs comprenant le domaine FMN de Ys et les domaines de connexion et FAD de Hs, D : architecture de la chimère HYS comprenant le domaine FMN de Hs et les domaines de connexion et FAD de Ys.

2. Expression et purification des CPR

2.1. Les CPR solubles

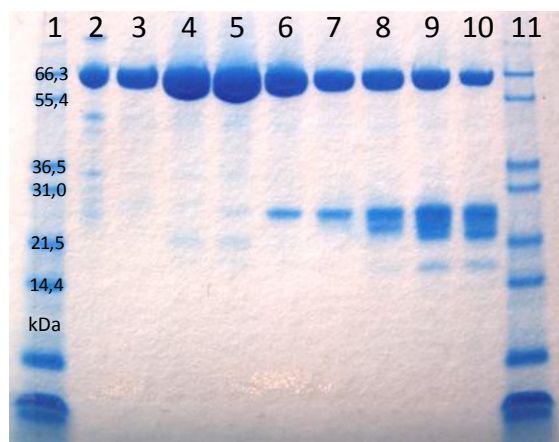


Figure 49 : SDS-PAGE des différentes étapes de purification de YHs. 1 et 11 : standard. 2 : solution protéique après la première étape de purification sur résine d'affinité Talon. 3 à 10 : fractions en sortie de gel filtration Sephacryl S-400. Les fractions 3 à 5 présentent un taux de pureté supérieur à 98 %. On retrouve des impuretés entre 15 et 30 kDa, indissociables de la CPR malgré un poids moléculaire bien plus faible.

Les gènes chimériques correspondant aux CPR solubles, YHs et HYS, ainsi que ceux correspondant aux CPR parentales, Hs et Ys, ont été clonés dans le vecteur d'expression bactérien pET-15b (Novagen) de façon à introduire un tag poly-histidines à l'extrémité N-terminale des protéines. Deux types de résines ont été utilisés lors de la purification de ces CPR: une première résine d'affinité pour les tags poly-histidines (Talon, Clontech), et une seconde résine de gel filtration (Superdex 200, GE Healthcare) séparant les protéines selon leur taille. La résine d'affinité au cobalt Talon s'est avérée plus sélective que les résines de nickel classiques, permettant d'atteindre des taux de pureté très élevés. Le taux d'expression de ces protéines solubles étant excellent, nous avons pu privilégier la qualité de la purification à la quantité de matériel protéique.

Globalement, une purification à partir de 2 L de culture produisait 600 nmoles de protéines d'une pureté supérieure à 98 %, et 2,5 μ mole d'une pureté supérieure à 90 %. Les fractions les plus pures étaient gardées prioritairement pour la cristallogénèse. Des impuretés de poids moléculaire bien plus faible (15 et 30 kDa) que celui de la CPR soluble (72 kDa) n'ont malheureusement jamais pu être éliminées. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation des conditions de purification (ajout de faible quantité de détergeant ou de solvant, modification du PH ou changement de la concentration saline du tampon...), ces protéines contaminantes ont toujours persisté en queue des pics d'éluion, même sur gel filtration (**Figure 49**).



Figure 50 : Dépôt de Ys (photo de gauche) et de Hs (photo de droite) sur la colonne de gel filtration Sephacryl S400. Ys est purifiée sous sa forme totalement oxydée, les deux flavines donnant leur couleur jaune ocre à la protéine. Hs est stable dans un état rédox à 1 électron avec le FMN oxydé (jaune) et le FAD sous sa forme semiquinone bleue. Le mélange des couleurs des flavines est à l'origine de la couleur verte de la protéine.

2.2. Les CPR membranaires

Les premières tentatives d'expression des CPR membranaires dans *E. coli* se sont avérées infructueuses, en particulier pour Hm et YHm qui comprenaient toutes deux la partie N-terminale membranaire de la CPR humaine. Plusieurs souches d'*E. coli* ont alors été testées comme BL21-C41 ou BL21-C43 qui sont particulièrement préconisées pour l'expression de protéines membranaires. Les conditions d'expression optimales ont pu être déterminée pour Ym et YHm (dans *E. coli* BL21-C41 à 37°C pendant 4h) après plusieurs essais concernant la durée de l'induction et à la température de cultures, mais aucun test n'a permis l'expression de Hm et YHm dans *E. coli*.

Pour les deux CPR membranaires présentant des difficultés, un gène synthétique a été commandé. Sa séquence correspondait à la partie N-terminale membranaire de la CPR humaine recodée selon un biais de codon plus compatible avec l'expression dans *E. coli*. Mais la substitution de la séquence membranaire dans les plasmides pET-15b/Hm et pET-15b/YHm par ce gène synthétique n'a pas permis d'augmenter le taux d'expression des deux protéines. Par ailleurs, les tests de purifications de Ym et YHm dont le taux d'expression dans *E. coli* BL21-C41 était correct, se sont également avérés très décevants. En effet, aucun des multiples détergents utilisés n'a permis de solubiliser les protéines membranaires après lyse et centrifugation des cellules.

Ces difficultés d'expression et de purification nous ont poussés à changer l'organisme hôte utilisé. En effet, lors de projets de recherches antérieures au sein du laboratoire, la levure *S. cerevisiae* avait donné de bons résultats concernant l'expression et la purification de Hm. Comme nous tenions à garder le même protocole pour les différentes protéines parentales et chimériques, nous avons décidé d'utiliser *S. cerevisiae* comme organisme hôte pour l'expression des quatre CPR membranaires. Pour ce faire, leurs gènes ont été préalablement sortis du plasmide pET-15b et réintroduits dans un vecteur d'expression de levure, pYe-DP60. Les CPR membranaires ont alors enfin pu être exprimées dans les levures WRΔα dont le génome ne contient pas le gène codant pour Ym.

Le protocole de purification des CPR exprimées dans la levure fait appel à deux colonnes échangeuses d'ions successives de nature et de pouvoir résolutif différents, la DEAE-Sépharose et la Mono Q-Sépharose (GE Healthcare). La purification de protéines membranaires sur des résines de gel filtration étant particulièrement ardue et nous n'avons pas pu utiliser la résine Séphacryl S400 correspondant à la dernière étape de purification CPR solubles. En effet, la taille « expérimentale » des protéines membranaires entourées d'une certaine quantité de détergent est peu prévisible ; et l'ajout de ces détergents ou de glycérol dans le tampon de purification augmente sa viscosité, ce qui conduit à une diminution de la résolution sur gel filtration et à une augmentation de la pression à laquelle ces résines sont très sensibles. Par ailleurs, aucun tag poly-histidines n'a pu être introduit aux extrémités N- ou C-terminales des CPR membranaires car l'introduction d'un tag à l'extrémité N-terminale hydrophobe était risquée, tandis que l'extrémité C-terminale est enfouie au cœur du domaine FAD au niveau des sites de fixation du NADPH et du FAD lui-même.

Les CPR membranaires ainsi purifiées sur des résines échangeuses d'anions présentaient un taux de pureté supérieure à 80 %, ce qui était suffisant pour les tests biochimiques (tests P450) que nous souhaitions réaliser. La nature membranaire des protéines a été vérifiée par spectroscopie de masse après digestion enzymatique des bandes issues de SDS-PAGE à la trypsine et identification des

peptides par MALDI-TOF. Pour l'ensemble des clonages, le séquençage des gènes introduits dans les plasmides recombinant a permis de s'assurer de l'absence de toute mutation.

3. Analyse biochimique

3.1. Activités des CPR chimères - Comparaisons avec les CPR parentales

3.1.1. Etudes cinétiques vis-à-vis d'accepteurs artificiels

Après avoir cloné et purifié les CPR chimères HYS et YHS, nous avons tout d'abord vérifié la fonctionnalité de ces protéines et comparé leurs activités catalytiques avec celles des CPR parentales Hs et Ys. Pour cela, les caractéristiques cinétiques de ces 4 enzymes ont été mesurées vis-à-vis d'accepteurs artificiels. Lors de ces mesures, des CPR solubles ont pu être utilisées car la partie membranaire N-terminale n'est pas nécessaire au transfert d'électrons vers les petites protéines ou molécules organiques telles que le cyt *c* ou le ferricyanure (Black and Coon, 1982).

Ces deux accepteurs étudiés ne sont pas des accepteurs physiologiques de la CPR, mais ils sont communément utilisés pour comparer les activités de différentes CPR entre elles. Les propriétés spectrales de ces deux molécules varient selon leurs états rédox. Ainsi l'évolution des réactions de transferts d'électrons peuvent être suivies par spectrométrie d'absorption. Le ferricyanure a la particularité d'être réduit au niveau du domaine FAD de la CPR, court-circuitant ainsi le domaine FMN (Smith et al., 1994; Vermilion et al., 1981). Le cyt *c* se comporte par contre de façon analogue aux P450, et est réduit pas le cofacteur FMN de la CPR après un transfert interne entre les deux cofacteurs flaviniques. Les propriétés cinétiques des CPR vis-à-vis du ferricyanure permettent donc de caractériser les propriétés enzymatiques du domaine FAD seul, tandis que les mesures d'activités cyt *c* réductases reflètent le transfert électronique global au sein des CPR et la reconnaissance de leur domaine FMN pour cet accepteur.

Tableau 12 : Caractéristiques cinétiques mesurées pour les CPR solubles chimériques et parentales vis-à-vis des deux accepteurs artificiels, le cyt *c* et le ferricyanure. Les valeurs sont données avec \pm la déviation standard.

	NADPH-Cyt. <i>c</i> réductase			NADPH-ferricyanure réductase	
	K_m^{NADPH}	$K_{1/2}^{\text{cyt } c}$	$k_{\text{cat}}^{\text{cyt } c}$	$k_{\text{cat}}/K_{1/2}^{\text{ferricyanide}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{ferricyanide}}$
	(μM)	(μM)	(s^{-1})	($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	(s^{-1})
Hs	0,8 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	30,8 \pm 0,4	3,1 \pm 0,5	47,2 \pm 0,6
Ys	11,6 \pm 0,6	2,4 \pm 0,2	149 \pm 2	6 \pm 1	116 \pm 2
HYS	5,3 \pm 0,4	2,5 \pm 0,2	2,95 \pm 0,05	7 \pm 2	91 \pm 3
YHS	0,05 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02	1,99 \pm 0,02	0,3 \pm 0,1	45 \pm 1

Les **Figure 51** et **Figure 52** présentent des diagrammes dits de Michaelis-Menten où le K_m reflète théoriquement l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Dans le cas de la CPR et des transferts d'électrons vers des accepteurs artificiels, l'utilisation de la notion de K_m est un peu abusive ou erronée pour deux raisons : (i) la formation d'un complexe enzyme-substrat n'est pas nécessaire aux transferts d'électrons et (ii) rien ne démontre que l'étape cinétiquement déterminante lors de la réduction de ces accepteurs est réellement le transfert d'électron lui-même plutôt que la reconnaissance des partenaires, la dissociation du complexe potentiel ou une autre étape du cycle. Il est donc plus juste d'utiliser le terme de constante de demi-saturation $K_{1/2}$. Il est d'autant plus

difficile de distinguer les termes de K_m et $K_{1/2}$ que les courbes de type Michaelis-Menten et celles de type saturation en substrat correspondent toutes deux à des hyperboles.

Les vitesses de transfert au ferricyanure sont globalement du même ordre de grandeur chez les CPR chimères et parentales (**Tableau 12**). Ce substrat étant réduit directement par le cofacteur FAD, le transfert électronique étudié ici ne met en jeu que le domaine FAD. Il paraît donc logique que l'activité ferricyanure réductase soit similaire entre CPR chimères et parentales, car elle n'est pas concernée par la substitution du domaine FMN. D'ailleurs les valeurs de k_{cat} sont pratiquement identiques chez Hs et YHs, tous deux proche de 46 s^{-1} . Par contre, les CPR chimériques présentent une saturation moins rapide vis-à-vis du ferricyanure se traduisant par une augmentation de pratiquement un ordre de grandeur du $K_{1/2}$ chez YHs ($150 \mu\text{M}$) par rapport à celui des CPR parentales ($K_{1/2}(\text{Hs}) = 15 \mu\text{M}$ et $K_{1/2}(\text{Ys}) = 20 \mu\text{M}$). La mesure exacte des constantes catalytiques de HYS n'a pu être effectuée précisément en raison de son comportement anormal.

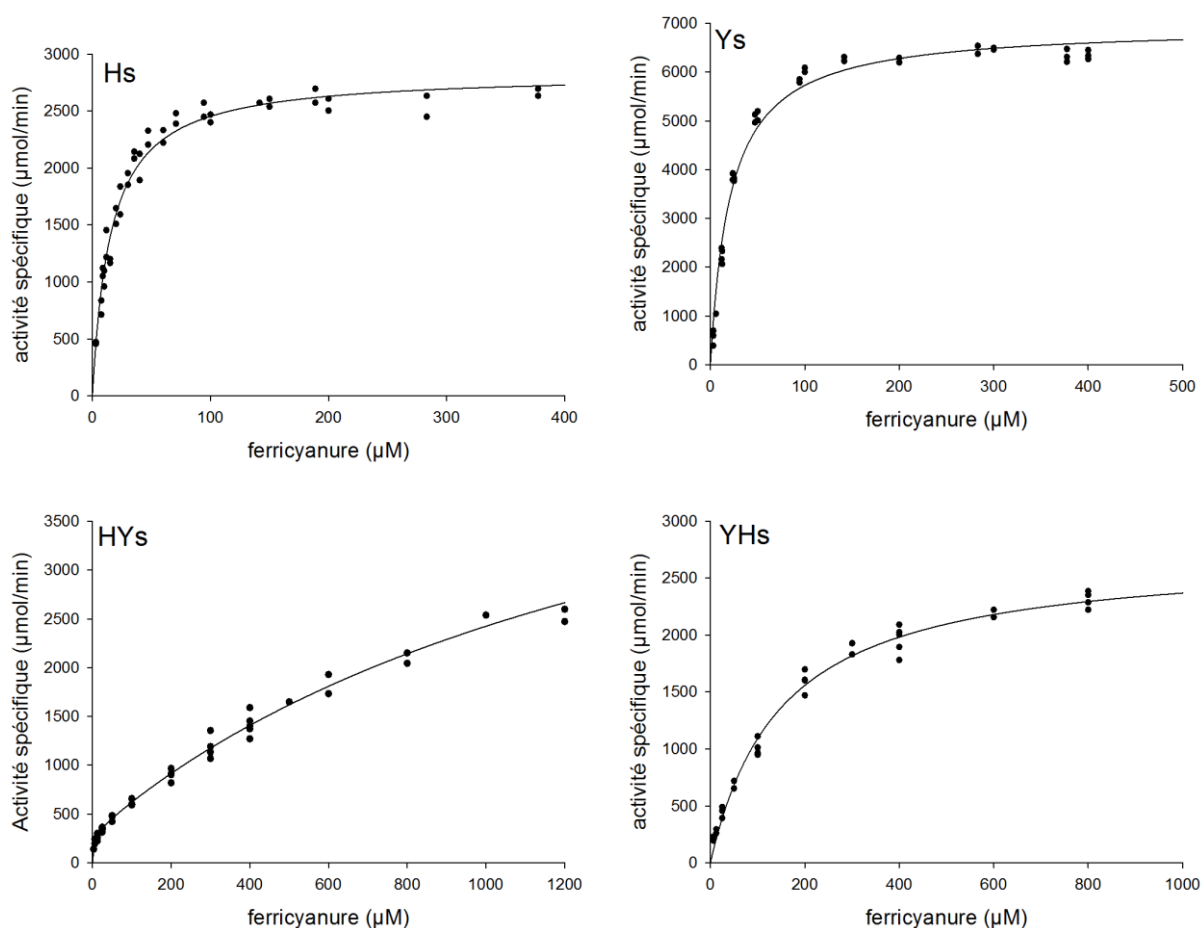


Figure 51 : Diagrammes de Michaelis-Menten pour l'activité ferricyanure réductase des CPR parentales Hs et Ys, et des CPR chimériques HYS et YHs. L'échelle des axes est adaptée selon les diagrammes aux valeurs des constantes catalytiques de chaque CPR.

Le comportement des CPR chimères vis-à-vis de l'accepteur *cyt c* est pratiquement opposé à celui observé avec le ferricyanure (**Tableau 12**). En effet, les valeurs des $K_{1/2}^{cyt c}$ chez les CPR chimériques sont du même ordre de grandeur voir même inférieures à celles des CPR parentales, tandis que les vitesses maximales de réduction du *cyt c* par les chimères sont fortement ralenties par rapport aux protéines parentales. Les k_{cat} des chimères ne sont que de quelques unités par seconde, ces valeurs étant respectivement 10 et 50 fois inférieures aux k_{cat} de Hs et Ys. La reconnaissance et la saturation vis-à-vis du *cyt c* sont quant à elles du même ordre chez les différentes CPR, à l'exception de YHs

dont le $K_{1/2}$ est exceptionnellement faible (ordre de grandeur en dessous des autres). Cette particularité de YHs pourrait éventuellement s'expliquer par l'adoption d'une conformation majoritaire différente de celle des CPR parentales en solution qui autoriserait un meilleur accès au site de reconnaissance du cyt *c*.

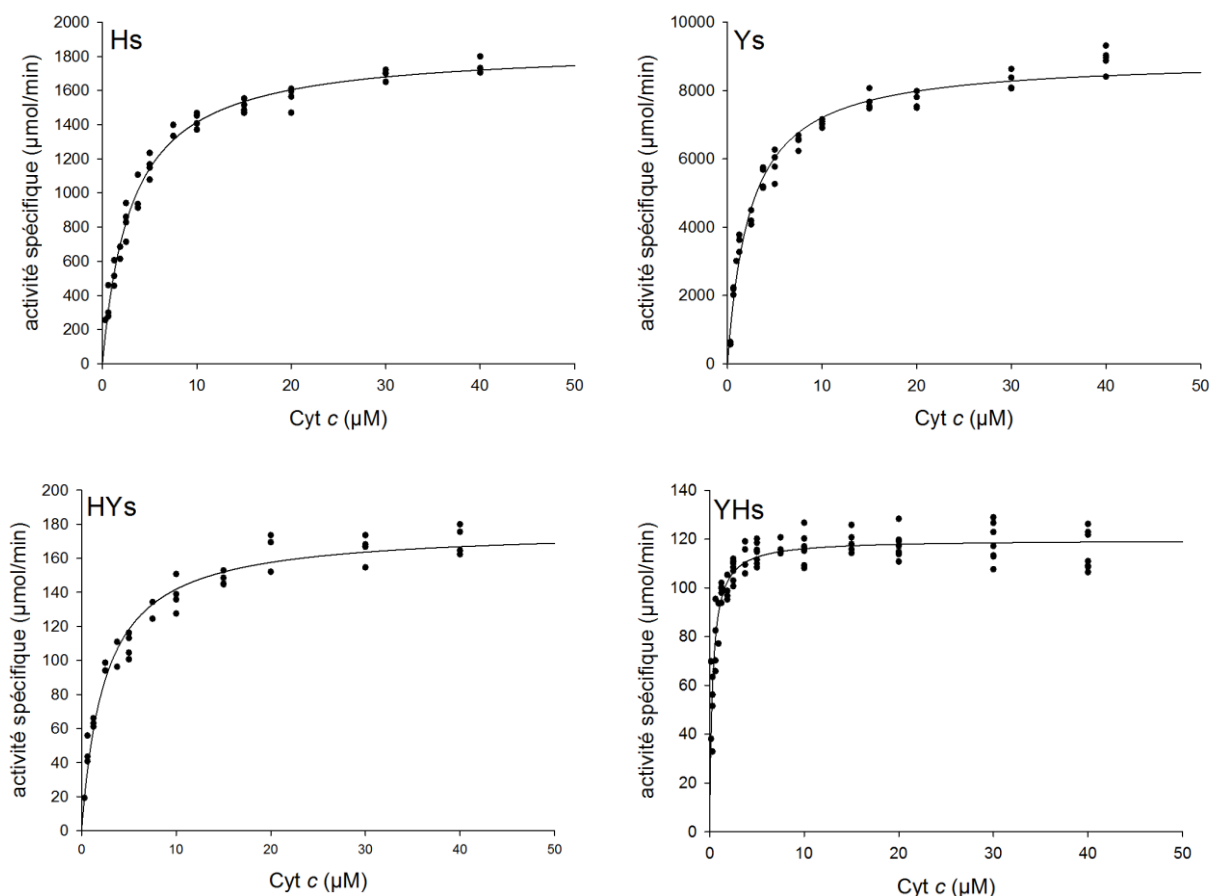


Figure 52 : Diagrammes de Michaelis-Menten pour l'activité cyt *c* réductase des CPR parentales Hs et Ys, et des CPR chimériques HYs et YHs. L'échelle de l'axe des ordonnées (activité spécifique) est adaptée aux valeurs de k_{cat} de chaque CPR.

Il est également important de noter que les constantes cinétiques des deux CPR parentales mesurées dans nos conditions expérimentales sont tout à fait cohérentes avec celles présentées préalablement dans la littérature (Louerat-Oriou et al., 1998; Murataliev et al., 2004). Ainsi Ys s'avère bien plus active que de Hs vis-à-vis de ces accepteurs artificiels, en particulier en termes de vitesse maximale de transfert (k_{cat}) comme cela a déjà été observé précédemment.

En conclusion, la substitution des domaines FMN chez les CPR chimériques solubles n'a pas annihilé leur capacité de transfert d'électrons et les constantes cinétiques de ces enzymes ont pu être mesurées et comparées à celles des CPR parentales. Globalement, les vitesses de transfert (k_{cat}) sont plus fortement atteintes que les constantes de demi-saturation ($K_{1/2}$) pour les substrats étudiés. Ces premiers résultats assurent le bon repliement des domaines au sein des chimères qui restent donc fonctionnels, bien que le transfert au travers les CPR chimères soit ralenti. Le fonctionnement du domaine FAD isolé, qui se reflète dans l'activité ferricyanure réductase, est assez similaire chez les enzymes natives et modifiées, confirmant ainsi que la substitution du domaine FMN n'affecte pas ou peu le repliement et le fonctionnement du reste de la protéine.

3.1.2. Activités P450

3.1.2.1. Tests P450 et analyses HPLC-MS : Mise au point du protocole

Les mesures d'activités P450 réductase des CPR ont été réalisées selon un protocole classique de tests P450 décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Le cytochrome P450-3A4 humain a été choisi pour ces essais car il métabolise un large spectre de substrats et son activité vis-à-vis d'hormones stéroïdiennes telles que la testostérone ou l'androstènedione sert communément de référence dans la littérature afin de comparer des systèmes entre eux (Causey et al., 1990; Choi et al., 2005; Gillam et al., 1993; Krauser et al., 2004; Reed et al., 2008; Walsky and Obach, 2004). La nature membranaire de ce P450 et des CPR généralement utilisées dans ce type de tests implique l'introduction de pseudo-micelles afin d'autoriser l'ancrage des protéines membranaires dans une couche lipidique et de favoriser les interactions hydrophobes entre partenaires.

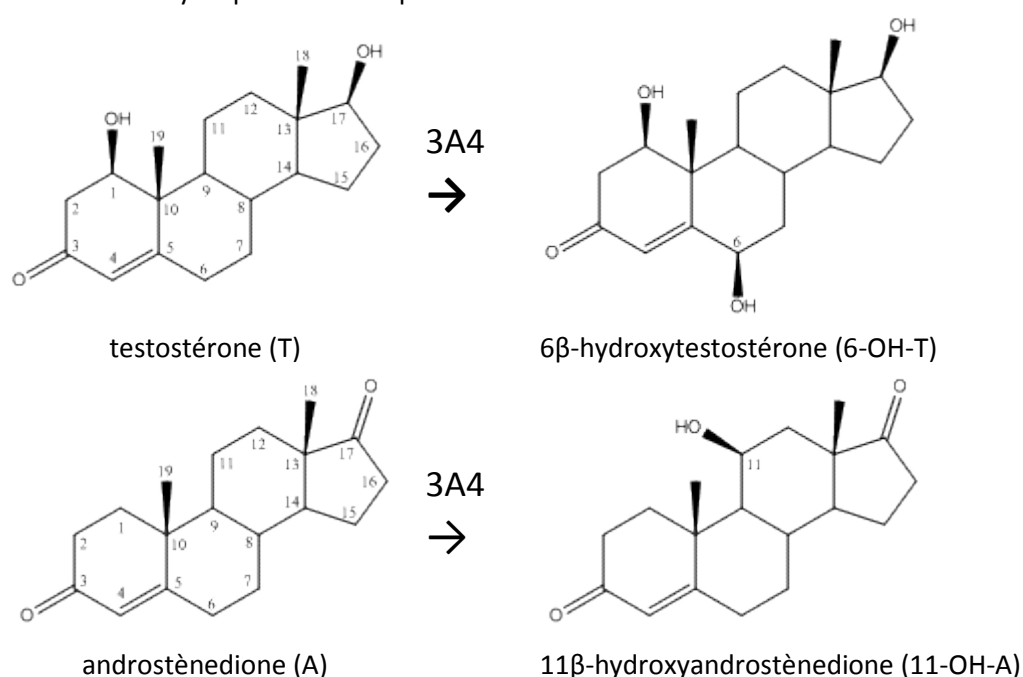


Figure 53 : Réaction majoritaire du métabolisme du P450-3A4 vis-à-vis de la testostérone (T) et de l'androstènedione (A) formant respectivement de la 6 β -hydroxytestostérone (6-OH-T) et de la 11 β -hydroxyandrostènedione (11-OH-T).

L'étape d'extraction des substrats et des produits afin de permettre leur analyse par HPLC-MS a malheureusement présenté quelques difficultés. En effet, le substrat étant ajouté en très large excès dans nos tests, la variation de sa concentration entre les échantillons devait de rester très faible voir négligeable, et la somme substrat plus métabolite aurait dû correspondre à la quantité initiale de substrat introduit dans chaque échantillon. Or les variations dans nos mesures étaient loin d'être négligeables (> 30 %). L'hypothèse la plus probable était qu'une partie du substrat et/ou du métabolite reste fixée à la protéine précipitée et ne soit pas extraite du culot. Afin d'optimiser cette phase d'extraction, plusieurs solvants ont été testés ainsi que des temps d'incubation, d'agitation et de centrifugation variables. Finalement, les difficultés provenaient semble-t-il non pas du solvant lui-même mais de la phase d'agitation lors de l'extraction avant centrifugation dont l'intensité (vortex) et la durée (>1 min) se sont révélées critiques.

Les réactions de métabolisation de la testostérone et de l'androstènedione par le P450-3A4 conduisent majoritairement à la formation respectivement de 6 β -hydroxytestostérone et 11 β -hydroxyandrostènedione (**Figure 53**). D'autres produits sont également formés mais en quantité bien plus faible (Krauser et al., 2004) (Choi et al., 2005). La plupart de ces sous-produits ont pu être identifiés sur nos chromatogrammes (**Figure 54**).

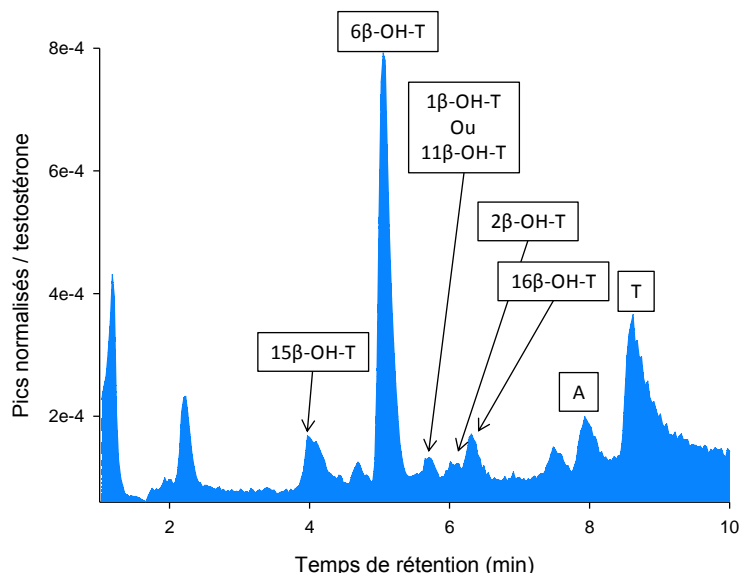


Figure 54 : Chromatogramme type en sortie d'HPLC-MS. Le produit majoritaire de métabolisation de la testostérone (T) est la 6 β -OH-T, mais on retrouve également la 15 β -OH-T, la 2 β -OH-T, la 16 β -OH-T et l'androstènedione (A). La 1 β -OH-T et la 11 β -OH-T sont difficilement différenciables.

3.1.2.2. CPR solubles versus CPR membranaires

Jusqu'à la fin des années 1990, aucune activité P450 réductase n'avait pu être observée en utilisant des CPR solubles, tronquées de leur partie N-terminale hydrophobe. Ce domaine membranaire était donc considéré comme indispensable à la reconnaissance et au transfert entre CPR et P450 (Black and Coon, 1982). Mais depuis, plusieurs groupes de recherche ont décrit l'observation d'une activité certes assez minime mais détectable dans des tests P450 ne contenant que des CPR solubles (Estabrook et al., 1996; Higashimoto et al., 2008; Huber III et al., 2009; Huber and Backes, 2007). Aucune valeur précise n'a pour autant été fournie. Pour mieux appréhender ce phénomène, nous avons étudié l'influence de la nature membranaire ou soluble des CPR lors de tests P450.

Tout d'abord, l'activité spécifique d'hydroxylation de la testostérone mesurée dans les tests contenant la CPR humaine membranaire correspond bien aux valeurs décrites dans la littérature pour des systèmes reconstitués semblables. Le ratio CPR :P450 communément utilisé est de 2 :1, et conduit à une activité variant de 14 à 30 nmol.min⁻¹.nmol⁻¹ de P450-3A4 selon les sources (Walsky and Obach, 2004; Yamazaki et al., 1996). Dans ces mêmes conditions, nous obtenons une activité spécifique avec Hm de 25 nmol.min⁻¹.nmol⁻¹ de P450-3A4. Concernant Ym, Inui & al. ont mesuré une activité de 10 nmol.min⁻¹.nmol⁻¹ de P450-3A4 pour un ratio Ym versus P450-3A4 égal à 1 (Inui et al., 2007). Dans nos conditions, nous devons doubler ce ratio pour obtenir une activité équivalente. Quoiqu'il en soit, nos résultats sont toujours du même ordre de grandeur que ceux préalablement publiés, ce qui nous permet de valider nos conditions expérimentales.

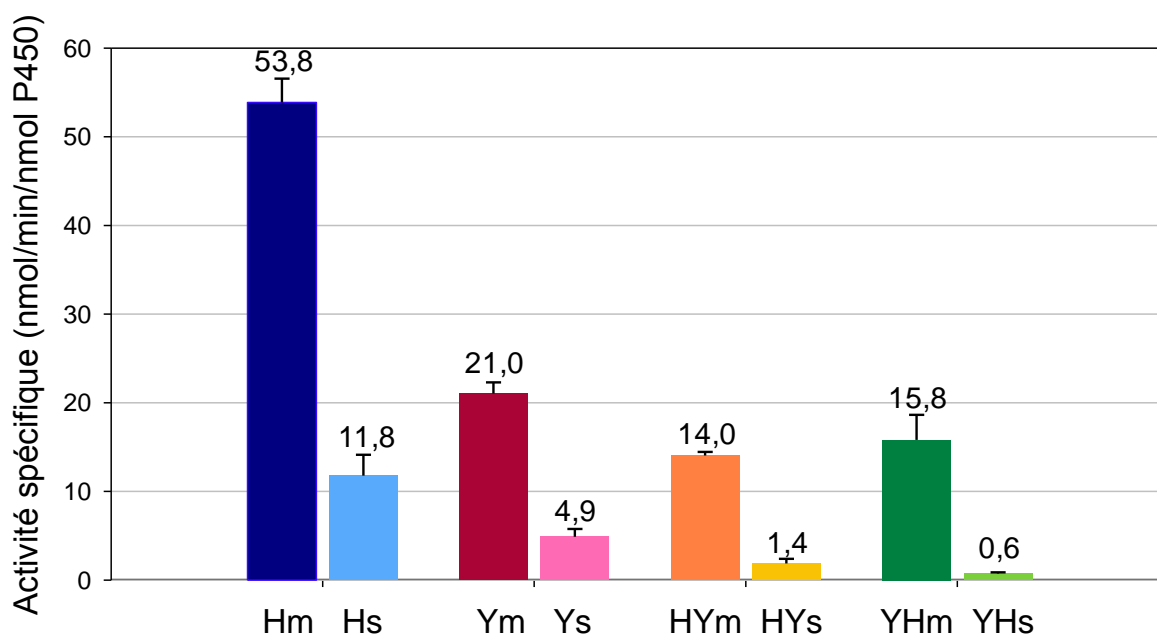


Figure 55 : Comparaison de l'activité P450 des CPR membranaires et solubles. L'activité spécifique des différents systèmes a été calculée à partir de taux de testostérone métabolisée en 6-hydroxytestostérone. Le ratio CPR :P450 et *cyt b₅*:P450 dans ces tests étaient de 5 :1 et 2 :1 respectivement.

Concernant le comportement des différentes CPR natives ou chimères, il est intéressant de noter que l'activité catalytique des systèmes contenant Hm est bien supérieure à celle des systèmes contenant Ym. Cette différence de comportement entre les deux protéines parentales est très certainement due à la nature du P450 utilisé dans nos tests. Le cytochrome choisi est en effet d'origine humaine, tout comme Hm. Or la coévolution de ces deux protéines a probablement permis l'optimisation de leur reconnaissance et de leurs interactions. Le ratio entre les activités spécifiques des deux CPR parentales Hm *versus* Ym est de 2,6 (**Figure 55**).

Bien que les activités mesurées dans les tests contenant des CPR solubles soient bien plus faibles que celles correspondant à des CPR membranaires, les protéines solubles chimériques assurent tout autant que les protéines natives le transfert d'électrons vers le cytochrome P450 (**Figure 55**). Ces résultats prouvent à nouveau que l'extrémité N-terminale membranaire des CPR joue certes un rôle majeur dans la reconnaissance des P450, puisque les CPR membranaires couplent bien mieux le P450-3A4 que les solubles, mais n'est pas pour autant indispensable. Les ratios des activités des CPR membranaires *versus* solubles sont respectivement de 4.5, 4.3, 10.0 et 26.3 chez H, Y, HY et YH.

Comme pour les accepteurs artificiels, les chimères sont à nouveau moins actives vis-à-vis du P450-3A4 que les CPR parentales. Mais cette différence d'activité est bien moindre avec l'accepteur naturel qu'avec le *cyt c* ou le ferricyanure. En effet, YHm et HYm présentent toutes deux des activités spécifiques vis-à-vis de la testostérone proches de 15 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{nmol}^{-1}$ de P450, cette valeur n'étant que 1,3 et 3,6 fois plus faible que celles de Ym et Hm respectivement. Dès lors que l'efficacité de transfert d'électrons vers des accepteurs artificiels semblait affectée chez les chimères, on aurait pu s'attendre à une aggravation de ce phénomène dans les tests P450. Mais le meilleur couplage apparent entre HYm, YHm et le P450-3A4 correspond en réalité à un turnover bien plus lent du cytochrome P450 comparé à celui du *cyt c* ou du ferricyanure. En effet, le P450-3A4 humain présente un turnover de seulement 83 min^{-1} vis-à-vis de l'hydroxylation en position 6 de la testostérone

(Krauser et al., 2004). Par conséquent, le ralentissement du transfert d'électrons chez les CPR chimériques est moins visible, ou, en d'autres termes, a moins d'impact sur l'activité globale d'un système lorsque l'accepteur final est lent plutôt que lorsqu'il est rapide comme c'est le cas du cyt c.

En conclusion, les CPR chimères sont capables de fournir en électrons le P450-3A4 afin de métaboliser de la testostérone, prouvant à nouveau l'intégrité de l'ensemble et le bon repliement des protéines chimériques. L'efficacité de celles-ci avoisine même celle de la CPR native de levure. Par ailleurs, une activité est détectée dans les tests contenant des CPR tronquées, prouvant à nouveau le caractère dispensable de l'ancre N-terminale membranaire des CPR. Et finalement, le ralentissement des transferts au sein des CPR a bien plus d'impact sur l'ensemble du système lorsque l'accepteur final possède une constante de vitesse de réduction plus grande.

3.1.2.3. L'influence du ratio CPR : P450

Après avoir mesuré l'influence de la partie membranaire des CPR sur leur activité P450 et avoir comparé l'efficacité de transfert des CPR chimériques et parentales, l'influence du ratio CPR :P450 a été analysée. Comme l'activité des CPR solubles est bien plus faible que celle des CPR membranaires, les ratios testés pour les premières (CPR solubles vs. P450 = 5, 10, 30 ou 60) étaient supérieurs à ceux des secondes (CPR membranaires vs. P450 = 1, 2, 5 ou 10).

La **Figure 56** présente l'effet du ratio CPR :P450 sur le taux de métabolisation de la testostérone dans les tests P450. Dans le cas des tests contenant des CPR solubles (**Figure 56 A**), les activités spécifiques des systèmes reconstitués finissent par atteindre un plateau pour des valeurs élevées du ratio CPR :P450. Ce phénomène correspond à une saturation du cytochrome vis-à-vis de son partenaire rédox. Cette saturation est plus rapidement atteinte avec les CPR chimères dont l'activité reste par ailleurs toujours inférieure à celles des CPR parentales. L'efficacité de transfert de HYS semble même être indépendante du ratio CPR :P450 dans nos conditions expérimentales. Cela signifie que l'activité maximale est déjà atteinte pour un ratio de 5 HYS par cytochrome, et que la faiblesse de l'activité mesurée n'est pas due à un défaut de CPR mais plutôt à une mauvaise reconnaissance entre celle-ci et le P450-3A4.

L'influence du ratio CPR :P450 sur l'activité des systèmes totalement membranaires (**Figure 56 B** et **Figure 57**) est différente de celle observée avec des systèmes contenant des CPR solubles. Il est tout de même important de noter que la gamme de ratios CPR :P450 testée ici est bien plus réduite. Ainsi les systèmes membranaires semblent moins sujets à saturation que les systèmes partiellement solubles, en particulier pour Hm. Mais ces mêmes systèmes atteindraient certainement leur activité spécifique limite pour des valeurs de ratio CPR :P450 plus élevées testées avec les CPR solubles (jusqu'à 60 :1). Par ailleurs, lorsque la CPR et le cytochrome P4150 sont en concentration équimolaire, les CPR chimériques membranaires s'avèrent de meilleurs partenaires rédox pour le P450-3A4 que Ym ; et lorsque le ratio augmente, les activités de ces trois CPR restent toujours proches. Ces résultats confirment à nouveau que la nature de l'ancre membranaire des CPR (provenant de Hm ou de Ym) ne peut pas à elle seule expliquer la qualité du couplage. En effet, Hm est particulièrement efficace tandis que Ym couple assez mal le P450-3A4. Mais la chimère HYm possède exactement la même partie membranaire que Hm et son activité est en moyenne bien plus faible de Hm, HYm se comportant plutôt comme Ym et YHm.

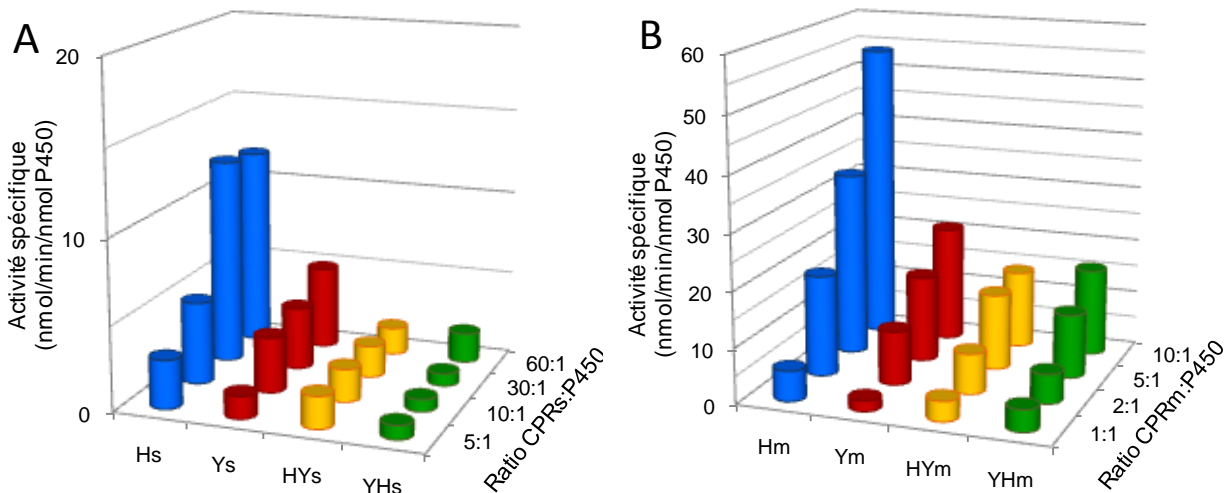


Figure 56 : Influence du ratio CPR:P450 sur les activités du P450-3A4 humain dans des tests contenant des CPR solubles (A) ou membranaires (B). L'activité spécifique des différents systèmes a été calculée à partir de taux de testostérone métabolisée en 6β -hydroxytestostérone. Les histogrammes correspondant aux échantillons contenant H, Y, HY et YH sont respectivement en bleu, rouge, jaune et vert. A. Les différents ratios CPR soluble vs P450 testés étaient de 5, 10, 30 et 60. B. Les ratios CPR:P450 testés avec des CPR membranaires sont de 1, 2, 5 ou 10. Dans tous les échantillons, le ratio cyt b_5 :P450 est de 2:1.

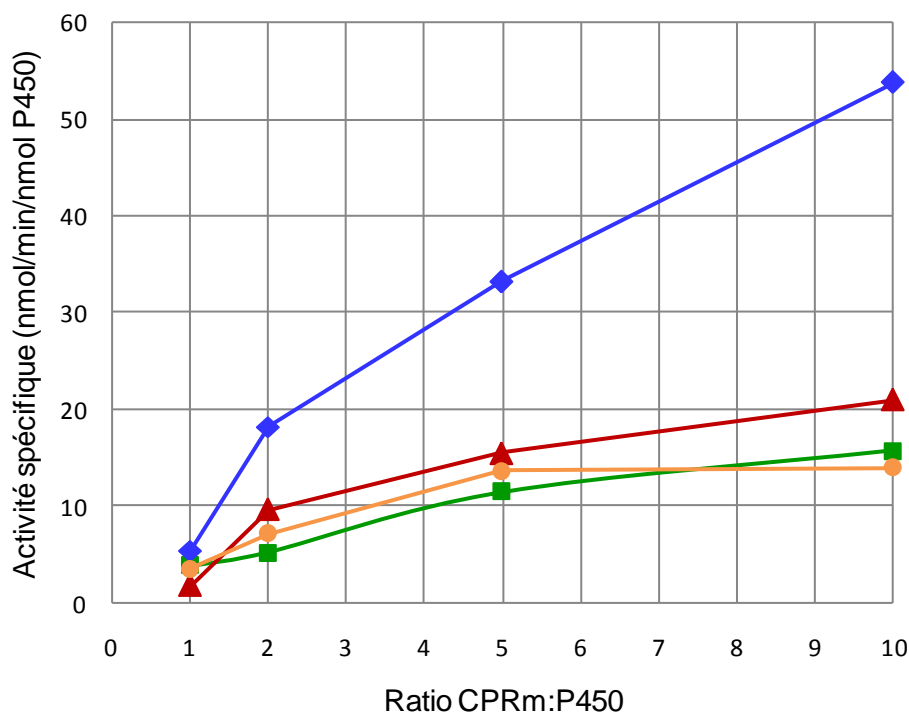


Figure 57 : Influence du ratio CPR membranaire :P450 sur l'activité spécifique du système. L'activité spécifique des différents systèmes a été calculée à partir de taux de testostérone métabolisée en 6-hydroxytestostérone. Dans tous les échantillons, le ratio cyt b_5 :P450 est de 2:1.

En conclusion, le comportement de Hm se détache par rapport aux autres CPR moins actives et plus sujettes à la saturation lorsque les valeurs du ratios CPR :P450 augmentent. Les chimères ont un comportement vis-à-vis du P450-3A4 toujours assez proche de Ym.

3.1.2.4. L'influence du cytochrome b_5

Le cyt b_5 est un autre acteur des systèmes P450 de classe II capable de fournir le deuxième électron du cycle de certains cytochromes P450. Le mode d'action et le caractère nécessaire ou juste stimulant de ce partenaire rédox est encore sujet à débats (Voir Introduction § 3.2.3). Quoiqu'il en soit, le cyt b_5 est classiquement ajouté aux tests P450 afin de stimuler leur activité (ratio cyt b_5 :P450 de 2 :1). Nous avons évalué l'influence du cyt b_5 ajouté dans nos tests P450 en systèmes reconstitués. Le but était notamment de vérifier que les activités spécifiques des tests contenant des CPR chimériques n'étaient pas simplement dues aux transferts électroniques pris en charge par le cyt b_5 qui se substituerait alors totalement aux CPR.

Pour ce faire, des tests P450 ont été effectués en présence et en absence de cyt b_5 , toutes autres concentrations étant par ailleurs identiques. L'ajout de cyt b_5 stimule réellement l'activité dans du P450-3A4, mais n'est pas indispensable au métabolisme de la testostérone (**Figure 58**). Ce partenaire rédox ne correspond donc pas au système principal de transport d'électrons au P450 dans nos tests et ne peut se substituer totalement à la CPR. Par ailleurs, le ratio entre les activités avec et sans cyt b_5 n'est pas plus important chez les CPR chimères que parentales, et reste proche de 3 quelques soit la nature de la CPR utilisée. Les deux chimères présentent d'ailleurs un comportement intermédiaire entre le ratio maximal de Ym et celui minimal de Hm. Yamasaki & *al.* mesurent un ratio de 3,4 entre les activités de test contenant Hm avec et sans cyt b_5 (Yamasaki et al., 1996), tandis que Inui & *al.* trouvent dans des conditions semblables mais en présence de Ym un ratio proche de 2 (Inui et al., 2007). Ces valeurs restent proches de celles que nous mesurons en tenant compte du fait que tous ces tests sont réalisés selon des protocoles similaires mais jamais identiques.

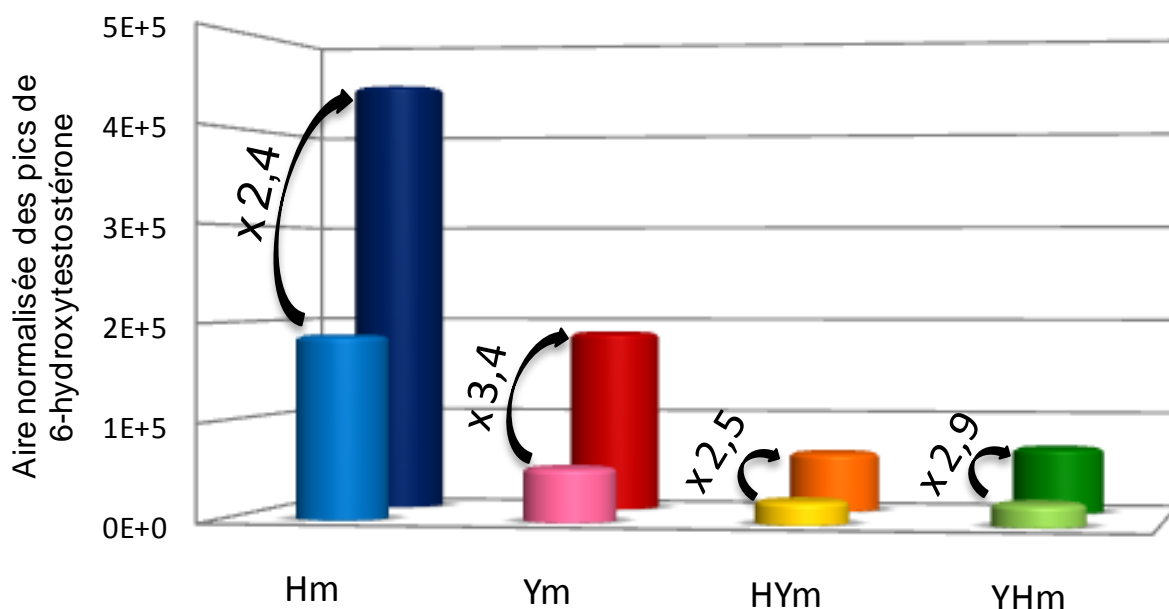


Figure 58 : Influence du cyt b_5 sur l'activité catalytique dans les tests P450. L'activité spécifique des différents systèmes a été calculée à partir de taux de testostérone métabolisée en 6-hydroxytestostérone. Les tests P450 ont été réalisés avec des CPR membranaires pour un ratio CPR :P450 de 5 :1 en absence (première rangée) ou présence (deuxième rangée) de cyt b_5 . Les valeurs indiquées le long des flèches correspondent aux ratios entre les deux rangées d'histogrammes.

Ces résultats confirment que l'activité P450 en présence de CPR chimériques, même lorsqu'elle est faible, n'est pas due à la présence de cyt b_5 dans les échantillons mais bel et bien à des transferts CPR→P450.

3.1.3. Conservation de la voie de transfert d'électrons chez les CPR chimères

La nature chimérique des CPR HY et YH nous a poussé à vérifier de façon plus précise leur mode de fonctionnement afin de s'assurer que ces enzymes transféraient les électrons de façon analogue aux CPR parentales. Il s'agissait en particulier de contrôler que le chemin emprunté par les électrons lors de la réduction d'accepteurs artificiels ou naturels reste inchangé chez les chimères.

Deux phénomènes auraient pu biaiser l'interprétation de nos résultats et devaient pour cela être écartés. Tout d'abord, nous devons nous assurer que l'activité des CPR chimériques n'était pas due à des transferts interflavines bimoléculaires. En effet, la voie électronique classique chez les CPR natives est la suivante : NADPH → FAD → FMN → accepteur, avec un transfert interne entre les cofacteurs FAD et FMN d'une même protéine. L'enjeu était alors de déterminer si les perturbations au sein de nos chimères étaient capables d'entraver ce transfert interne. Les activités détectées auraient alors correspondu aux transferts bimoléculaires du FAD d'une chimère vers le FMN d'une autre chimère (voir § 3.1.3.1).

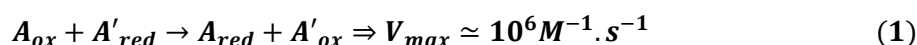
Par ailleurs, une autre éventualité, bien que très peu probable, se devait d'être écartée : le transfert direct du cofacteur FAD vers les accepteurs (voir § 3.1.3.2). Ce phénomène n'est observé chez les CPR natives que vis-à-vis de petites molécules organiques comme le ferricyanure ; le cyt *c* et les P450 ne pouvant être réduits que par le domaine FMN. Afin de tester la validité de nos analyses biochimiques, les mesures présentées ci-dessous ont été réalisées.

3.1.3.1. Transfert interflavine intramoléculaire

Afin de vérifier le caractère intramoléculaire du transfert entre les cofacteurs flaviniques des chimères, leur vitesses initiales de réduction du cyt *c*, accepteur artificiel réduit par le domaine FMN uniquement, ont été mesurées à différentes concentrations d'enzymes (**Figure 59**). La gamme des concentrations testée variait de plus de 45 nM pour atteindre des valeurs inférieures au nanomolaire. Qu'il s'agisse de HYs ou YHs, les diagrammes correspondant aux tracés de ces vitesses initiales de transferts *versus* la concentration en CPR présentaient tout deux des dépendances linéaires. Les pentes de ces droites, respectivement de 3 et 2 s⁻¹, reflètent parfaitement les valeurs de $k_{cat}^{cyt\ c}$ présentées dans le **Tableau 12**.

La **Figure 59** présente cette dépendance affine pour la chimère YHs. La nature linéaire de ce graphique prouve le caractère intramoléculaire de la réaction de transfert électronique, en particulier dans des conditions de dilution si élevée. En effet, une réaction bimoléculaire aurait impliqué une dépendance en x², avec une accélération de la perte de vitesse initiale lors des fortes dilutions d'enzymes.

Par ailleurs, la vitesse limite maximale d'une réaction d'oxydoréduction mettant en jeu deux protéines, telle que présentée dans l'équation (1) ci-dessous, est de l'ordre de 10⁶ M⁻¹.s⁻¹. Cette valeur correspond à un $k_{cat}^{théorique}$ de 10⁻³ s⁻¹ (Bertini et al., 1993) alors que les $k_{cat}^{expérimentaux}$ sont de 2 à 3 s⁻¹. Là aussi, une différence de plus de 3 ordres de grandeurs entre la vitesse théorique d'un transfert bimoléculaire et celle mesurée dans nos tests confirme le caractère intramoléculaire des transferts entre flavines au sein de nos CPR chimères.



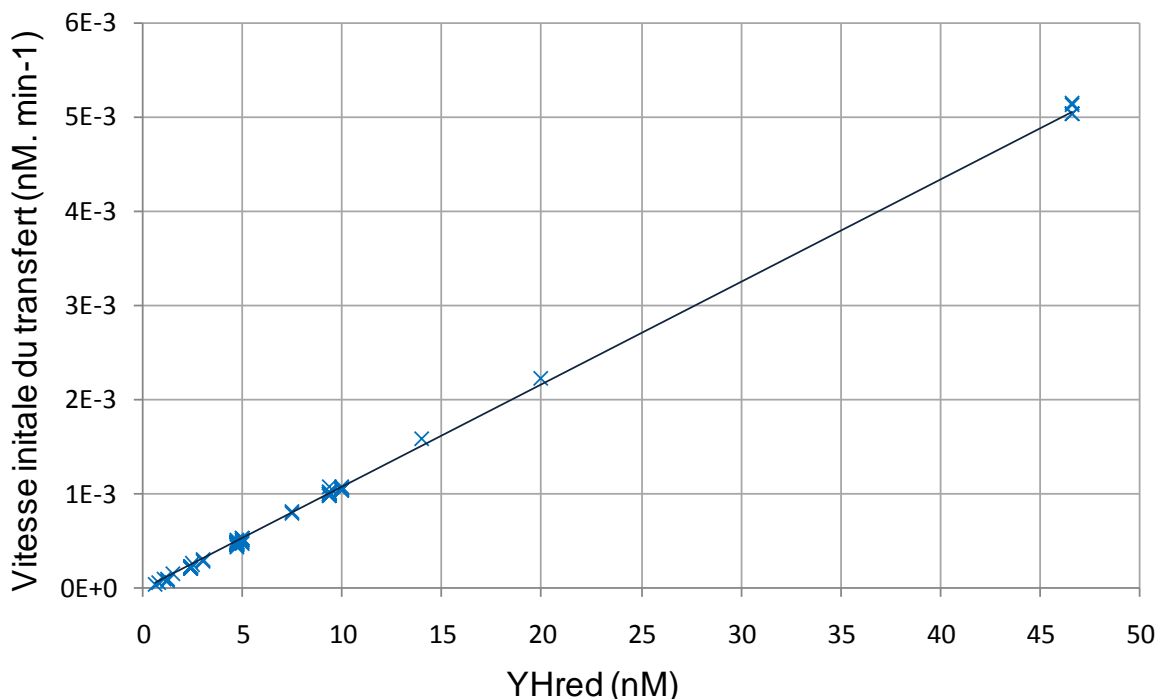


Figure 59 : Linéarité de la vitesse de transfert électronique au cyt *c* en fonction de la concentration en CPR chimérique soluble YHs. Les activités ont été mesurées pour une concentration en substrat de 50 μM . Le turnover de l'enzyme augmente de façon linéaire en fonction de sa concentration avec une pente de 2 s^{-1} correspondant à la constante catalytique de l'enzyme.

3.1.3.2. Transfert externe via le domaine FMN

Bien que les résultats présentés dans le paragraphe précédent aient confirmés la conservation du chemin électronique au sein des CPR chimères, un dernier phénomène parasite possible devait être écarté. Il était en effet important de contrôler que les accepteurs comme le cyt *c* ou les P450, habituellement réduit via le domaine FMN de la CPR, ne se comportaient pas vis-à-vis des CPR chimériques comme le ferricyanure qui prend ses électrons directement au niveau du cofacteur FAD.

Pour cela, les CPR ont été déplétées de leur cofacteur FMN. Il est possible de ne retirer que le cofacteur FMN sans pour autant atteindre la fixation du FAD car l'affinité des CPR pour ces deux flavines est suffisamment éloignée avec un $K_d^{\text{FAD}} < 1 \text{ nM}$ tandis que les valeurs de K_d^{FMN} varient entre 10 et 20 nM selon les types de CPR étudiées (Louerat-Oriou et al., 1998; Marohnic et al., 2006; Shen and Kasper, 2000; Shen et al., 1989; Vermilion et al., 1981).

La **Figure 60** présente les activités cyt *c* des CPR Ys et YHs partiellement ou totalement déplétées en FMN. La présence des différentes flavines au sein des CPR et leur stœchiométrie ont été mesurées par HPLC-MS après dénaturation des protéines. Ainsi, les CPR ne contenant plus du tout de FMN, mais dont le cofacteur FAD est toujours bien présent, ne présentent plus que 3 et 15 % de l'activité mesurée respectivement chez Ys et YHs avant dialyse. De plus la recombplémentation progressive en FMN des CPR déplétées permet de retrouver entre 70 et 100 % de l'activité initiale. A l'inverse, l'ajout d'un surplus de FAD ne permet pas du tout d'augmenter l'activité des CPR déplétées en FMN.

Ainsi, le cofacteur FAD même chez les CPR chimériques ne peut soutenir à lui seul le transfert électronique vers le cyt c dont le comportement en tant qu'accepteur est analogue à celui des P450. La voie électronique chez les chimères est donc bien identique à celle décrite chez les CPR natives, avec un premier transfert interne entre les cofacteurs flaviniques d'une même protéine, puis un second transfert externe du FMN à l'accepteur final.

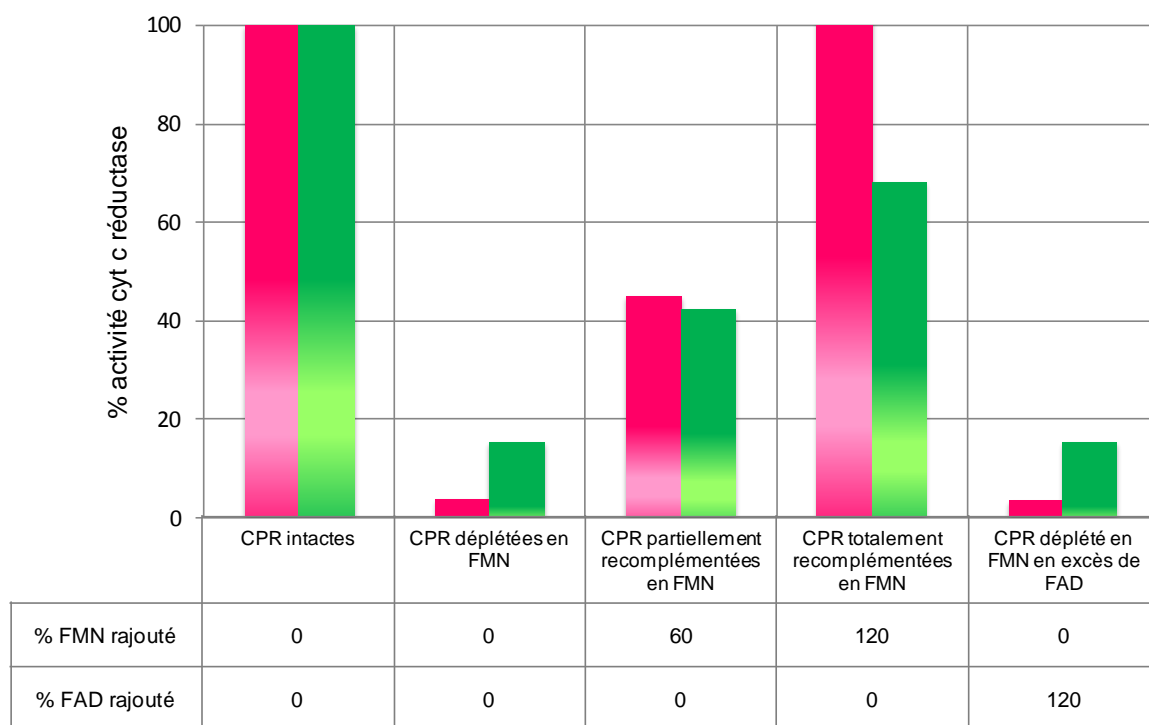
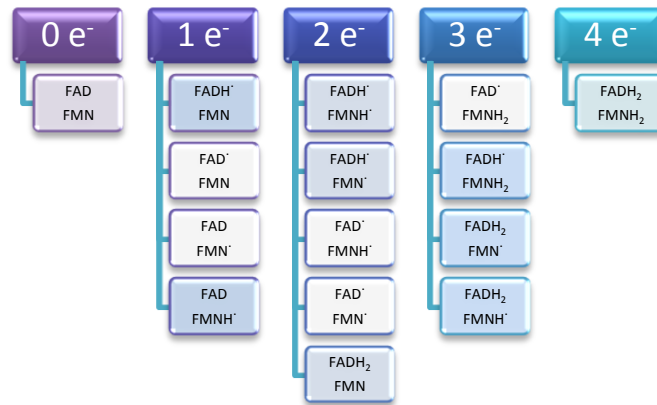


Figure 60 : Activité cyt c réductase de Ys et YHs déplétées puis reconstituées en FMN. Les histogrammes roses et verts correspondent respectivement à Ys et YHs. Les activités ont été mesurées pour une concentration en substrat de 50 μ M. La stoechiométrie des cofacteurs flaviniques de chaque échantillon a été mesurée par HPLC-MS. Le tableau sous le graphique indique le pourcentage de flavines ajouté aux solutions protéiques par rapport à la quantité de CPR présente. CPR intactes : activité cyt c réductase des CPR avant déplétion utilisée comme témoin (100 %). CPR déplétées en FMN : activité des CPR après dialyse. Ys et YHs déplétées en FMN, mais contenant toujours une concentration équimolaire de cofacteur FAD ; 3 et 15 % par rapport aux témoins. CPR partiellement reconstituées en FMN : même échantillon que précédemment après l'ajout de FMN pour un ratio FMN:CPR de 6:10 ; 40 % de l'activité témoin. CPR totalement reconstituées en FMN : même échantillon que précédemment après la reconstitution totale en FMN. 100 % et 68 % des activités témoin. CPR déplétée en FMN et en excès de FAD : l'ajout de FAD aux solutions de CPR déplétées en FMN n'a aucune influence sur leurs activités.

3.2. Titrage des CPR



Les transferts électroniques au sein de la CPR présentent l'avantage de pouvoir être suivis par spectroscopie d'absorption. Mais le fait que les deux flavines, FAD et FMN, possèdent les mêmes caractéristiques d'absorption pour un même état redox rend souvent difficile l'interprétation des données spectrales. En effet, les deux flavines n'ont pas les mêmes potentiels redox ; elles peuvent donc être présentes à des degrés d'oxydoréductions différents pour un potentiel donné. La déconvolution de la variation des spectres au cours des transferts électroniques est alors nécessaire, et pas toujours suffisante, afin de déterminer sous quelle forme redox se trouve telle ou telle flavine à un temps t de l'expérience.

Le diagramme ci-dessus présente la totalité des formes redox théoriques pour une CPR à 0, 1, 2, 3 ou 4 électrons. En réalité, certaines formes ne sont jamais représentées, ou alors seulement de façon transitoire, au cours du cycle des CPR. Ces dernières sont indiquées par des cadres incolores. La semiquinone neutre du FAD (FADH[•], semiquinone bleue) n'est par exemple présente que chez la réductase du P450-BM3 (voir Introduction § 4.5.2). Pour autant, les CPR réduites par le NADPH (2 électrons sous la forme d'un ion hydrure) sont présentes sous plusieurs espèces telles que FADH₂/FMN ou FADH[•]/FMNH[•], l'équilibre entre ces deux formes dépendant de la nature de la CPR et des conditions expérimentales.

La **Figure 61** présente l'évolution théorique du spectre d'une CPR au cours de sa réduction. Deux longueurs d'ondes particulières permettent de suivre l'état redox de la CPR :

- $\lambda_{455\text{nm}}$ qui est le maximum d'absorption des flavines oxydées (spectre vert) ;
- $\lambda_{585\text{nm}}$ qui est le maximum d'absorption des semiquinones qui sont absentes lorsque la CPR est totalement oxydée (spectre vert), et qui apparaissent dans les états à 1, 2 et 3 électrons (spectres bleu, violet et magenta) avant de disparaître lorsque la CPR est totalement réduite (spectre rose).

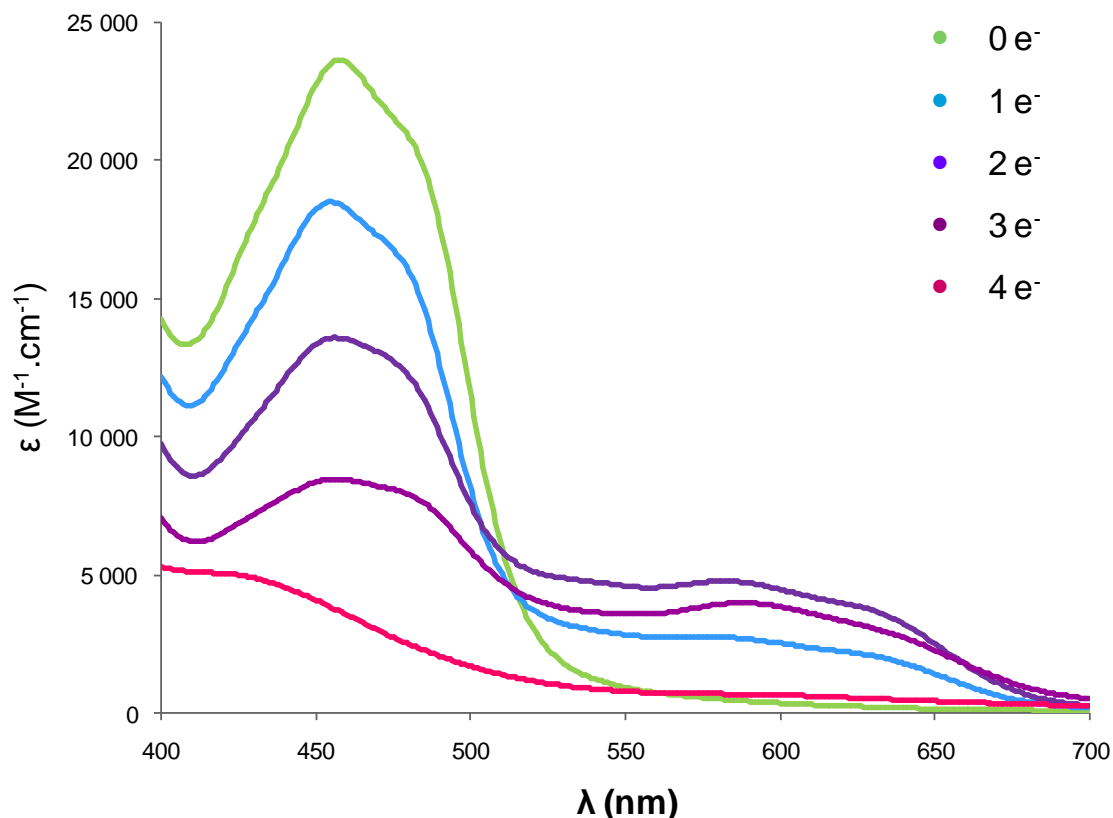


Figure 61 : Spectres d'absorption théoriques d'une CPR comportant entre 0 et 4 électrons. Vert : spectre d'une CPR totalement oxydée (FAD/FMN), bleu : spectre d'une CPR réduite à 1 électron (FADH[•]/FMN ou FMNH[•]/FAD), violet : spectre d'une CPR réduite à 2 électrons ou demi-réduite dont les deux cofacteurs seraient sous leur forme semiquinone (FADH[•]/FMNH[•]), magenta : spectre d'une CPR réduite à 3 électrons (FADH₂/FMNH[•] ou FADH[•]/FMNH₂), et rose : spectre d'une CPR totalement réduite (FADH₂/FMNH₂).

L'apparition des différentes formes rédox des CPR au cours leur titrage chimique au dithionite de sodium a été déterminée par spectrométrie d'absorption en anaérobie. L'évolution des spectres totaux de YHs au cours de sa réduction est présentée dans la **Figure 62**. On peut ainsi clairement observer la formation puis la disparition des semiquinones caractérisées par le large pic autour de 600 nm, ainsi que la diminution du pic autour de 450 nm.

Les deux chimères, HYs et YHs, ont des comportements assez semblables vis-à-vis de la titrage au dithionite (**Figure 63**). En effet, les espèces à 1, 2 et 3 électrons présentent les mêmes ratios entre l'absorption à 455 nm et 585 nm correspondant respectivement aux espèces oxydées et semiquinones. L'absorption à 585 nm est multipliée par 2 entre les formes à 1 et 2 électrons ce qui reflète vraisemblablement la formation d'une première puis d'une seconde semiquinone sur les cofacteurs FAD et FMN respectivement. Ces semiquinones semblent par contre plus stables, c'est-à-dire plus difficiles à réduire, chez YHs que HYs. Cette différence vient probablement des potentiels rédox des deux CPR chimères qui ne sont certainement pas identiques (voir § 3.4).

L'évolution des spectres des deux CPR chimères lors de leur réduction chimique par le dithionite correspond à un comportement classique, analogue à celui des CPR natives décrit dans la littérature (Gutierrez et al., 2002; Sevrioukova et al., 1996a; Vermilion and Coon, 1978b). La substitution du domaine FMN n'a donc pas affecté la capacité de stabilisation de la forme semiquinone des flavines au sein des chimères.

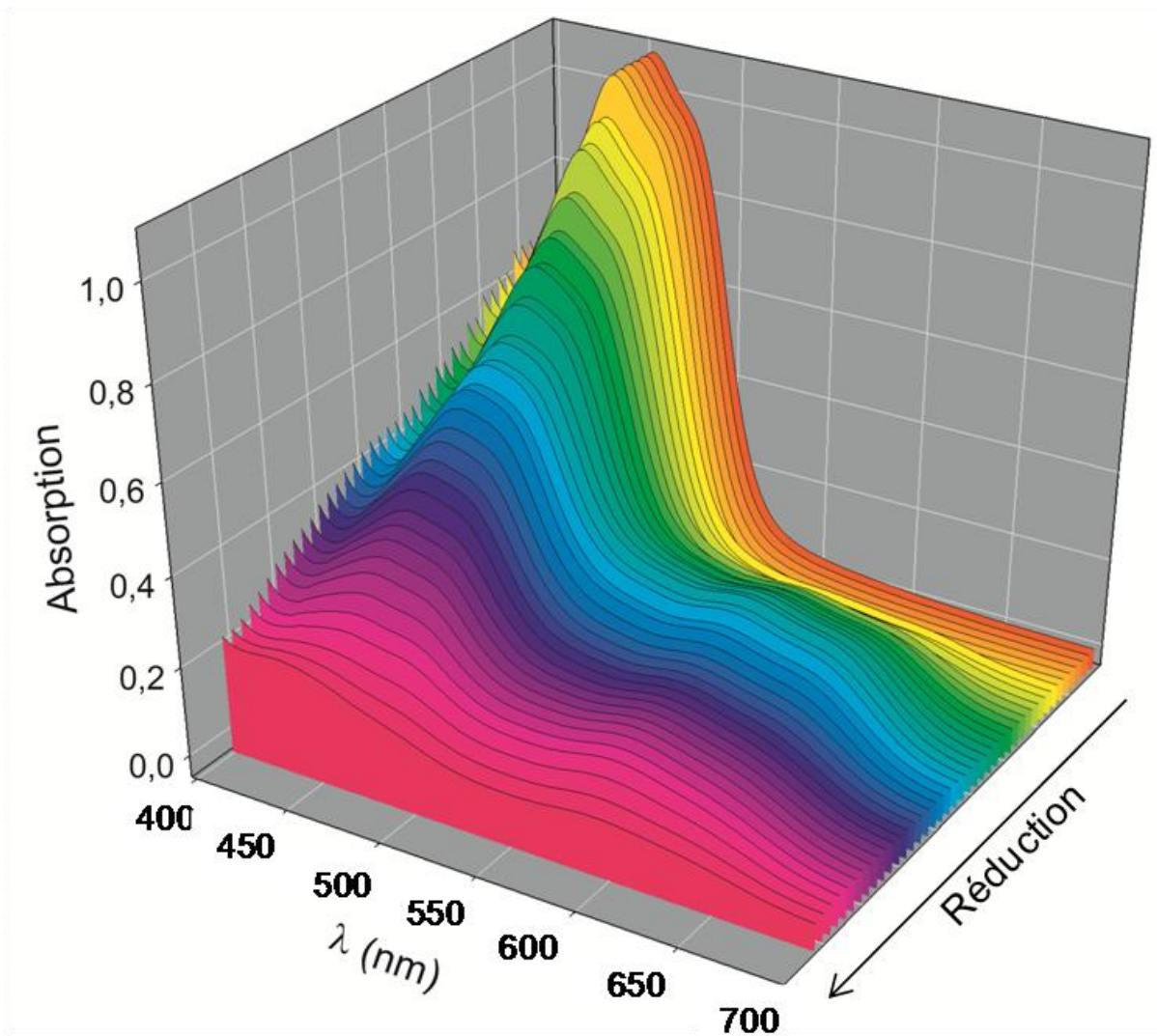


Figure 62 : Titrage chimique de YHs par le dithionite suivi par spectrométrie d'absorption. Les spectres enregistrés au cours de ce titrage passent du rouge (CPR totalement oxydée) au bleu (CPR demi-oxydée) jusqu'au magenta (CPR totalement réduite).

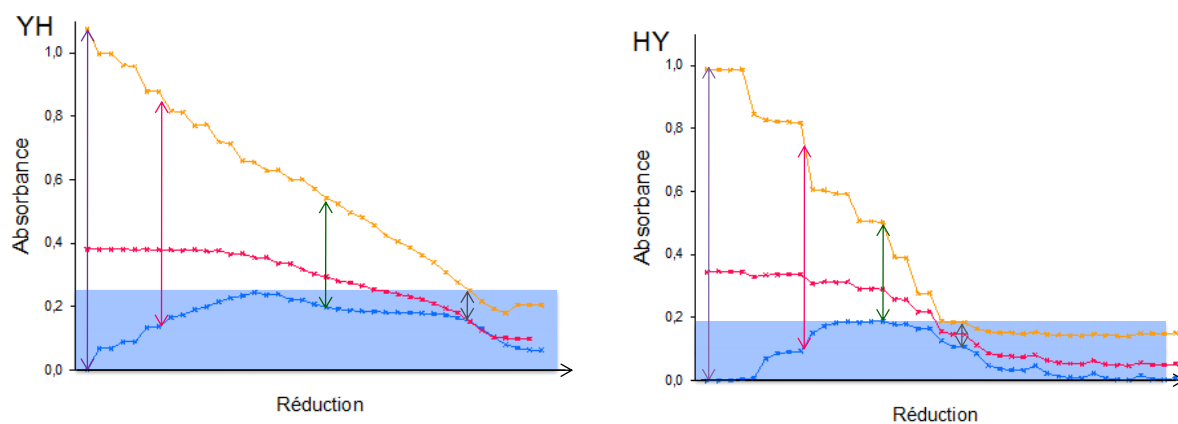


Figure 63 : Evolution de l'absorption des CPR chimères au cours de leur titrage chimique par le dithionite. Les graphes jaune, rouge et bleu représentent respectivement la variation de l'absorption à 455 nm, 500 nm et 585 nm. Les flèches violettes, roses, vertes et grises indiquent respectivement les formes à 0, 1, 2, et 3 électrons des CPR YHs et HYs.

3.3. Etudes de cinétique rapide

3.3.1. Analyse par stopped-flow couplée à de la spectrométrie d'absorption

Les expériences de stopped-flow couplé à la spectrométrie d'absorption permettent d'étudier les cinétiques des premiers transferts électroniques au sein des CPR. Il était ainsi possible de suivre la réduction du FAD par la NADPH et le transfert interne quasi instantané du FAD réduit au FMN (**Figure 64 B**). Mais les molécules de CPR n'étant pas synchronisées, la déconvolution des spectres ne permet pas de connaître les cinétiques des transferts électroniques suivants (**Figure 64 C**) car il n'est plus possible de déterminer l'état rédox de chacune des flavines de façon précise.

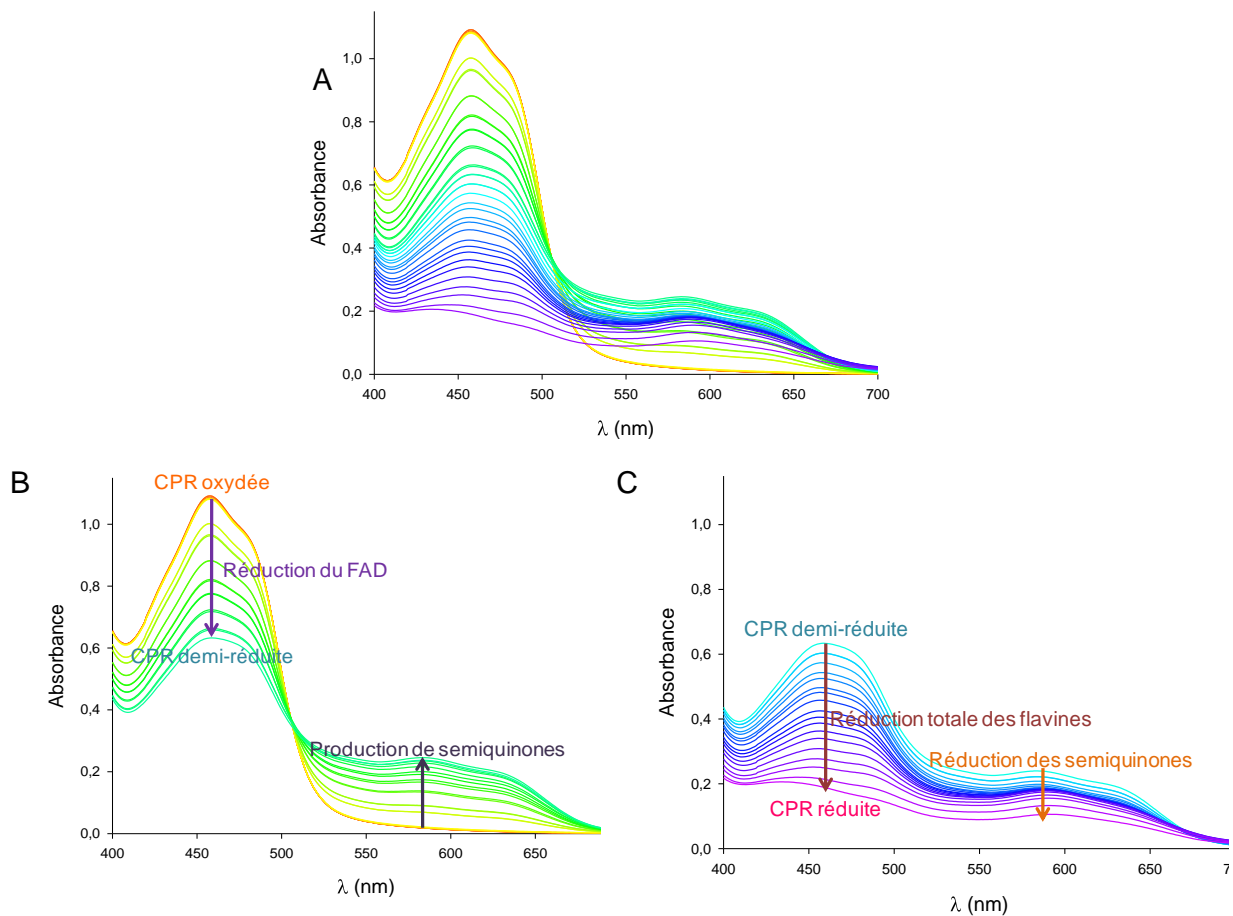


Figure 64 : A. Evolution du spectre d'absorption lors d'expériences de cinétique rapide (stopped-flow). Le mélange de NADPH avec une solution de CPR oxydée conduit à la réduction quasi-totale de l'enzyme. B. La première partie de cette réduction correspond aux transferts pratiquement instantanés $\text{NADPH/FAD/FMN} \rightarrow \text{NADP}^+/\text{FADH}_2/\text{FMN} \rightarrow \text{NADP}^+/\text{FADH}^\cdot/\text{FMNH}^\cdot$ qui se caractérisent par une diminution de moitié de $A_{455 \text{ nm}}$ (réduction du FAD) et une augmentation de $A_{585 \text{ nm}}$ (l'apparition de semiquinones). C. La poursuite de la réduction de la CPR implique l'extinction pratiquement totale de toute absorption.

Les données de stopped-flow correspondant à l'évolution de l'absorbance aux longueurs d'ondes caractéristiques (**Figure 65**) ont permis d'évaluer les constantes de transferts au sein des CPR parentales et chimères (**Tableau 13**). Mais avant d'analyser les valeurs mêmes de ces constantes de vitesse, les courbes de la **Figure 65** nous renseignent quant à la quantité de flavine réduites au cours des expériences. Les données enregistrées sur une échelle de temps très courte (0,25 s) permettent d'accéder aux constantes de réduction de pseudo-premier ordre du FAD par le NADPH qui sont extrêmement rapides (pouvant approcher les 400 s^{-1}), et d'observer dans certains cas un laps de temps de quelques dixièmes de seconde entre la réduction du FAD et le transfert interne vers le

FMN. La cinétique du transfert interflavine chez Hs et YHs coïncide parfaitement avec la réduction du FAD, tandis qu'un intervalle est détectable chez Ys et HYs pour lesquelles le second transfert a lieu bien après et/ou bien plus lentement que le premier. Ces intervalles pourraient correspondre à des réorganisations conformationnelles ou la formation d'espèces compétentes pour le transfert de charge (CT).

A première vue, les chimères semblent avoir toutes deux des comportements similaires mais bien distincts de ceux des CPR parentales. La diminution de l'absorption à 455 nm dans les temps très courts ($< 0,01$ s) est analogue pour l'ensemble des CPR, mais la réduction du FMN ralentit ensuite fortement chez les deux chimères. Il semblerait que 35 % des CPR chimériques soient dans une conformation très favorable à la réduction du FAD tandis que les 65 % restant soient au contraire très difficilement réductibles. Concernant l'apparition des semiquinones à 585 nm, les chimères adoptent un comportement intermédiaire entre les deux protéines parentales avec, au cours du temps ($t > 0,25$ s), HYs plus proche de Hs (accumulation de semiquinones) et YHs analogue à Ys (faible accumulation de semiquinones).

L'analyse des ces courbes montre un comportement particulier des chimères qui se différencie des CPR parentales, et dont la nature du domaine FMN semble dicter la possibilité d'accumuler des semiquinones ou pas.

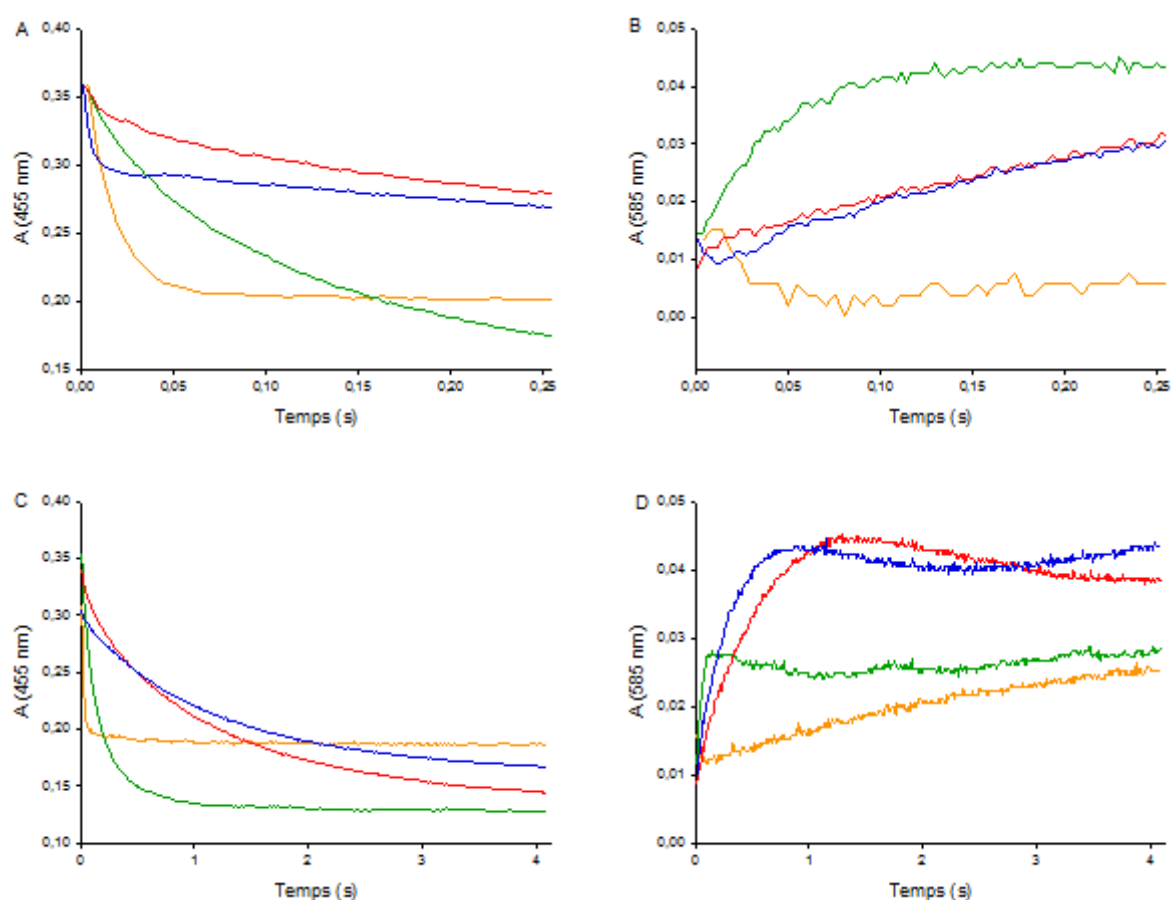


Figure 65 : Evolution de l'absorption à deux longueurs d'onde (455 nm et 585 nm) des différentes CPR parentales et chimères au cours de leur réduction par le NADPH suivie au stopped-flow. Des solutions équimolaires de CPR oxydées et de NADPH à 50 μ M sont utilisées. Les courbes vertes, oranges, bleues et rouges correspondent respectivement à Hs, Ys, HYs et YHs. A. Evolution de $A_{455\text{ nm}}$ entre 0 et 0,25 s. B. Evolution de $A_{585\text{ nm}}$ entre 0 et 0,25 s. C. Evolution de $A_{455\text{ nm}}$ entre 0 et 4 s. D. Evolution de $A_{585\text{ nm}}$ entre 0 et 4 s.

3.3.2. L'influence du ratio NADPH :CPR

Les comportements biochimiques des CPR parentales et leurs divergences ont déjà été décrits dans la littérature (Louerat-Oriou et al., 1998). La comparaison des valeurs de l'absorption à 455 nm au bout de 2 s d'incubation montre par exemple que, dans les mêmes conditions, Hs atteint un niveau de réduction plus important que Ys. L'évolution de l'absorption à 585 nm chez Hs reflète une forte production de semiquinones en moins de 0,5 s qui tendent à être elles-mêmes réduites sous leur forme hydroquinone (diminution de $A_{585 \text{ nm}}$ pour des temps $> 0,5$ s). Ys accumule par contre très peu de semiquinones ($A_{585 \text{ nm}}(t=0,5)$ 50 fois inférieure à celle de Hs), mais cette faible quantité de semiquinones augmente avec le ratio NADPH :CPR. A l'inverse, Hs accumule moins de semiquinones lorsque le ratio NADPH :CPR augmente car celles-ci sont alors réduites vers un état rédox inférieur (espèce $\text{FADH}^{\cdot}/\text{FMNH}^{\cdot}$ est transitoire). La faible accumulation de semiquinones chez Ys est probablement due à la proximité des potentiels rédox entre les formes oxydée/semiquinone et semiquinone/réduite du FMN. D'après ces données thermodynamiques, Ys ne devrait accumuler aucune semiquinone. Mais, dans le cas d'une concentration en NADPH élevée, l'accumulation de semiquinone observée est probablement causée par la formation lente de l'espèce à 3 électrons après auto-oxydation de la CPR et un transfert interne du FAD au FMN.

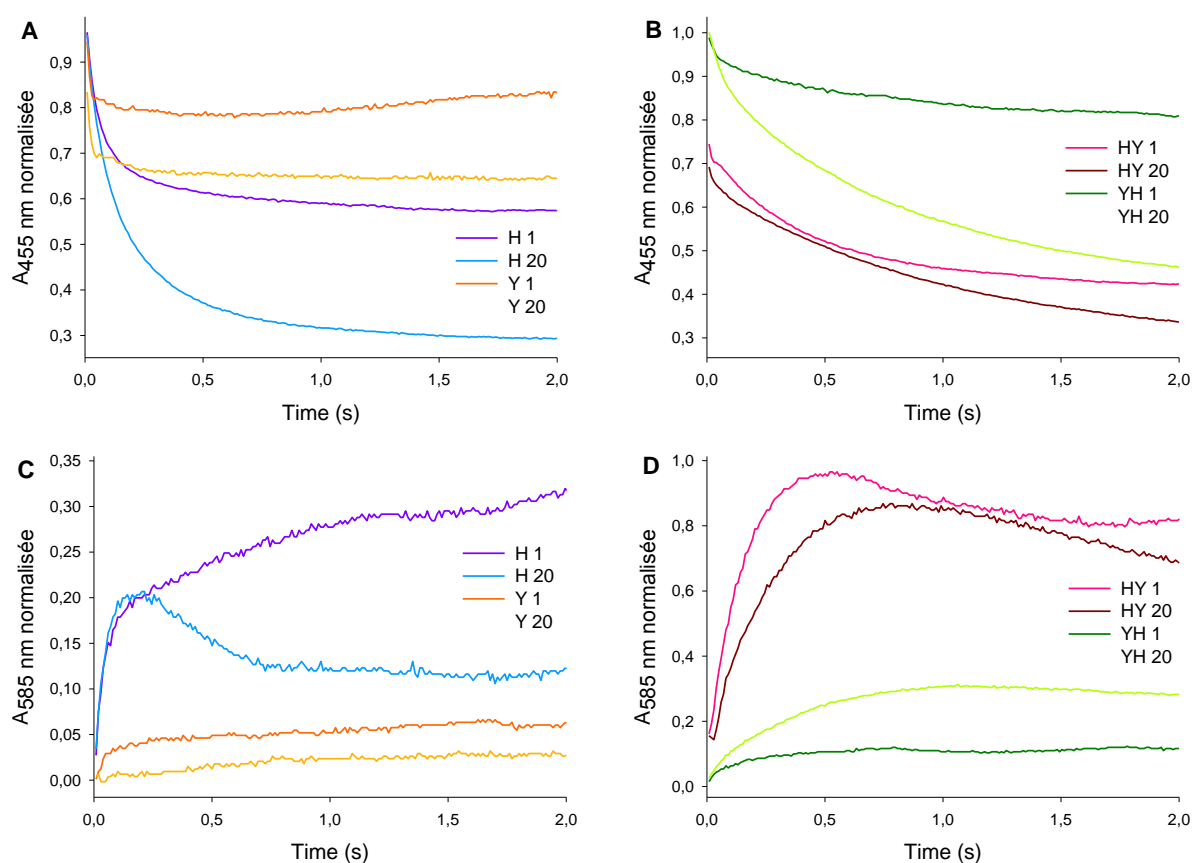


Figure 66 : Comparaison de l'évolution de l'absorption à 455 nm (A et B) et 585 nm (C et D) avec un ratio CPR :NADPH égale de 1 :1 ou 1 :20. Les courbes violettes et bleues correspondent à Hs, oranges et jaunes à Ys, vertes foncées et claires à Hs et finalement les roses et rouges à YHs, les deux couleurs correspondant respectivement aux ratios 1 :1 et 1 :20.

L'impact d'une augmentation de la concentration en NADPH sur la cinétique des transferts d'électrons lorsque le ligand est ajouté à la CPR soit en concentration stœchiométrique, soit en large excès, a globalement tendance à défavoriser le transfert interflavine (**Tableau 13**) malgré une

accélération de la réduction du FAD chez Ys (\nearrow 50 %) et Hys (\nearrow 95 %). Le rapport entre l'abondance de source électronique et le flux d'électrons au travers de la CPR est donc loin d'être trivial et dépend complètement de la nature de la protéine.

Les chimères ont des comportements intermédiaires entre les deux enzymes natives. En effet, Hys accumule assez peu de semiquinone mais tout de même 5 et 10 fois plus que YHs et Ys respectivement. Et lorsque la concentration en NADPH augmente, la quantité de semiquinone chez YHs augmente à nouveau, tout comme chez Ys, tandis que Hys est réduit vers une espèce de plus bas niveau rédox comme Hs.

3.3.3. La réduction du FAD

La comparaison des comportements des CPR chimères et parentales révèle que la réduction du FAD est globalement peu perturbée, voir même stimulée, par la substitution des domaines FMN (**Tableau 13**). La cinétique du transfert NADPH \rightarrow FAD est plus rapide chez les chimères que chez les CPR parentales ayant le même domaine FAD. Cette augmentation de la rapidité de transfert au sein du domaine FAD chez les chimères correspond assez bien aux valeurs des constantes cinétiques vis-à-vis du ferricyanure et du NADPH (voir § 3.1.1) qui démontraient déjà que les transferts concernant ce domaine n'étaient pas affectés par la substitution de l'autre domaine catalytique chez les chimères, et que l'affinité pour la source électronique NADPH s'en trouvait même dans certains cas augmentée.

Par ailleurs Gutierrez & al. ont étudié les cinétiques des transferts du domaine FAD isolé et de la CPR humaine entière (Gutierrez et al., 2001). Dans le cas du domaine FAD isolé, les auteurs observent des phases rapides qu'ils attribuent à la formation d'une espèce assurant le transfert de charge (CT) préalable au transfert d'hydrure, se caractérisant par une bande d'absorption à 780 nm (Garnaud et al., 2004) et par une diminution de la fluorescence d'un tryptophane occupant le site de fixation du NADP(H) en absence de ligand (Deng et al., 1999; Murataliev and Feyereisen, 2000a). Ces phases rapides ne sont pas observées lors de l'analyse de la CPR entière, peut être justement à cause de leur trop grande rapidité (temps mort du stopped-flow). Le transfert d'hydrure de la CPR humaine a lieu avec une constante proche de 20 s^{-1} analogue aux autres données publiées (Murataliev and Feyereisen, 1999; Opryan and Coon, 1982) et à nos mesures. Par ailleurs, les valeurs obtenues pour Ys (119 s^{-1} et 137 s^{-1} pour un ratio CPR :NADPH de 1 :1 et 1 :20 respectivement) sont dans notre cas bien supérieures à celles mesurées par Louerat-Oriou & al (autour de 40 s^{-1}) (Louerat-Oriou et al., 1998). Ces différences peuvent être dues non seulement aux ratios NADPH :CPR utilisés, mais également au mode de traitement analytique des données expérimentales.

Tableau 13 : Constantes cinétiques apparentes de pseudo-premier ordre reflétant la réduction du FAD (455 nm) et de la formation de semiquinones (585 nm) données en s^{-1} . L'évolution des absorptions à 455 et 585 nm correspond à des multi-exponentielles dans la gamme de temps de 0 à 0,25 s. Les valeurs sont indiquées avec \pm SD.

	Hs		Ys		Hys		YHs	
CPR vs. NADPH	1 :1	1 :20	1 :1	1 :20	1 :1	1 :20	1 :1	1 :20
455 nm	24 \pm 1	26 \pm 1	119 \pm 2	137 \pm 3	190 \pm 5	366 \pm 2	52,9 \pm 0,7	13 \pm 2
585 nm	20,6 \pm 0,6	24,4 \pm 0,5	35,2 \pm 0,2	13,4 \pm 0,2	10,4 \pm 0,2	4,0 \pm 0,4	14,5 \pm 0,5	9,1 \pm 0,2

Globalement, la réduction du cofacteur FAD par le NADPH n'est en rien ralentie chez les CPR chimères mais semble même plus rapide que chez les CPR parentales. Cette accélération pourrait refléter la formation d'une espèce de transfert de charge indétectable chez les CPR natives (Gutierrez et al., 2001) ou encore la prédominance d'une conformation chez les protéines chimériques favorisant ce transfert en particulier. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors des expériences de cinétique à l'équilibre et confirment le fonctionnement presque optimal du domaine FAD au sein des enzymes chimériques.

3.3.4. Le transfert interflavines

A l'inverse du premier transfert d'hydrure, le transfert interflavine est fortement ralenti chez les CPR chimériques (**Tableau 13**). En effet, ce transfert est globalement deux fois plus lent chez HYs et YHs que chez Ys et Hs. Ce phénomène reflète une diminution de la reconnaissance entre les domaines catalytiques qui proviennent de CPR différentes et dont les interactions sont par définition fortement perturbées au sein des chimères.

Les valeurs mesurées pour les CPR parentales sont de même ordre de grandeur que celles déjà publiées (de 10s^{-1} à 55s^{-1} pour Hs selon les sources et les conditions expérimentales) (Gutierrez et al., 2001; Louerat-Oriou et al., 1998; Murataliev et al., 1999; Oprian and Coon, 1982). Par ailleurs, les valeurs des vitesses de transfert interne les plus faibles sont obtenues lorsque le ratio CPR vs. NADPH est le moins élevé. Les semiquinones ne correspondent qu'à une espèce transitoire entre la forme oxydée de CPR et leur réduction quasi-totale par l'excès de NADPH qui conduit à la disparition du pic autour de 600 nm. La vitesse apparente résulte donc de la conjonction de deux phénomènes opposés, l'apparition et la disparition de ces semiquinones. Par ailleurs, le potentiel du NADPH (-320 mV) étant proche voir supérieur à celui du $\text{FAD}_{\text{sq/red}}$ des CPR (**Tableau 14**), la réduction totale de toutes les molécules de CPR n'est pas atteignable avec cet agent réducteur, même dans des conditions d'anaérobiose très strictes.

En conclusion, si le transfert d'hydrure entre le NADPH et le FAD n'est pas du tout ralenti chez les chimères, la vitesse du transfert interflavine est par contre réduite de moitié, traduisant une diminution de la reconnaissance entre domaines chez les CPR chimériques.

3.4. Potentiométrie par spectroélectrochimie

3.4.1. Mesure des potentiels d'oxydoréduction des flavines

Les mesures de potentiométrie couplées à la spectrométrie d'absorption nous ont permis de suivre l'évolution des spectres d'absorption et du potentiel rédox d'une solution de CPR lors de sa titrage par le dithionite de sodium. Les CPR préalablement oxydées étaient réduites jusqu'à une absorption quasi nulle et un spectre stable malgré l'ajout d'agent réducteur en condition anaérobiose. Les protéines pouvaient être ensuite progressivement réoxydées grâce à l'ajout de ferricyanure. Mais un précipité est apparu à plusieurs reprises dans la cuvette après quelques minutes aux potentiels les plus bas. Un phénomène analogue a déjà été publié dans la littérature pour les domaines FAD isolés de la MSR (Wolthers et al., 2003) et de la NOS (Finn et al., 2003), empêchant la réversibilité de l'expérience (phénomène d'hystérésis). Quoiqu'il en soit, la CPR n'atteignant jamais la réduction totale (4 électrons) lors de son cycle catalytique *in vivo*, sa dénaturation *in vitro* dans des conditions

de potentiels extrêmes est sans réelle conséquence. Dans ce cas, les potentiels rédox standards des couples de flavines au sein des CPR ont été déterminés pendant la phase de réduction de l'enzyme.

L'analyse des données de spectrométrie à certaines longueurs d'ondes critiques ($\lambda = 585, 500, 455$ et 430 nm) permet ensuite de déterminer les valeurs des potentiels rédox standards de chaque couple, oxydée/semiquinone (sq/ox) et semiquinone/hydroquinone (sq/hq), pour les deux flavines FMN et FAD. L'absorption à 455 nm est caractéristique des flavines oxydées tandis que celle à 585 nm correspond aux semiquinones. Mais l'équation de Nernst (2) régissant l'évolution du potentiel rédox d'une solution contenant 4 couples rédox contient 10 inconnues :

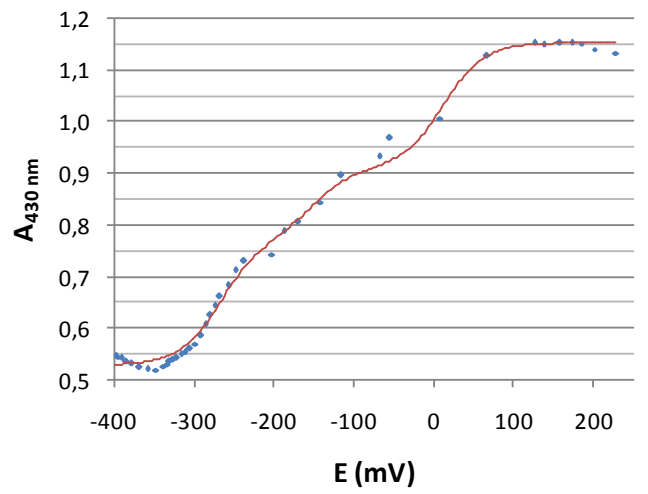
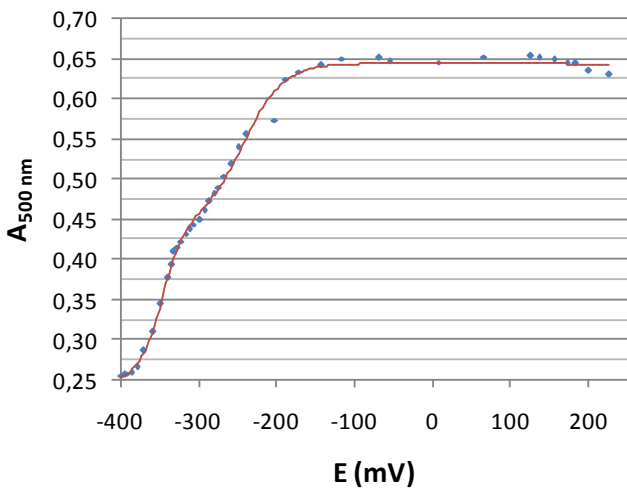
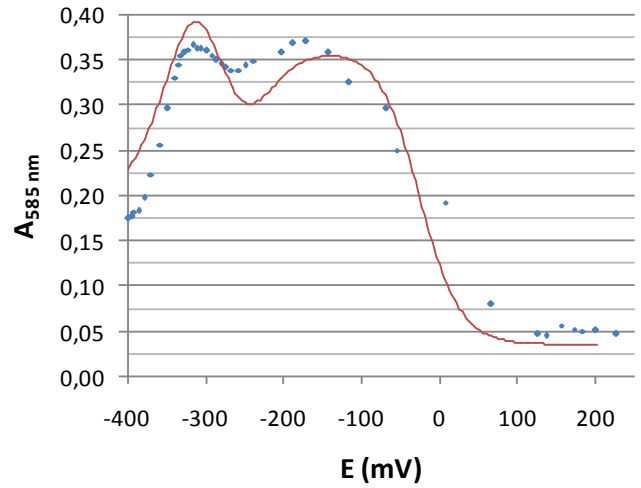
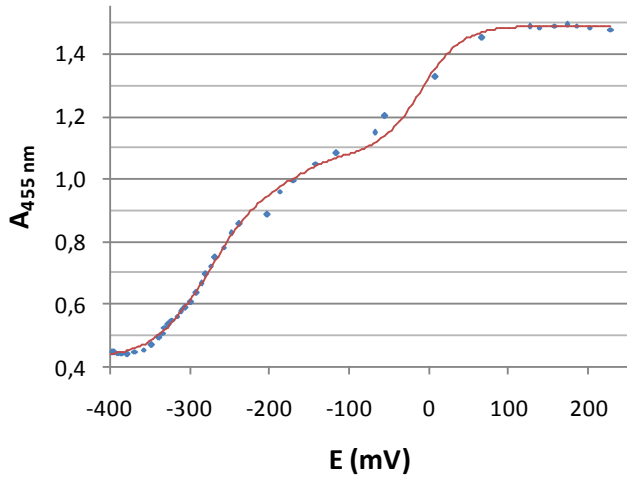
$$A = \frac{a \times 10^{(E-E^{\circ}_1)/59} + b + c \times 10^{(E^{\circ}_2-E)/59}}{1 + 10^{(E-E^{\circ}_1)/59} + 10^{(E^{\circ}_2-E)/59}} + \frac{d \times 10^{(E-E^{\circ}_3)/59} + e + f \times 10^{(E^{\circ}_4-E)/59}}{1 + 10^{(E-E^{\circ}_3)/59} + 10^{(E^{\circ}_4-E)/59}} \quad (2)$$

avec :

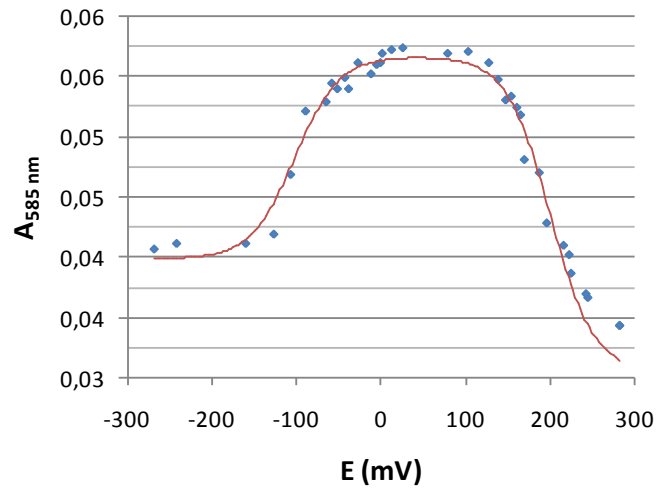
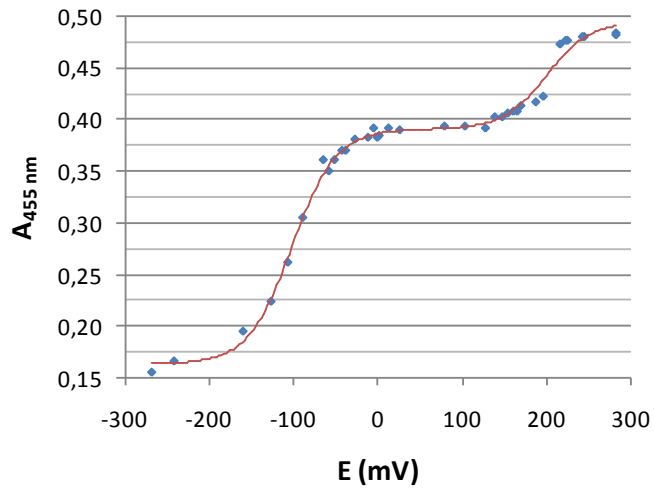
- $E^{\circ}_1, E^{\circ}_2, E^{\circ}_3$ et E°_4 correspondant respectivement aux potentiels standards des couples ox/sq et sq/hq du FMN et du FAD ;
- $a-c$ les valeurs des coefficients d'extinction du FMN respectivement à l'état oxydé, semiquinone et réduit ;
- $d-e$ ces mêmes valeurs pour le FAD.

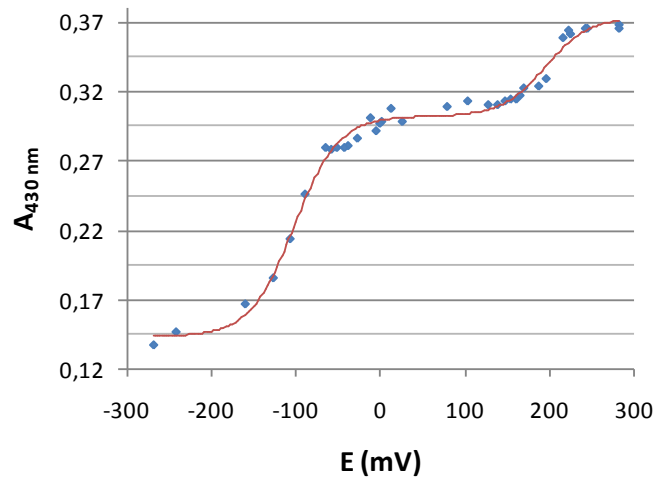
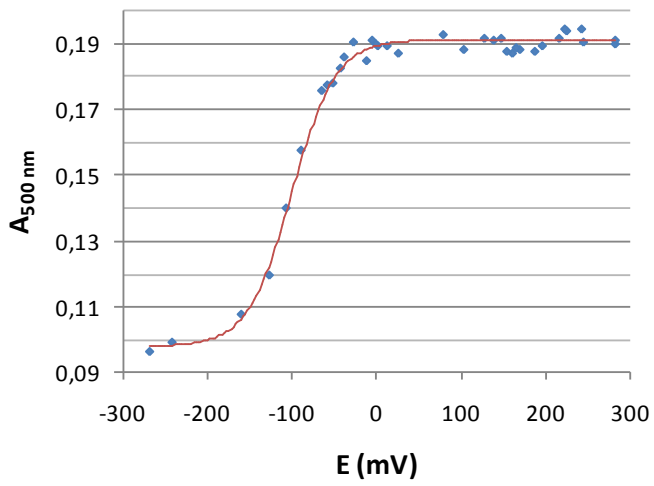
On utilise alors les points isobestiques entre les spectres oxydés et semiquinones à 500 nm et entre les semiquinones et les flavines réduites à 430 nm afin de réduire les nombres de variables et d'obtenir, par des ajustements théoriques, une valeur approchée des potentiels standards (Das and Sligar, 2009; Gutierrez et al., 2003). En effet, à 500 nm, $a = b$ et $d = e$ car les coefficients d'extinction des flavines oxydées et semiquinones sont identiques à ce point isobestique. Ceci permet de déterminer les potentiels E°_2 et E°_4 correspondant aux couples sq/hq des deux flavines. De la même façon, à 430 nm, $b = c$ et $e = f$ car les coefficients d'extinction des flavines semiquinones et réduites sont alors identiques et les potentiels E°_1 et E°_3 correspondant aux couples ox/sq des deux flavines peuvent être calculés. Ces valeurs sont alors réinjectées dans l'équation (2) complète et sont ajustées et affinées sur les mesures à 455 nm et 585 nm. Quoiqu'il en soit, les premières estimations sur l'évolution des isobestes restent très proches des valeurs finales comme le décrivaient Das & al. dans leur article (Das and Sligar, 2009).

Hs

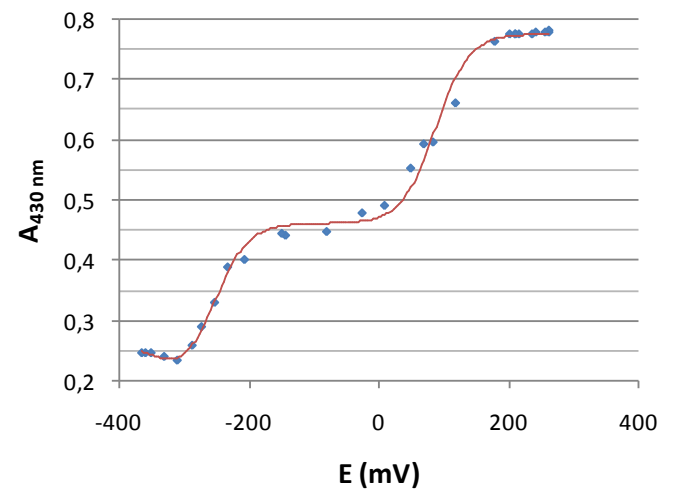
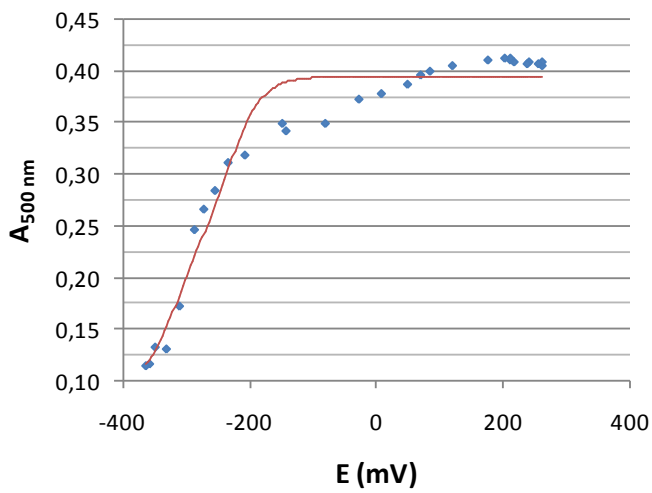
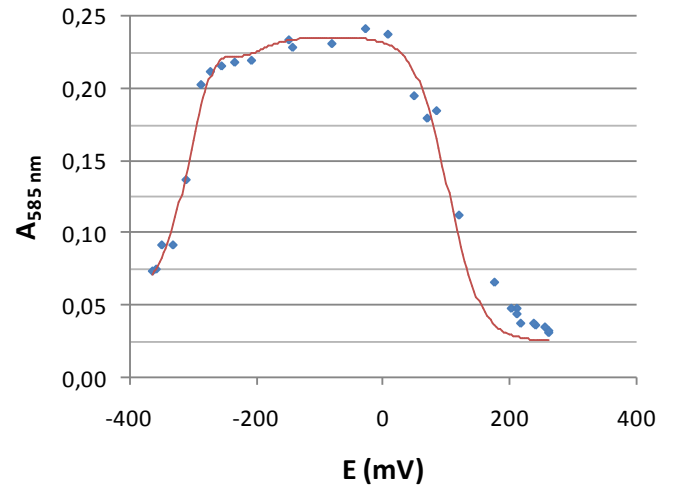
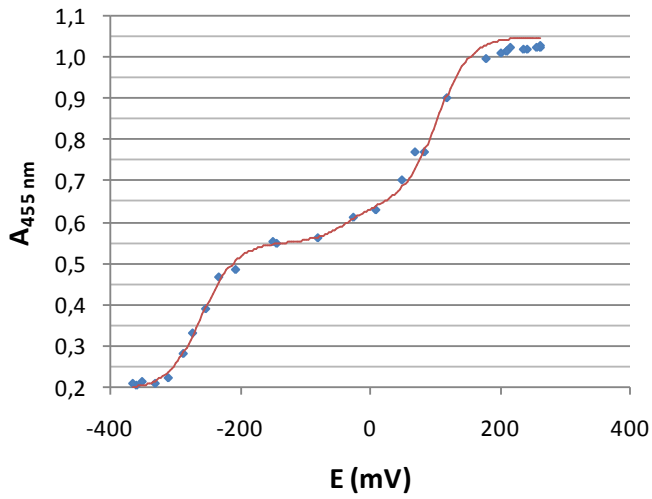


Ys





HYS



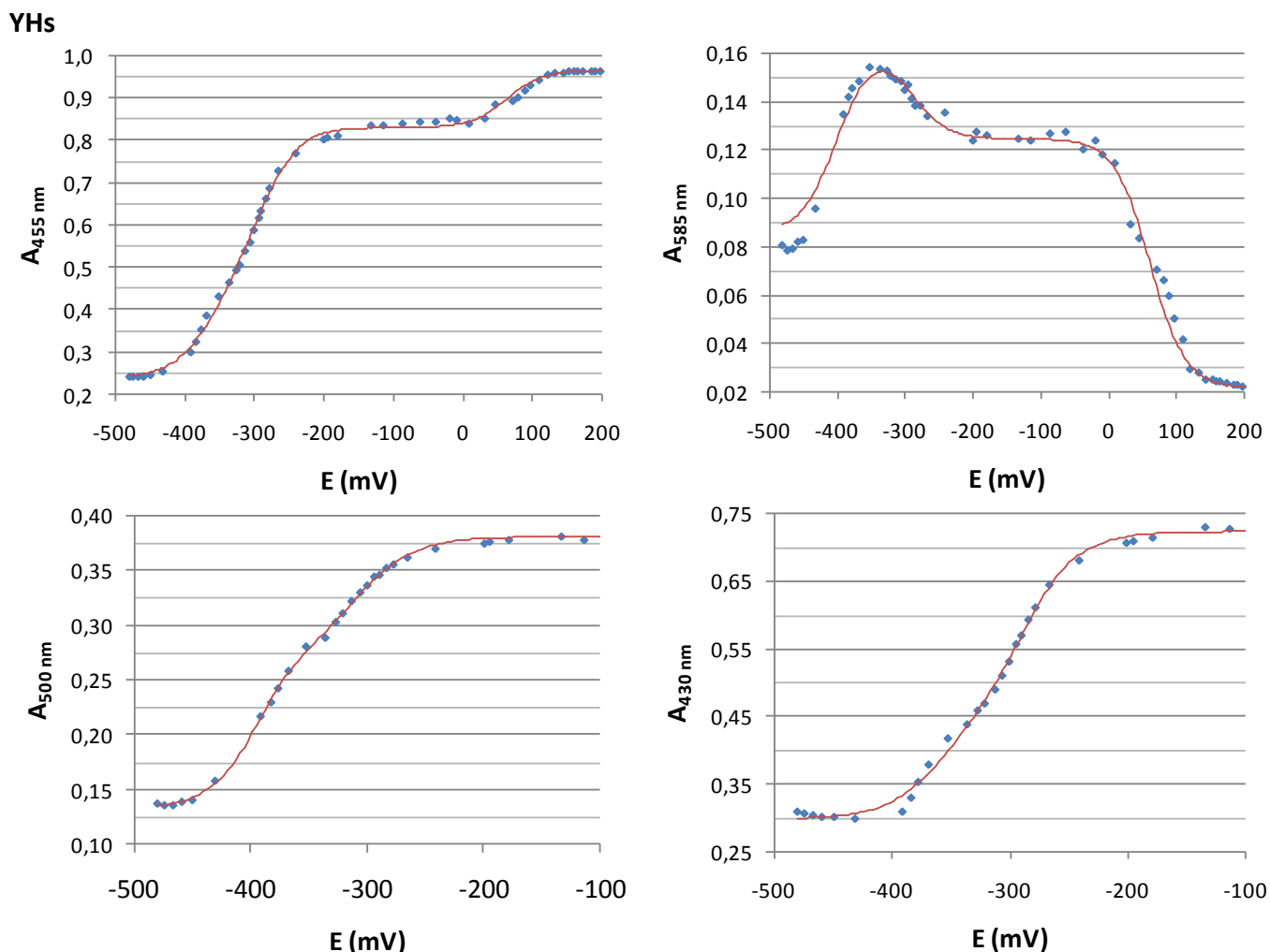


Figure 67 : Evolution de l'absorption des CPR aux différentes longueurs d'ondes critiques en fonction du potentiel rédox. Les CPR parentales (Hs et Ys) et chimères (HYs et YHs) ont été titrées dans les mêmes conditions par ajouts successifs de dithionite de sodium au sein d'une cuve en anaérobie sous flux d'argon purifié. Les longueurs d'ondes d'intérêt sont 455 nm (flavines oxydées), 585 nm (semiquinones), 500 nm (isobeste entre les flavines oxydées et semiquinones), et 430 nm (isobeste entre les semiquinones et les flavines réduites). Les courbes rouges correspondent aux ajustements théoriques des données expérimentales grâce au logiciel Electrofilter permettant d'accéder aux potentiels de 2 couples rédox de chaque flavine pour chacune des CPR (Tableau 14).

Les ajustements théoriques des données expérimentales (**Figure 67**) sont très proches des mesures à l'exception de la courbe représentant l'évolution de l'absorption de Hs à 585 nm et de HYs à 500 nm. Dans le premier cas, si les amplitudes de l'ajustement sont malheureusement un peu éloignées de l'expérience, le sens de leur variation (augmentation, diminution) en fonction du potentiel correspond bien aux valeurs expérimentales. L'évaluation de la valeur des potentiels qui en découle est donc correcte. Dans le cas de HYs, la qualité de l'ajustement à 500 nm n'est pas de très bonne, mais les données ont ensuite été réajustées comme expliqué précédemment sur les courbes à 455 nm et 585 nm.

3.4.2. Comparaison CPR chimères versus CPR parentales

L'analyse des courbes absorption/potentiel avec le logiciel Electrofilter a permis d'extraire les valeurs des potentiels rédox standards de chacun des couples flaviniques des CPR (**Tableau 14**). Les potentiels mesurés pour les deux CPR parentales, Hs et Ys, sont très proches des valeurs déjà publiées dans la littérature, ce qui nous permet de valider notre mode opératoire tant au niveau du montage utilisé que des conditions expérimentales (anaérobie, électrodes...). En effet, des travaux

antérieurs rapportent les valeurs de potentiels pour Hs suivantes : $E^{\circ}_1 = -66$ & -89 mV, $E^{\circ}_2 = -286$ & -246 mV, $E^{\circ}_3 = -283$ & -328 mV et $E^{\circ}_4 = -382$ & -381 mV à pH 7,0 & 7,5 respectivement (Brenner et al., 2008; Munro et al., 2001). L'augmentation du pH influe donc de façon significative sur certaines de ces valeurs en accentuant l'écart entre les couples ox/sq et sq/hq du FAD et en diminuant ce même écart pour le FMN. Nos expériences ont été effectuées dans un tampon à pH 7,4 et nos résultats se trouvent justement entre des valeurs publiées à pH 7,0 et 7,5. Concernant Ys, les potentiels standards publiés sont également analogues à ceux déjà obtenus (Louerat-Oriou et al., 1998).

Tableau 14 : Potentiels standard d'oxydoréduction des couples flavines oxydée/semiquinone (ox/sq) et semiquinone/hydroquinone (sq/hq) des cofacteurs FAD et FMN de chacune des CPR parentales (Hs et Ys) et chimères (HYs et YHs). Les potentiels standards sont indiqués en mV/SHE et l'erreur type sur ces valeurs est de quelques mV (5 à 10 mV).

CPR	E°_1 FMN _{ox/sq}	E°_2 FMN _{ox/hq}	E°_3 FAD _{ox/sq}	E°_4 FAD _{sq/hq}	E°_5 FMN _{ox/hq}	E°_6 FAD _{ox/hq}
Hs	-65	-279	-320	-377	-172	-349
Ys	-183	-261	-270	-389	-222	-330
HYs	37	-297	-312	-363	-130	-338
YHs	-3	-370	-362	-464	-189	-412
Flavines libres					-253	-227

Plusieurs études concernant différentes diflavines réductases (Garnaud et al., 2004; Munro et al., 2001; Wolthers et al., 2003) ont montré que la dissection de ces protéines en deux domaines catalytiques distincts (domaine FMN et domaine connexion/FAD) ne modifiait pas, ou très peu, les valeurs de leurs potentiels standards, en particulier pour les E°_3 et E°_4 du cofacteur FAD. Dans le cas de Hs, de la nNOS ou de la MSR, les potentiels du FMN ne sont modifiés de seulement quelques dizaines de mV lors de la séparation des domaines, et ce d'une façon assez imprévisible. En effet, chez Hs, E°_1 augmente et E°_2 diminue (Munro et al., 2001), tandis que chez la nNOS ou la MSR, les deux potentiels sont encore plus négatifs pour le domaine FMN isolé que dans la protéine entière (Garnaud et al., 2004; Wolthers et al., 2003). Quoi qu'il en soit, ces perturbations restant minimes, on aurait pu *a priori* penser que si la séparation des domaines n'a que peu d'influence sur les potentiels des cofacteurs, leur substitution n'aurait alors pas plus d'impact. Pourtant les potentiels des CPR chimères sont réellement différents de ceux des CPR parentales (**Figure 68**). La substitution du domaine FMN modifie donc drastiquement les valeurs de ces potentiels.

Chez les chimères HYs et YHs, l'écart entre les deux potentiels du FAD, $\Delta(E^{\circ}_4 - E^{\circ}_3)$, reste assez proche de ceux des CPR parentales. En effet, le domaine FAD de HYs présente des potentiels du même ordre de grandeur que ceux des CPR parentales et pratiquement identique à ceux de Hs. Le comportement du domaine FAD chez HYs est donc semblable à celui des diflavines réductases natives où ce domaine n'est de toutes façons pratiquement pas influencé par la présence ou l'absence de l'autre domaine catalytique (Garnaud et al., 2004; Munro et al., 2001; Wolthers et al., 2003).

Chez l'autre chimère YHs, les potentiels du cofacteur FAD sont par contre tous deux inférieurs de 40 à 50 mV à ceux des CPR parentales, et plus particulièrement de Hs dont YHs partage pourtant le domaine FAD. Cette diminution des valeurs de E°_3 et E°_4 rend la réduction du FAD par le NADPH ($E^{\circ}_{\text{NADPH/NADP}^+} = -320$ mV) thermodynamiquement moins favorable. Par ailleurs, plusieurs travaux ont révélé l'influence de la fixation du ligand NADP^+ ou de modifications environnementales minimes sur les potentiels rédox du FAD d'autres diflavines réductases ou ferrédoxine réductases (Garnaud et al., 2004; Gutierrez et al., 2003; Murataliev and Feyereisen, 2000a; Murataliev and Feyereisen, 2000b).

Ces travaux décrivent des comportements très divers en fonction de la nature de la protéine étudiée, mais démontrent toujours que de simples mutations, même éloignées du site de fixation du FAD, des réorganisations conformationnelles minimales ou encore la présence du ligand NAD(P)H peuvent changer de façon drastique la valeur des potentiels rédox. Or ce phénomène a probablement lieu au cours du cycle catalytique de la CPR.

Chez la réductase du P450-BM3 par exemple, le transfert d'hydrure est accompagné d'une augmentation par 10 de l'affinité pour le NADP⁺ correspondant à un décalage ≥ 30 mV du potentiel rédox du ligand nicotinamide et/ou du FAD (Murataliev and Feyereisen, 2000a). Des travaux concernant directement Hs démontrent par contre que la fixation de 2',5'-ADP n'induit aucune modification des potentiels rédox du FAD mais uniquement une réorganisation conformationnelle affectant l'étape cinétiquement déterminante du transfert d'électrons (Gutierrez et al., 2003). Mais d'autres études concernant le domaine FAD isolé de la nNOS ont démontré que si la présence de 2',5'-ADP n'avait aucun impact sur les potentiels rédox du FAD, l'ajout de NADP⁺ augmentait significativement (+30 mV) le E°₃ du cofacteur et déstabilisait ainsi la forme semiquinone (Garnaud et al., 2004). Globalement, la fixation du ligand NADP(H) et les interactions de type π -stacking entre son cycle nicotinamide et le FAD semblent contrôler le transfert électronique en fonction de certains changements conformationnels au sein de la protéine permettant l'augmentation du potentiel de la flavine. Or, dans nos travaux, si les domaines catalytiques restent intacts, les remaniements apportés à l'échelle de la protéine chimériques sont très importants et modifient très certainement l'équilibre conformationnel des protéines et donc leurs potentiels.

Le comportement du cofacteur FMN chez nos CPR chimériques est assez troublant car l'écart entre les potentiels E°₁ et E°₂ est non seulement très important (> 300 mV) mais la valeur de E°₁ approche (YHs) voir même dépasse (HYs) 0 mV. Cette accentuation de l'écart entre les deux potentiels correspond à une stabilisation de la semiquinone du FMN, ce qui est cohérent avec les résultats de titrage par le dithionite de sodium montrant la formation et la stabilisation de cette semiquinone bleue (voir § 3.2), ainsi que la couleur verte des chimères lors de leur purification. Cette dernière caractéristique rend les chimères plus proches de Hs que de Ys qui présente par contre une inversion de ces deux potentiels du FMN et n'est pas stable sous la forme semiquinone bleue. Les valeurs très basses de E°₂ rendent la réduction totale des CPR chimères très difficile, particulièrement pour YHs. Ce résultat est également cohérent avec ceux obtenus lors de la titrage des chimères par le dithionite de sodium où la réduction complète de YHs n'avait pas pu être atteinte (voir § 3.2) malgré les conditions d'anaérobiose et le pouvoir de l'agent réducteur utilisé.

L'écart très important encore les valeurs de E°₁ et E°₂ chez les chimères peut être rapproché des résultats obtenus lors d'expériences effectuées sur d'autres flavodoxines révélant que la mutation d'une seule glycine au niveau du site de fixation du FMN pouvait augmenter le $\Delta(E°_1-E°_2)$ en diminuant le E°₂ de plus de 180 mV par rapport au potentiel du FMN libre en solution (Smith et al., 1994). D'autres flavoprotéines natives présentent des valeurs de E°₁ positives comme nos chimères. Ainsi la triméthylamine déshydrogénase, qui contient un cofacteur FMN lié de manière covalente (E°₁ et E°₂ sont respectivement à 44 mV et 36 mV chez la bactérie *Methylophilus methylotrophus*) et un centre Fe₂-S₄ (E° = 102 mV) (Barber et al., 1988), peut transférer de façon thermodynamiquement favorable des électrons à la « electron-transferring flavoprotein » qui comporte un cofacteur FAD dont le potentiel ox/sq atteint les +196 mV chez la bactérie et +22 mV chez l'humain (Jang et al., 2000; Talfournier et al., 2001).

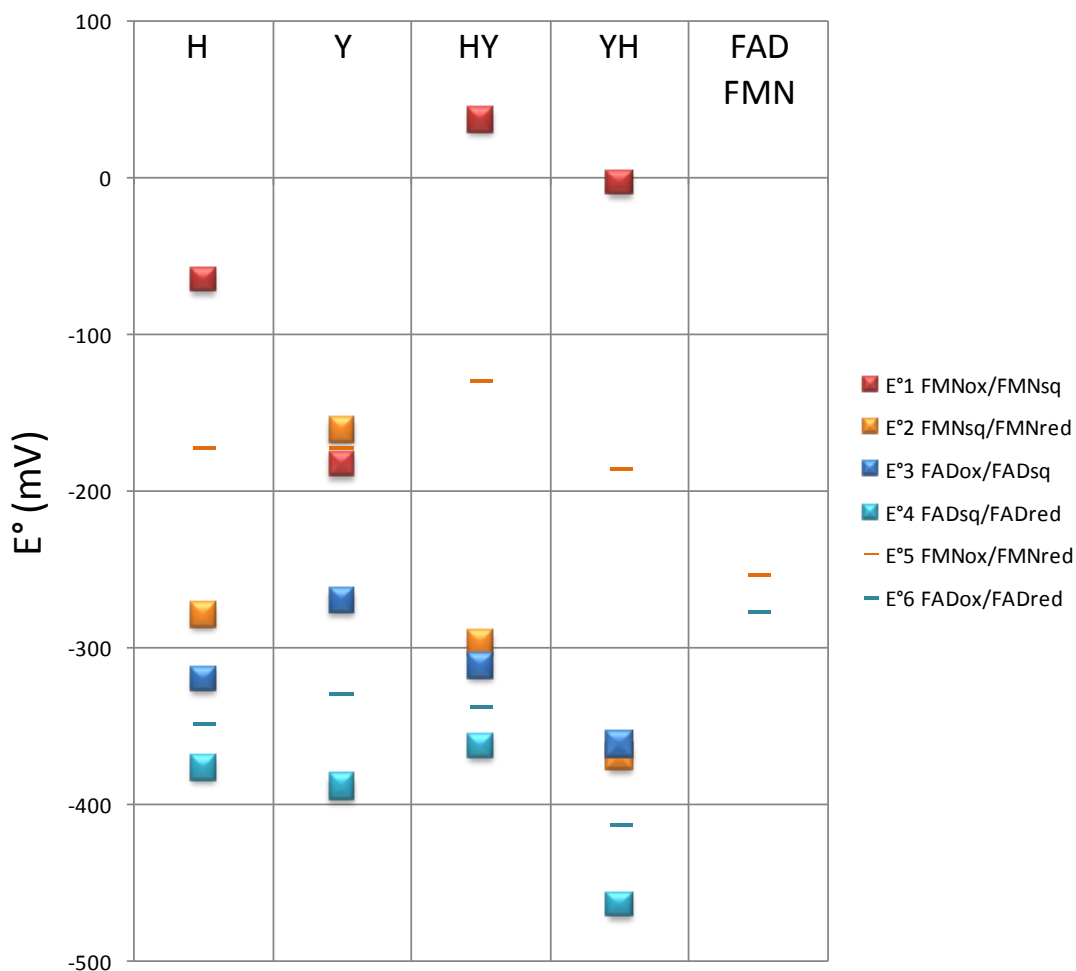


Figure 68: Valeurs des potentiels d'oxydoréduction des CPR parentales, chimères et des flavines libres. La mesure des potentiels des flavines libres FMN et FAD ne permet pas d'accéder aux E°_1 - E°_4 ; les formes semiquinones ne sont pas stables en solution.

Enfin, la grande stabilisation des semiquinones au niveau du cofacteur FMN et l'écart entre les valeurs de E°_1 et E°_2 laisse supposer un fonctionnement des chimères analogue à celui de Hs dont le cycle électronique est 1-3-2-1 (les chiffres correspondent au nombre d'électrons présents sur la CPR pendant son cycle catalytique). Par ailleurs, le transfert interne entre le FAD et le FMN est thermodynamiquement très favorable au vu des potentiels rédox des chimères. La faiblesse de ce transfert n'est donc que de nature cinétique et s'explique plus probablement par des difficultés de reconnaissance et de conformation entre les domaines catalytiques.

3.5. Dénaturations des CPR

3.5.1. Dénaturation chimique

Les tests de dénaturation chimique ont été réalisés en utilisant soit la guanidine soit l'urée comme agent dénaturant et en suivant la libération des flavines en solution via leur fluorescence. Le comportement des CPR est très différent vis-à-vis des deux composés dénaturants. L'ensemble des CPR est stable pour des concentrations de guanidine inférieure à 1M et se dénature entre 1 et 2 M (**Figure 69 A**). La libération des flavines dans l'urée se fait de façon beaucoup plus progressive et presque linéaire pour Ys, HYs et YHs (**Figure 69 B**). Ces dernières courbes sont difficilement

interprétables, mais il apparaît tout de même clairement que Hs est plus stable que les autres CPR et semble se dénaturer en deux étapes contrairement aux autres CPR.

Le comportement des CPR vis-à-vis de la guanidine est plus classique et les courbes ont pu être ajustées par des sigmoïdes afin de déterminer la concentration de demi-dénaturation (analogue à la température de fusion). A première vue, les différents domaines des CPR se dénaturent à des concentrations en agent dénaturant identiques. En effet, les données sont ajustées par des sigmoïdes simples et aucun palier au cours de la dénaturation des CPR correspondant à la libération séquentielle de chacun des cofacteurs ne se démarque clairement. Ce résultat signifie que la coopérativité interdomaine vis-à-vis de leur stabilité est importante.

Pourtant lorsque l'on zoome sur le début des courbes (encadré **Figure 69 A**), les courbes d'ajustement théorique sont assez éloignées des valeurs expérimentales et il apparaît une première augmentation de la fraction de CPR dénaturée à une concentration en guanidine inférieure à 0,5 M. Par ailleurs, la fluorescence du FAD est 10 fois plus faible que celle du FMN. La libération du FAD en solution n'augmentera donc que faiblement la fluorescence des échantillons et de même pour la fraction de protéine dénaturée apparente. Quoiqu'il en soit, ces premiers épaulements dans les courbes de dénaturation à la guanidine pour des concentrations inférieures à 0,5 M n'atteignent pas 1 dixième de la fraction totale dénaturée et ne peuvent correspondre à la dénaturation complète du domaine FAD avant le domaine FMN. Cette dernière hypothèse est d'ailleurs assez peu probable car les domaines type ferrédoxine réductase sont très stables et ont une meilleure affinité pour leur cofacteur flavinique que les domaines FMN (Grunau et al., 2007).

Les valeurs des concentrations de demi-dénaturation sont de $1,19 \pm 0,02$ M pour Hs, de $1,64 \pm 0,02$ M pour Ys, de $1,43 \pm 0,03$ M pour HYs et de $1,22 \pm 0,02$ M pour YHs, et les pentes de ces courbes sont semblables. Contrairement à l'urée, Hs est la moins stable des CPR en guanidine-HCl; tandis que Ys est la plus stable. Les chimères ont un comportement intermédiaire entre les deux CPR parentales.

La dénaturation chimique via la guanidine ou l'urée donnent des résultats très différents non seulement en termes de types de courbes mais également de stabilité relative des 4 CPR. Ces divergences proviennent de la nature même des agents dénaturant utilisés qui n'ont pas le même effet déstabilisant sur les repliements protéiques. En effet, le sel de Gnd-HCl se solubilise sous forme ionique dans l'eau, tandis que l'urée est une molécule neutre. Ainsi, à basse concentration, les ions Gnd^+ et Cl^- masquent toute interaction électrostatique stabilisante ou déstabilisante intra- ou intermoléculaire, avant de devenir dénaturante à haute concentration quel que soit le type d'interactions présentes dans la protéine. L'estimation de la stabilité d'une protéine par sa dénaturation à la guanidine renseigne donc plus sur la contribution des interactions hydrophobes. L'urée permet par contre d'accéder à la stabilité nette d'une protéine (stabilisations hydrophobes + électrostatiques), tout comme la dénaturation thermique d'ailleurs (voir § 3.5.2) (Monera et al., 1994). Les différences importantes entre les courbes de dénaturation via la guanidine et l'urée démontrent donc l'importance des interactions électrostatiques au sein des CPR qui jouent un grand rôle dans la stabilisation de Hs et sont moins significatives chez Ys.

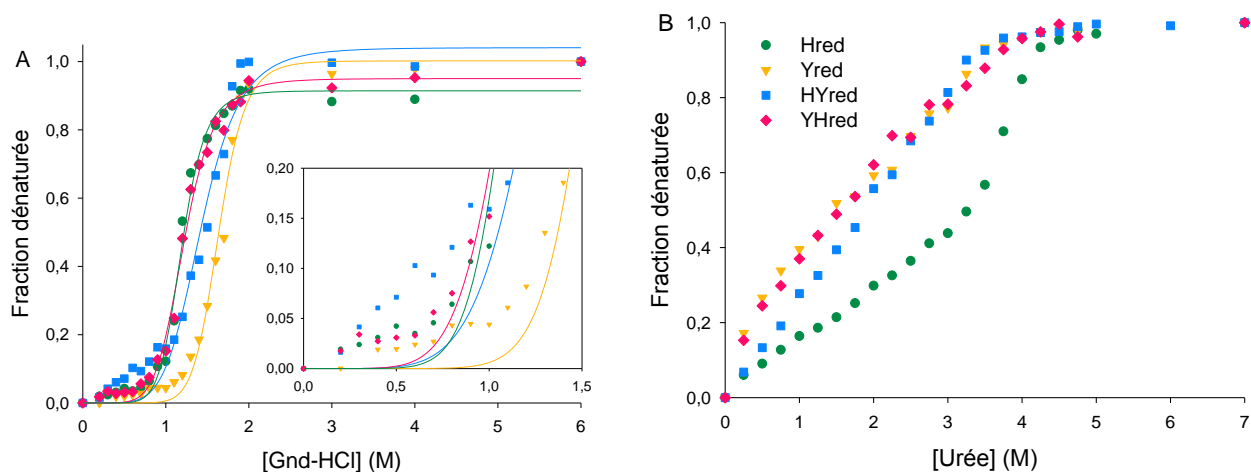


Figure 69 : Courbes de dénaturation chimique à la guanidine-HCl (A) et à l'urée (B) des CPR parentales et chimères. Ronds verts : Hs ; triangles jaunes : Ys ; carrés bleus : HYs et losanges roses : YHs. Les données expérimentales ont été normalisées et sont présentées en fraction de protéine dénaturée.

3.5.2. Dénaturation thermique

Les mesures de dénaturation thermique ont été réalisées entre 20°C et 60°C à l'exception de Hs qui n'est totalement dénaturé qu'à des températures supérieures à 70 °C. L'influence de la réduction par le NADPH ou de la présence de NADP⁺a également été analysée. Les courbes de fluorescence sont présentées dans la **Figure 70** et les valeurs des températures de fusion (T_m) des différentes CPR sont résumées dans le **Tableau 15**. Quelles que soient les expériences, la dénaturation des CPR a apparemment lieu en une seule phase (dénaturation des deux domaines flaviniques à la même température) et Hs reste toujours la CPR la plus stable (T_m maximum). Ys est également plus stable que les chimères à l'exception des mesures en présence de NADPH pour lesquelles YHs présente une T_m supérieure à Ys. Globalement YHs est assez proche de Ys tandis que les valeurs des T_m de HYs sont 2 à 4°C inférieures.

Les espèces réduites par le NADPH, en tous cas partiellement (3 électrons), sont plus stables que celles oxydées. La présence du ligand NADP⁺ augmente en partie la stabilité des CPR oxydées, mais pas autant que la réduction réelle par le coenzyme physiologique NADPH. Ainsi la fixation du nucléotide NADP⁺ stabilise déjà en partie les CPR, mais les transferts électroniques et les réarrangements conformationnels probables qui s'en suivent accentuent ce phénomène. La présence de nucléotides modifie bien plus les T_m de Hs et YHs que ceux Ys et HYs. Cette caractéristique est donc associée au domaine FAD humain.

Quelle que soit l'expérience, la dénaturation des CPR semble avoir lieu en une seule étape, sans distinction détectable entre les différents domaines. Mais les pentes des sigmoïdes correspondants à Hs et HYs sont plus faibles lors de l'addition de nucléotides, et particulièrement le NADPH, ce qui correspond à une diminution de la coopérativité de la dénaturation. Ys et YHs ont des comportements très différents puisque l'ajout de nucléotides augmente leur température de fusion mais accélère leur phase de dénaturation. De telle différence dans la coopérativité pourrait refléter une diminution des interactions entre domaines catalytiques probablement dues à des changements conformationnels à l'échelle des domaines entiers.

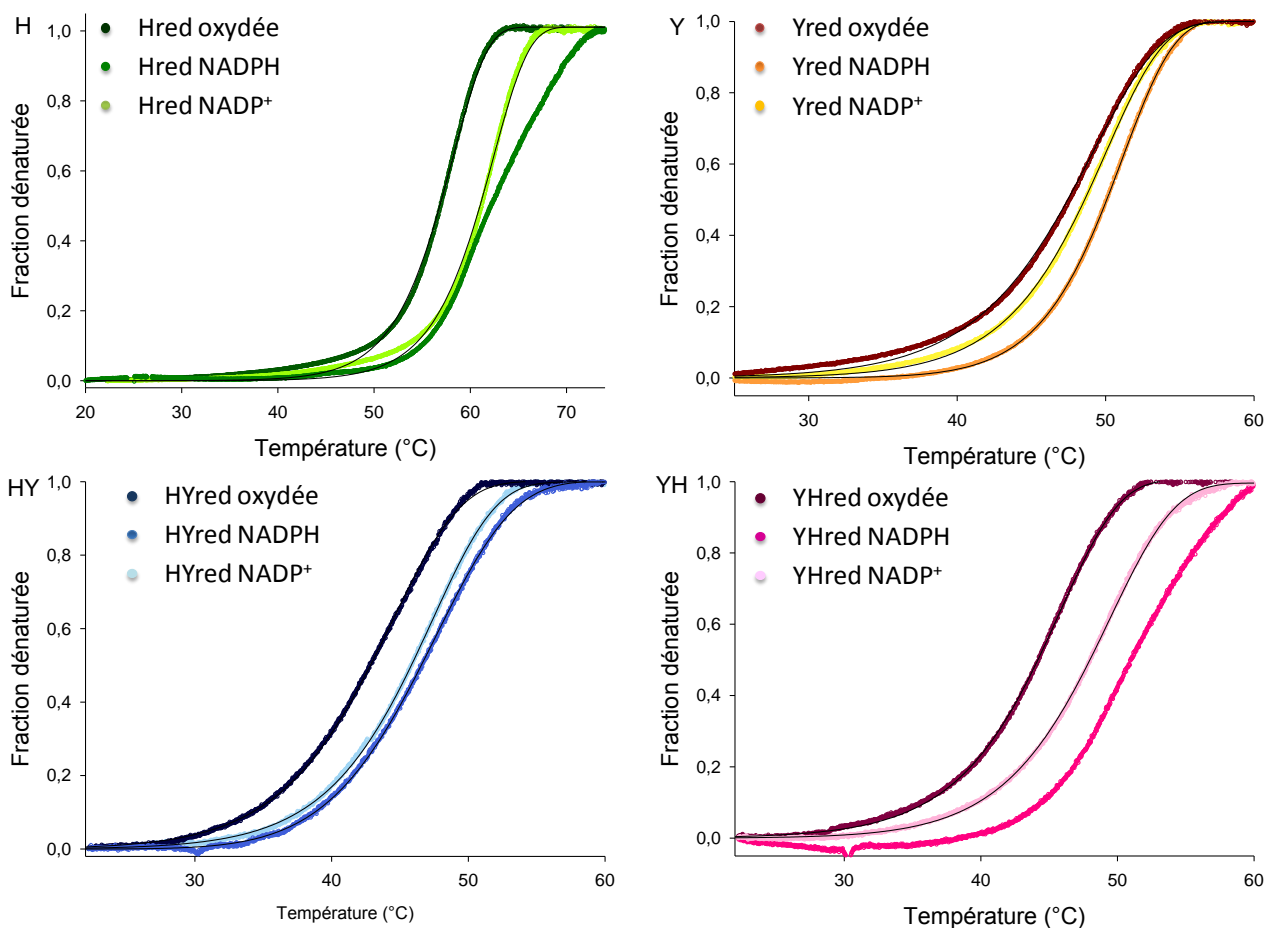


Figure 70 : Courbes de dénaturation thermique des CPR parentales et chimères à l'état oxydé, en présence de NADPH ou de NADP⁺. Les mesures de fluorimétrie permettant de quantifier la quantité de flavines libres (et donc la quantité de CPR dénaturées) ont été réalisées dans du tampon 20 mM phosphate pH 7,4 avec 10 μM de CPR et 300 μM de NADPH ou NADP⁺. Les données expérimentales ont été normalisées et sont présentées en fraction de protéine dénaturée.

En conclusion, les CPR ont des comportements assez différents vis-à-vis de la dénaturation chimique à la guanidine et de la dénaturation thermique bien que, dans les deux cas, la dénaturation des protéines multidomaines n'ait lieu qu'en une seule étape. Les stabilités relatives mesurées au travers de la température ou de l'urée sont bien cohérentes. Les analyses des données de dénaturation thermique démontrent que Hs est la plus stable des CPR tandis que les chimères sont non seulement moins stables mais présentent également les caractéristiques d'une coopérativité plus faible. Ces résultats soulignent à nouveau l'introduction de perturbation et la perte de reconnaissance et d'interactions entre les domaines catalytiques lors de la substitution du domaine FMN au sein des chimères.

Tableau 15 : Températures de fusion des CPR parentales et chimères à l'état oxydé, en présence de 300 μM de NADPH ou NADP⁺.

	T _m (°C)		
	CPR oxydée (°C)	CPR + NADPH	CPR + NADP ⁺
Hs	56,88 ± 0,02	61,06 ± 0,02	62,60 ± 0,02
Ys	47,46 ± 0,01	48,59 ± 0,01	50,10 ± 0,01
HYs	42,85 ± 0,01	42,83 ± 0,01	46,58 ± 0,01
YHs	44,21 ± 0,01	47,96 ± 0,01	51,15 ± 0,01

3.6. Purification distinctes des domaines FMN et FAD, et ligation protéique *in vitro* via des intéines

3.6.1. Clonage dans le vecteur pTWIN1 en fusion avec des intéines

Le clonage des parties FMN et connexion/FAD des CPR parentales dans le vecteur pTWIN1 a été réalisé après des travaux de mutagenèse dirigée visant non seulement à éliminer certains sites de restrictions correspondant à des enzymes utilisés lors du clonage, mais permettant surtout de supprimer les cystéines en surfaces (accessibles) des CPR parentales (3 pour Ys et 7 pour Hs) et d'introduire ou de conserver des cystéines aux positions voulues (**Figure 71**). Le but était de marquer les CPR afin de suivre par des expériences de FRET leur dynamique moléculaire. Les fluorophores choisis comportaient donc des groupements chimiques capables de réagir avec des thiols, afin de les fixer de manière covalente.

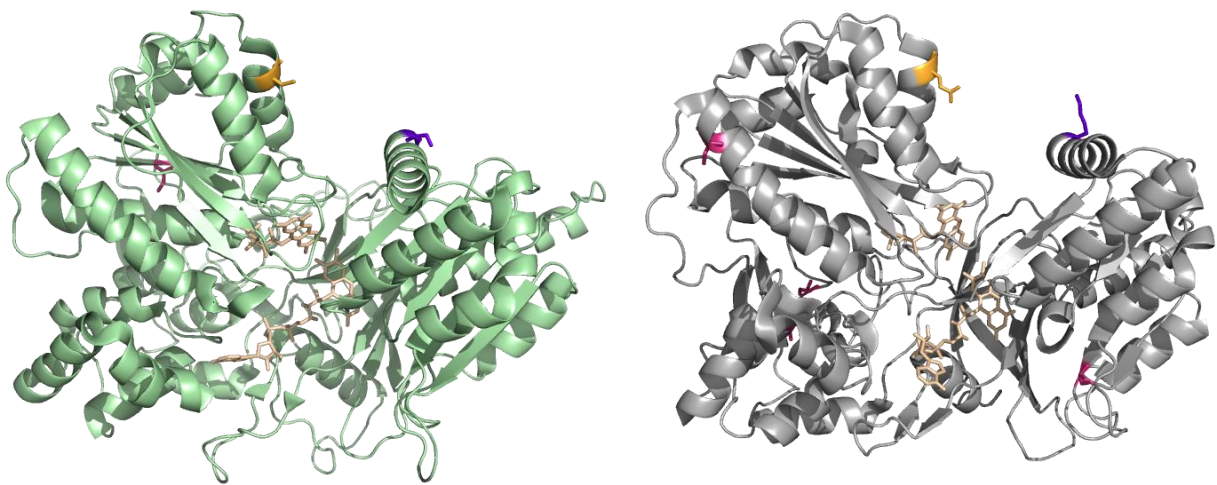


Figure 71 : Positions des mutations introduites dans Ys (gauche) et Hs (droite). Le structure de Rs est utilisée comme modèle de Hs. Les cystéines de surfaces ayant été mutées en sérines sont indiquées en rose, les futures positions des fluorophores sur les domaines FAD et FMN sont respectivement indiquées en violet et orange.

3.6.2. Expression et purification des domaines fusionnés aux intéines

L'expression des fusions CPR-intéines-CBD (chitine binding domain) permet la purification de l'ensemble sur une colonne de chitine. Le clivage est alors induit soit par changement de pH, soit par ajout de thiol suivant la nature d'intéine (*Ssp* ou *Mxe*) alors que l'ensemble est encore fixé à la résine. Après clivage, les parties de CPR peuvent être éluées et marquées à l'aide de fluorophores distincts mais compatibles pour le FRET. L'enzyme est alors reconstituée par ligation peptidique *in vitro* (IPL) grâce aux deux groupements chimiques issus du clivage en extrémité C-terminale du domaine FMN et N-terminale du domaine FAD. Ces deux groupements, respectivement un thioester et un thiol, réagissent afin de réunir les deux domaines en n'introduisant qu'une simple cystéine au niveau du point de jonction.

Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de l'expression puis de la purification des parties de CPR fusionnées aux intéines. Tout d'abord, les tests d'expression ont donné des résultats assez encourageant pour les fusions FMN-*Mxe* intéine lorsque l'induction été réalisée à 37°C pendant 2h. Mais le taux d'expression des fusions FAD-*Ssp* intéine étaient toujours très faible quelles que soient les conditions de culture. Par ailleurs, lorsque le temps d'induction était allongé, des bandes

apparaissent sur les gels SDS-PAGE correspondant aux poids moléculaires des intéines et des parties de CPR séparées. L'auto-clivage des intéines au sein de la cellule avant purification est un problème assez courant et il est donc apparu important de ne pas induire trop longtemps la surexpression de ces protéines.

Les tests de purification réalisés sur les constructions ne présentant pas de difficulté d'expression se sont avérés négatifs. En effet, si une protéine semblait bien se fixer à la colonne de chitine puis être éluée après clivage au vu des SDS-PAGES, celle-ci était totalement incolore tandis que le culot membranaire de lyse gardait une couleur correspondant à la présence de flavines malgré plusieurs heures de re-solubilisation et des essais avec différents détergents. Des analyses de spectrométrie de masse sont venues confirmer que les protéines fixées sur la colonne ne correspondaient absolument pas à de la CPR mais à des protéines chaperonnes. Malgré tous nos efforts, les fusions CPR-intéines n'ont jamais pu être solubilisées ou purifiées.

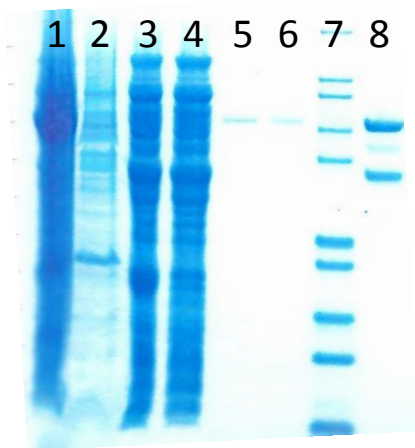


Figure 72 : Gel SDS PAGE, purification des fusions domaine FAD de Ys – Ssp Intéine. Le domaine FAD isolé fait 58 kDa, l'intéine Ssp est à 25 kDa, et la fusion des deux est donc attendue à 78 kDa. 1. Lysat cellulaire avant purification, il y a bien surexpression d'une protéine de poids moléculaire proche de 78 kDa. 2. Culot membranaire après re-solubilisation et centrifugation, la protéine de 78 kDa a bien été extraite. 3. Phase soluble, il y a 3 bandes principales à 25 kDa, 55 kDa, et 78 kDa. 4. Charge de la phase soluble sur la colonne de chitine, rien ne semble se fixer. 5. et 6. Lavages et changements de TP afin d'induire le clivage de l'intéine, une faible bande à 70 kDa se décroche de la colonne. 7. Standard. 8. Elution, on retrouve 2 bandes principales à 70 kDa et 55 kDa, et une bande plus faible à 60 kDa, mais les analyses par spectrométrie de masse démontreront par la suite que le bande proche de 53 kDa ne correspond pas au domaine FAD de Ys isolé.

Ce projet de marquage sélectif de chaque domaine catalytique de la CPR avec des fluorophores différents (accepteur et donneur) en vue de suivre la dynamique réelle de l'enzyme par des mesures de FRET n'a pas pu aboutir au cours de ma thèse...

4. Analyse structurale

4.1. Cristallogénèse CPR chimères solubles

La cristallographie est une méthode d'analyse structurale nécessitant assez peu de protéine mais d'une pureté très élevée. En effet, les robots de cristallogénèse tels que le robot nanodrop (CARTESIAN Proteomic solutions) permettent de tester 96 conditions différentes en parallèles en utilisant seulement 20 μL de protéine à la concentration de 5 ou 10 mg/mL (pour la CPR, cela équivaut à 70 ou 140 μM). Par contre, la pureté de l'enzyme doit dépasser les 98 % pour obtenir des cristaux de bonne qualité. Nous avons donc sélectionné et réservé pour la cristallogénèse les fractions les plus pures des CPR en sortie de gel-filtration (par exemple les fractions 4 et 5 du gel de la **Figure 49**).

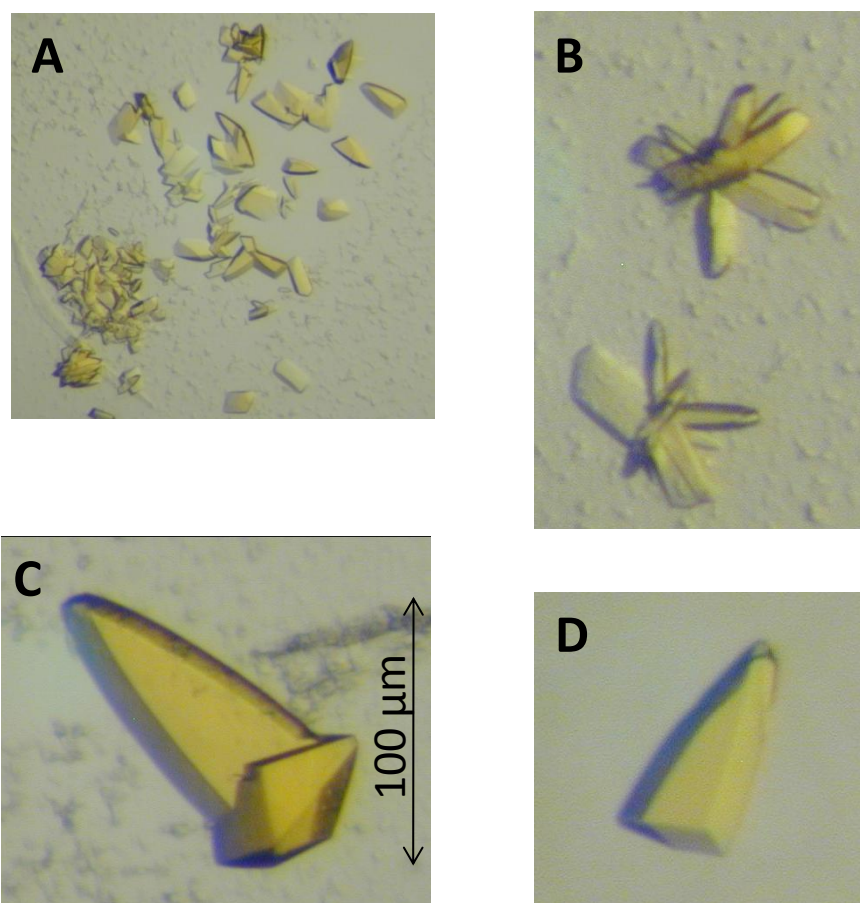


Figure 73 : Photos de cristaux de YHs. A : cristaux trop petits, B : cristaux maclés, C et D : beaux cristaux pouvant servir à la collecte de données. La couleur jaune des cristaux provient des flavines oxydées au sein de YHs et toutes les photos sont présentées à la même échelle.

Les kits sur boîtes ont permis d'identifier des conditions propices à la cristallisation de YHs. En effet, de petits cristaux sont apparus dans la boîte correspondant au kit Classic dans des conditions contenant principalement du sulfate d'ammonium 2 M pour les gouttes à 10 mg/mL de protéine sans ligand. D'autres cristaux sont apparus dans la boîte du kit PEG II (500 mM LiCl, 100 mM Tris pH 8,5 et 28 % PEG 6000) à la concentration de 10 mg/mL avec et sans ligand. Par contre, la chimère HYs n'a montré aucune piste sérieuse, l'ensemble des gouttes étant soit translucides (protéine encore totalement soluble), soit précipitées (protéine à l'état solide mais amorphe).

Les cristaux de YHs obtenus avec le robot nanodrop étaient non seulement trop petits (inférieur à 10 μm) mais également maclés (plusieurs cristaux agglomérés au lieu de monocristaux distincts) (**Figure 73 A et B**). Les conditions de cristallisation ont donc été optimisées manuellement puis grâce à un autre kit Additive Screen afin d'aboutir à des monocristaux dont les arêtes mesuraient 20 à 120 μm . Ce dernier kit a mis en évidence le rôle de l'hexafluoropropanol qui permet d'éviter l'agglomération des cristaux de YHs. Finalement, les solutions réservoirs contenant du sulfate d'ammonium n'ont pas abouti à de bons résultats, tandis que celles contenant du LiCl et du PEG 6000 ont permis l'apparition de cristaux de meilleure qualité (**Figure 73 C et D**).

Etonnamment, la répétition des expériences de cristallisation dans les conditions optimales (10 mM Tris pH 8,5 ; 250 mM LiCl ; 19 % PEG 6000 ; 3,8 % hexafluoropropanol) avec d'autres lots de YHs fraîchement purifiée n'a pas permis de obtenir à nouveau de tels cristaux. Heureusement, les premiers cristaux ont pu être ensemencés dans de nouvelles boîtes afin de les multiplier, et d'obtenir plusieurs cristaux de belle qualité. Par ailleurs, des gels SDS-PAGE ont permis de s'assurer de l'intégrité de la protéine YHs dans les cristaux, et en particulier de l'absence de toute protéolyse entre les deux domaines catalytiques.

4.2. Collecte des données et attribution structurale

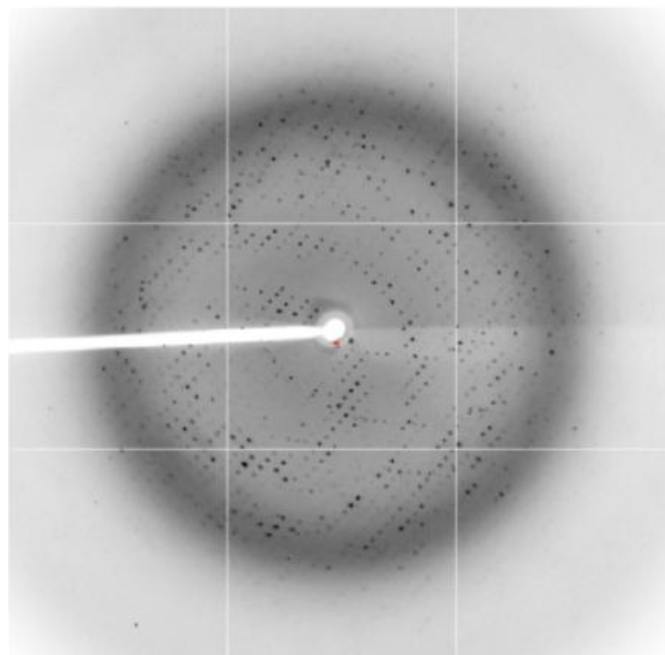


Figure 74 : Diagramme de diffraction d'un cristal de YHs.

Les données ont été collectées à la ligne PROXIMA I du synchrotron Soleil. Le diagramme de diffraction du cristal ayant permis d'atteindre une résolution de 2,5 \AA est présenté **Figure 74**. Le principe de la cristallographie se base sur la caractérisation de chaque faisceau diffracté en termes de module ($\alpha|V|$) et de phase puis sur une transformée de Fourier inverse permettant de reconstituer la carte de densité électronique (enveloppe) de la structure d'une protéine. L'ensemble des résidus de la protéine sont alors positionnés et ajustés au sein de cette carte lors du travail d'attribution structurale. Ce travail a été réalisé par Solange Moréra (LEBS, Gif-sur-Yvette) en se basant sur les structures cristallographiques des CPR de levure (2BF4) et de rat (1AMO) déjà publiées. Chacun des

domaines de la CPR chimère a ainsi été positionné, puis le linker (résidus 212-242 de Hs) reliant le domaine de connexion au domaine FMN a été reconstitué.

Les données cristallographiques et les paramètres de raffinement sont présentés dans le **Tableau 16**. Ces paramètres permettent d'évaluer la qualité du model affiné. Le facteur R reflète l'accord entre les facteurs de structure observés et ceux calculés. Le facteur R_{libre} est calculé sur 5% des données ayant été retirées de l'affinement. Cette mesure permet de s'assurer que des erreurs du modèle ne sont pas compensées par des erreurs de structure, baissant ainsi la valeur du facteur R classique (méthode de « crossvalidation »). Les déviations moyennes (RMSD) des longueurs et des angles de liaison entre atomes du modèle reflètent sa qualité stéréochimique. Les paramètres cristallographiques du modèle de YHs sont de bonne qualité avec des facteurs R et R_{libre} inférieurs à 30 et des RMSD de liaisons et d'angles largement inférieurs respectivement à 0,02 Å et 2°.

Tableau 16 : Données cristallographiques et paramètres de raffinement pour YHs

Groupe d'espace	C2
Paramètres de maille (Å)	$a = 146,8 ; b = 60,7 ; c = 78,8 ; \beta = 103,4$
Résolution (Å)	20-2,5 (2,64-2,5)
Nombre de réflexions observées	85573 (13223)
Nombre de réflexions uniques	23129 (3583)
R_{sym} (%) ^a	10,4 (50,9)
Complétude (%)	97,4 (94,9)
I/σ	12,7 (4,2)
R_{cryst} (%) ^b	22,2
R_{libre} (%) ^c	29
RMSD liaisons (Å)	0,008
RMSD angles (Å)	1,09
Facteur B moyen (Å ²)	
Protéine globale	34,6
Domaine FMN	22,1
Domaine FAD	19,1
Solvant	28,2

^a $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, avec $I_i(hkl)$ correspondant à l'amplitude observée i des réflexions hkl et $\langle I(hkl) \rangle$ correspondant à l'amplitude pour la totalité des observations i de la réflexion hkl .

^b $R_{cryst} = \sum | |F_{obs}| - |F_{calc}| | / \sum |F_{obs}|$

^c 5 % des données ont été retirées pour le calcul facteur R libre.

Les valeurs correspondant à la dernière coquille de résolution sont indiquées entre parenthèses.

4.3. La forme ouverte de la CPR

4.3.1. Comparaison générale des formes ouverte et fermée de la CPR

La CPR chimère YHs a cristallisé dans une conformation inédite (**Figure 75 A**) jamais caractérisée auparavant chez aucune CPR. Dans cette nouvelle conformation, le domaine FMN est éloigné du domaine FAD et la distance entre les groupements méthyles en positions C7 et C8, les deux cofacteurs flavinique par lesquels transitent les électrons, est de 86 Å. A l'inverse, cette distance n'était que de 3 ou 4 Å dans les conformations fermées (**Figure 75 B et C**). La CPR YHs a cristallisé en l'absence de ligand NADP⁺, contrairement aux deux CPR parentales modèles Ys et Rs et aucune trace de ce ligand n'est visible sur la carte de densité électronique.

L'ensemble de la structure de YHs a une assez bonne résolution (2,5 Å). Les facteurs B moyens des domaines catalytiques FMN et FAD, respectivement 22,1 et 19,1 Å², sont bien inférieurs au facteur B moyen de l'ensemble la structure (34,6 Å²) et les sites de fixation des flavines sont particulièrement figés. Tout comme dans les structures de Ys et Rs (**Figure 47**), le linker reliant le domaine de connexion au domaine FMN est très flexible (**Figure 76**). Deux boucles à l'extérieur du domaine FAD ne sont pas visibles dans la carte de densité électronique de YHs à cause de leur mobilité trop importante (complétude de 97,4 %).

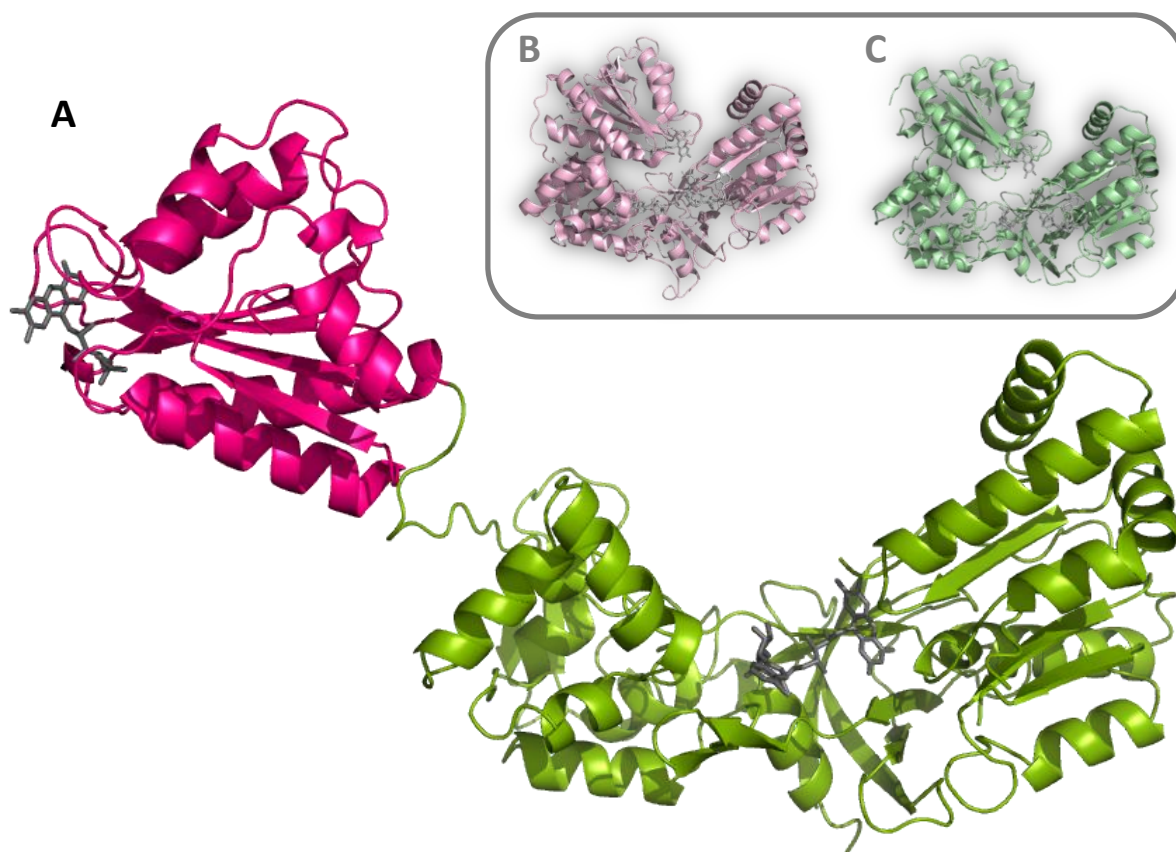


Figure 75 : Structure de YHs et comparaison avec celles de Ys et Rs. A : YHs (3FJO). Le domaine FMN issu de Ys est en rose tandis que les domaines de connexion et FAD issus de Hs sont en vert. Les cofacteurs flaviniques sont indiqués en gris. Encadré : Rappel des structures de Ys (B) et Rs (C) qui sert de modèle de pour Hs.

Les contacts cristallins au sein de la maille cristallographique de YHs ont été étudié afin de s'assurer que ceux-ci n'étaient pas de type hétérodimère. En effet, dans les structures de Ys et Rs, le domaine FMN est imbriqué au creux des domaines de connexion et FAD qui forment un U. Nous voulions donc vérifier que le domaine FMN d'une molécule de YHs ne se retrouvait pas en contact avec les domaines de connexion et FAD d'une autre molécule de la maille qui aurait alors stabilisé l'ouverture de la première molécule. La **Figure 77** démontre bien que le domaine FMN d'une molécule YHs n'est en contact qu'avec d'autres domaines FMN ou avec l'extérieur d'autres domaines FAD. Les contacts cristallins ne justifient donc pas *a priori* l'ouverture de la CPR.

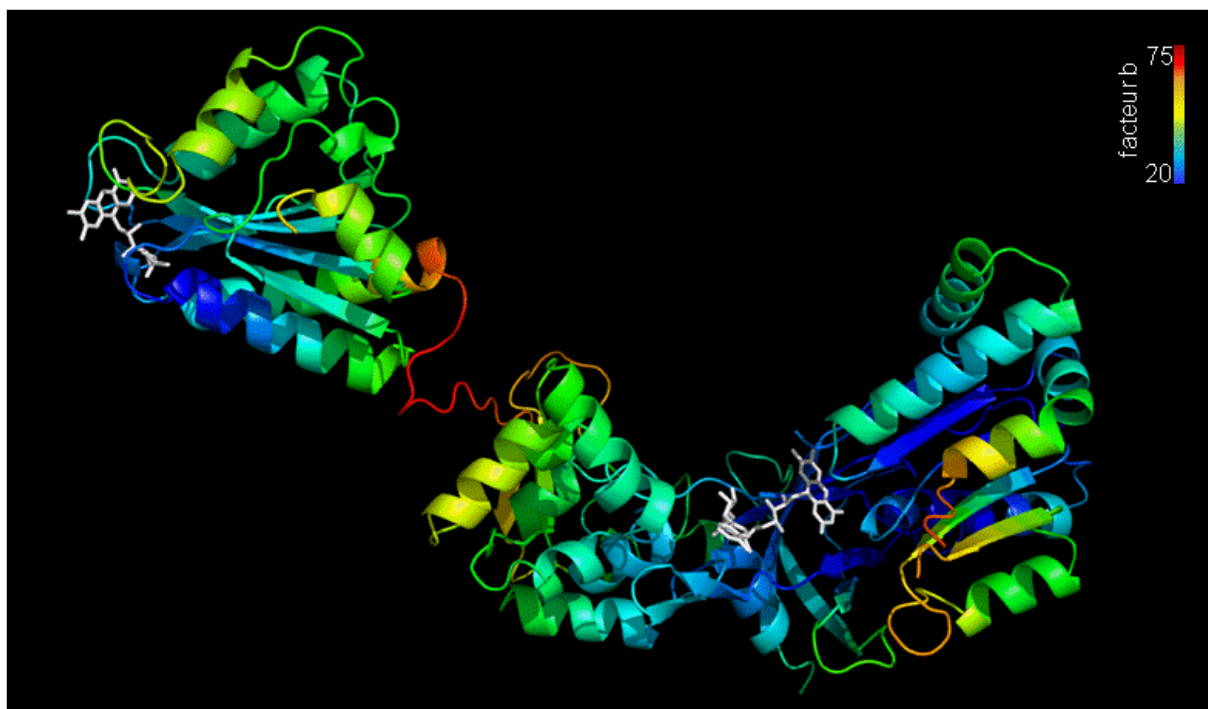


Figure 76 : Structure de la CPR chimère YHs colorée en fonction des facteurs B de la chaîne carbonée.

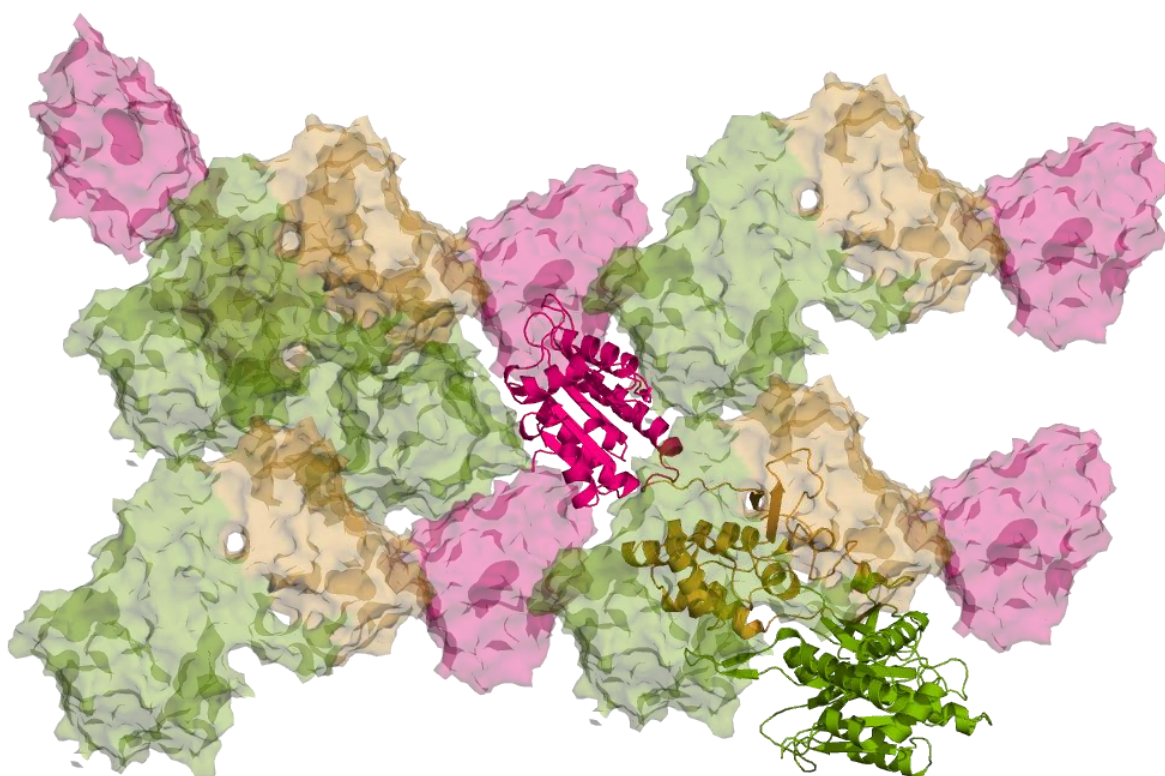


Figure 77 : Maille du cristal de YHs. Les domaines FMN, connexions et FAD des différentes molécules de YHs dans la maille cristallographique sont représentés respectivement en rose, orange et vert. Une molécule de YHs (ruban) est entourée de nombreuses autres molécules (enveloppe). Son domaine FMN est en contact soit avec d'autre domaine FMN (rose), soit avec la surface extérieure de domaines FAD (vert) ; mais en aucun cas, le domaine FMN de YHs n'est imbriqué entre un domaine de connexion et un domaine FAD comme c'est le cas dans les structures fermées de CPR.

Une comparaison des formes ouverte et fermée de la CPR révèle que, si l'on aligne les deux structures sur leurs domaines connexion/FAD, le domaine FMN effectue une rotation de 180° entre les deux conformations autour d'un axe de symétrie proche du linker (**Figure 78** et **Figure 79**). Les molécules de FMN ont alors des positionnements éloignés de 89 Å. De telles différences structurales représentent des réarrangements conformationnels très importants au sein d'une protéine multidomaine. Il est important de noter le choix arbitraire d'aligner les structures ouverte et fermée au niveau des domaines de connexion et FAD plutôt que sur les domaines FMN. Cette représentation est plus lisible en termes de figures car le domaine FMN est plus petit que le reste de la protéine. Mais il faut garder à l'esprit que la partie membranaire, absente de la structure cristallographique, qui permet l'ancrage de la CPR à la membrane du réticulum endoplasmique au sein de la cellule, se situe à l'extrémité N-terminale du domaine FMN. Ce domaine est donc certainement plus contraint que les deux autres puisqu'il est directement relié à la membrane. D'un point de vue physiologique, il est plus probable que le domaine FAD effectue une rotation autour du domaine FMN que l'inverse.

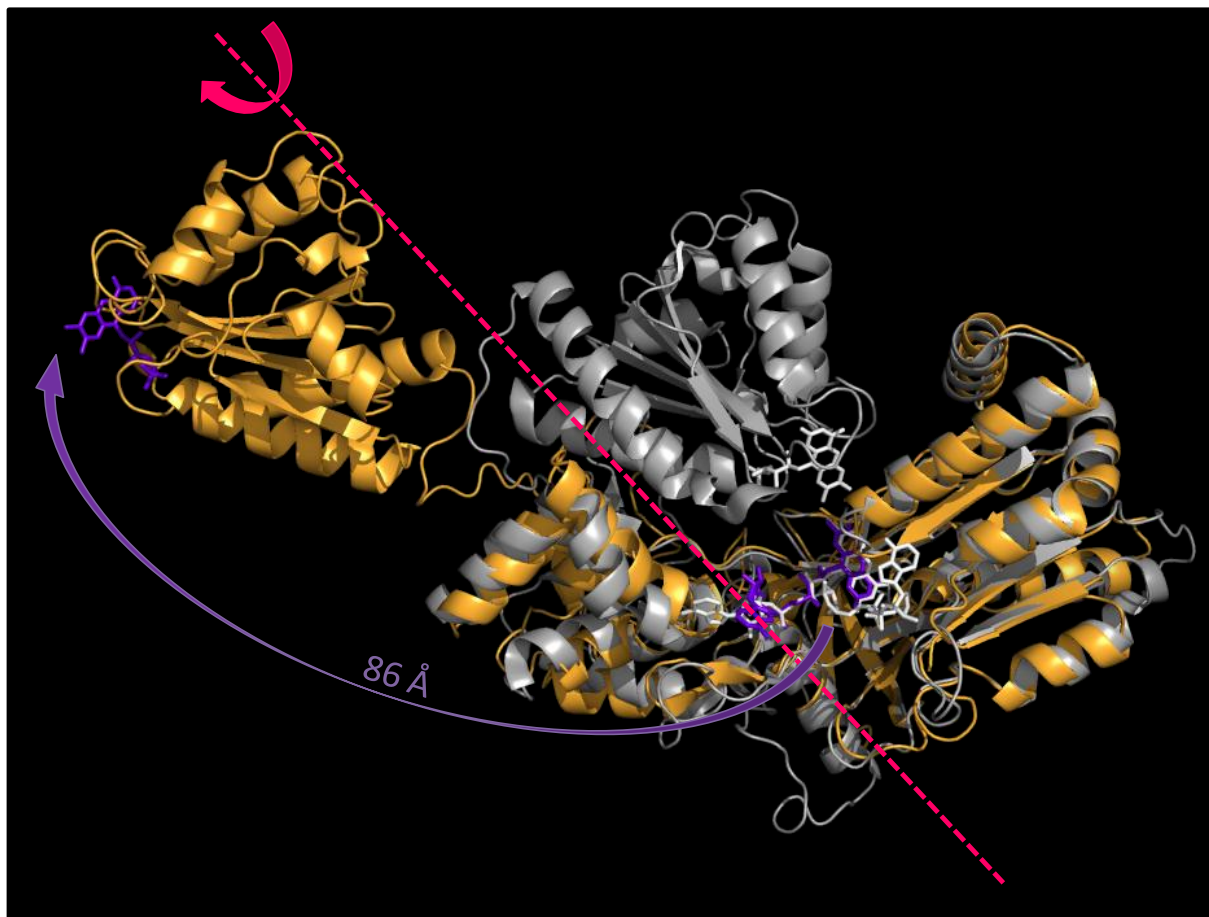


Figure 78 : Comparaison de la structure ouverte de YHs (orange) et de celle fermée de Ys (grise). Les deux structures ont été alignées sur leurs domaines de connexion et FAD.

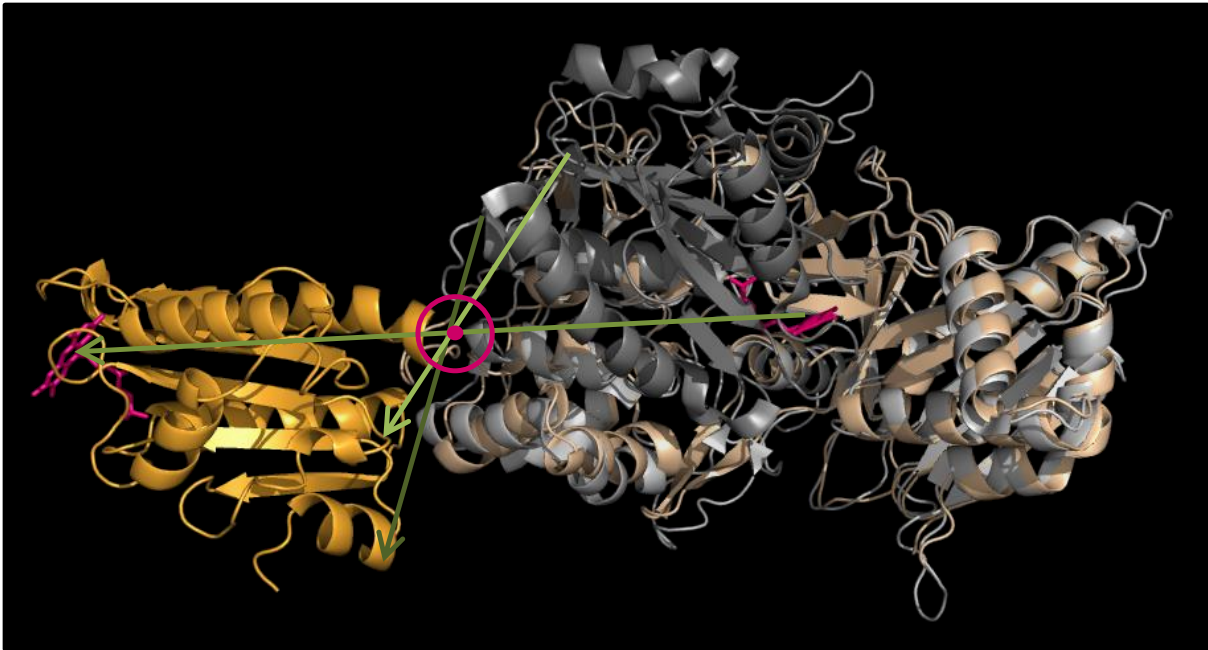


Figure 79 : Structure de YHs et Ys alignées sur leurs domaines de connexion et FAD (respectivement orange et gris clairs) tout comme la Figure 78 mais vue de haut. Il existe un axe de symétrie (rose) perpendiculaire à la feuille entre les domaines FMN de YHs et Ys (respectivement orange et gris).

Le cofacteur FMN dans la structure ouverte de YHs est bien plus exposé au solvant et donc plus accessible aux accepteurs externes tels que les P450 (**Figure 80 A**). En effet, dans la conformation fermée de la CPR, le FMN est complètement enfouie au sein de la protéine et n'apparaît pas en surface (**Figure 80 B**). A l'inverse, dans la conformation ouverte, les groupements méthyles en positions C7 et C8, par lesquels les électrons sont supposés transiter, sont totalement exposés au solvant.

La conformation nouvelle dans laquelle la CPR chimère YHs a cristallisé correspond à une forme ouverte de la CPR longtemps supposée mais jamais mise en évidence de manière directe (Grunau et al., 2007; Gutierrez et al., 2003; Gutierrez et al., 2002; Hubbard et al., 2001; Iyanagi, 2005). En effet, depuis la résolution des structures cristallographiques de Ys (Lamb et al., 2006) et Rs (Wang et al., 1997), l'impossibilité d'un quelconque transfert direct du FMN vers un P450 avait conduit à l'hypothèse d'un changement conformationnel au cours du cycle de la CPR permettant de diminuer l'encombrement stérique autour du FMN. La structure de YHs pourrait donc potentiellement correspondre à la conformation de la CPR lorsque celle-ci transfère des électrons à un accepteur externe.

En conclusion, YHs a cristallisé dans une conformation jusqu'alors inconnue, plus ouverte que celle correspondant à Rs et Ys. La résolution à 2,5 Å et les autres caractéristiques du modèle structural de YHs reflète la bonne qualité de cette structure cristallographique. Par ailleurs, dans cette nouvelle configuration, le cofacteur FMN est parfaitement exposé au solvant et peut donc probablement transférer directement des électrons à des accepteurs externes.

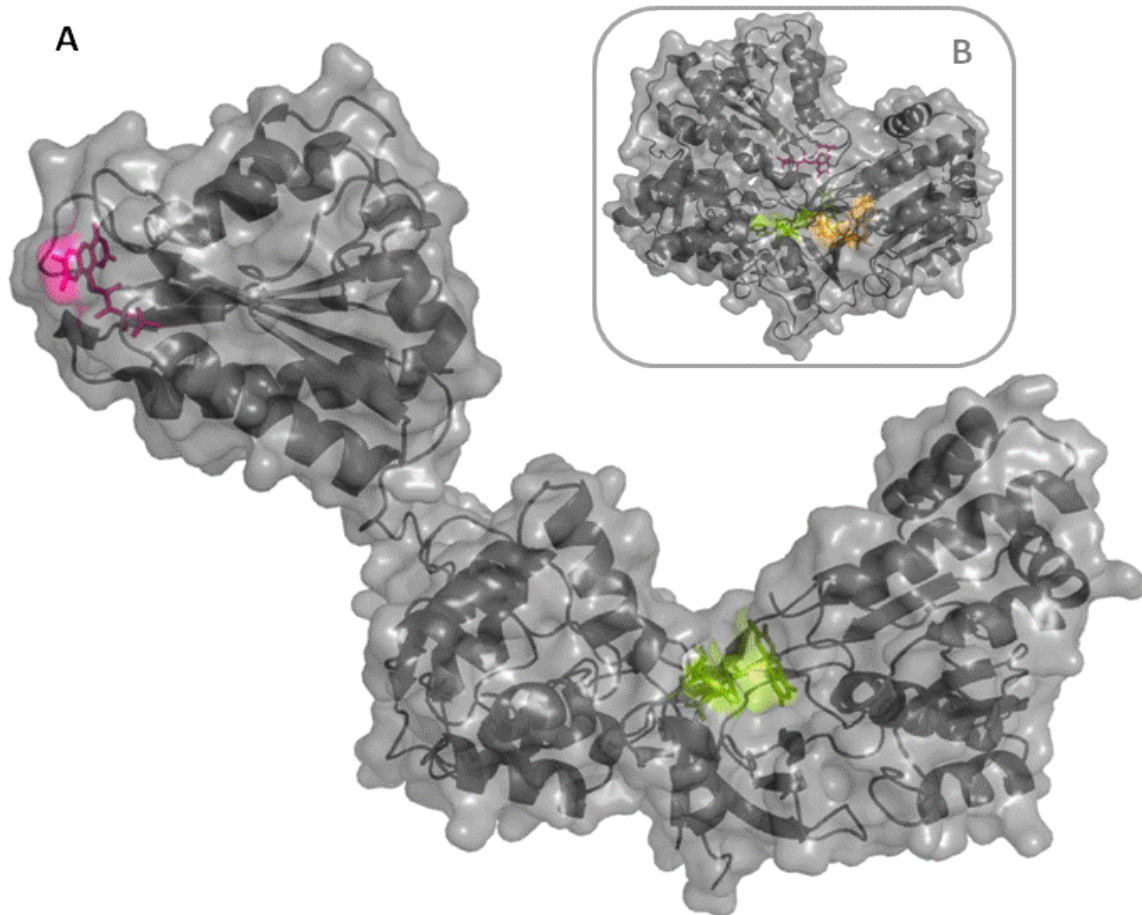


Figure 80 : Représentation en surface des structures de YHs ouverte (A) et Ys fermée (B). Les molécules de FMN, FAD et NADP⁺ sont représentées respectivement en rose, vert et orange. Tandis que dans la conformation fermée le cofacteur FMN est totalement enfouie au cœur de la protéine, il est exposé au solvant dans la conformation ouverte.

4.3.2. Comparaison des domaines isolés

Bien que la conformation globale dans laquelle la protéine chimère YHs a cristallisé soit très différente de celles connues jusqu'alors, les structures de chaque domaine pris séparément sont similaires dans les deux formes de la CPR, ouverte et fermée (**Figure 81**). Concernant le domaine FMN, sa structure interne est véritablement identique dans les deux conformations (**Figure 81 A**) avec une RMSD entre les deux chaînes d'acides aminés de YHs et Ys de seulement 0,46 Å sur 165 atomes C α . La partie regroupant les domaines de connexion et FAD présente également une structure analogue entre YHs et Rs, et la RMSD entre ces deux chaînes est de 0,9 Å sur 428 atomes C α . Dans cette partie de la CPR, de légères différences sont visibles entre les deux structures aux niveaux des extrémités des deux domaines en vert et en rouge sur la **Figure 81 B**.

Le positionnement des deux cofacteurs flaviniques reste également inchangé. En effet, qu'il s'agisse de la molécule de FMN ou de celle de FAD, les deux se superposent parfaitement lors de l'alignement des structures des domaines FMN de YHs (**Figure 82 A**) et Ys ou des domaines connexion/FAD de YHs et Rs (**Figure 82 B**).

Ainsi le domaine de connexion ne semble absolument pas responsable du réarrangement structural majeur que constitue l'ouverture de YHs. En effet, sa structure est à peine modifiée entre les formes ouvertes et fermée. Ce domaine de connexion peut potentiellement transmettre de

l'information entre les domaines catalytiques mais ce n'est apparemment pas lui qui dirige physiquement l'ouverture de la protéine, à moins qu'il ne subisse toute une séquence de réarrangements conformationnels au cours de l'ouverture mais que les structures de départ et d'arrivée soient similaires.

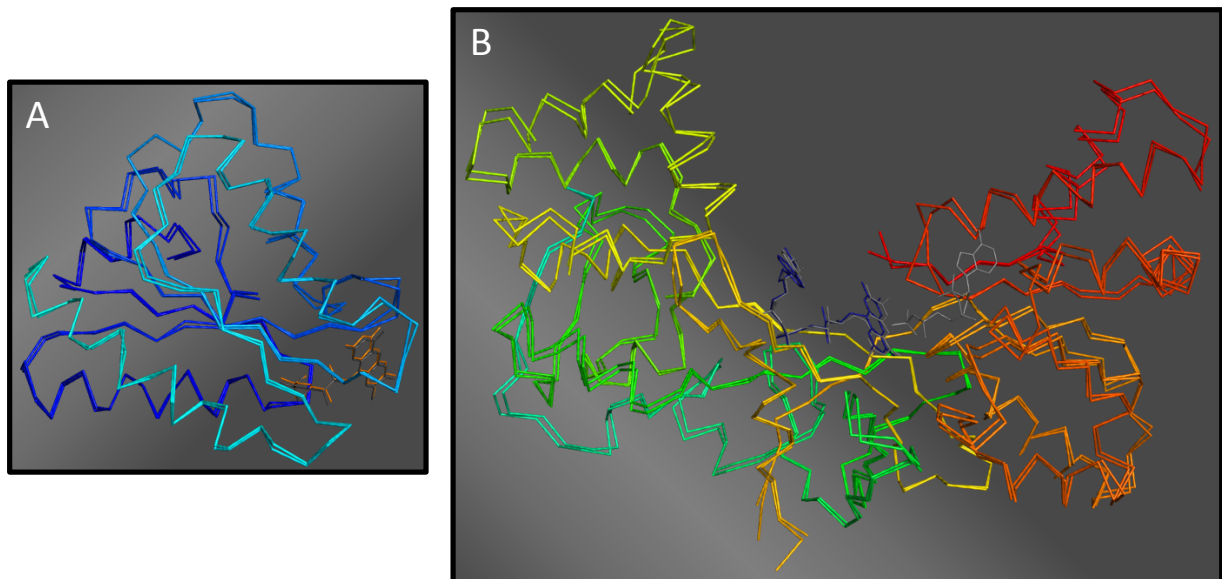


Figure 81 : Alignements structuraux de chacune des parties de YHs et des CPR parentales. A : Alignement des domaines FMN de la CPR chimère YHs (ouverte) et la CPR parentale Ys (fermée). B : Alignement des domaines de connexions et FAD de la CPR chimère YHs (ouverte) et de la CPR parentale Rs (fermée) servant de modèle pour Hs. Aucune modification structurale significative n'est visible au sein des parties de la CPR entre les formes fermée et ouverte. Le réarrangement conformationnel général de la protéine n'a pas modifié la structure intrinsèque de chacun des domaines. Même le domaine de connexion reste inchangé. Représentation en traits du squelette de la chaîne d'acides aminés.

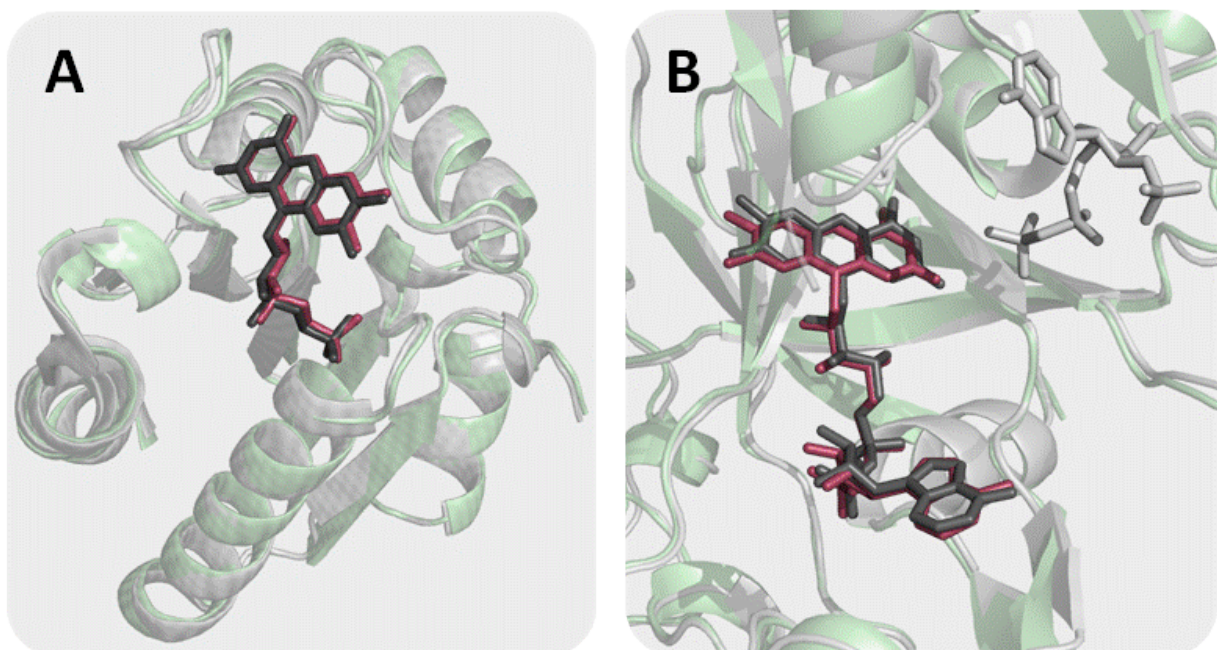


Figure 82 : Alignements structuraux de chacune des parties FMN (A) et FAD (B) de la CPR chimères YHs (vert clair) sur les parties correspondantes des CPR parentales (gris clair). Le positionnement des cofacteurs dans la structure ouverte de YHs (rouge) et fermées des CPR parentales (gris) est identique.

En conclusion, l'ouverture de la CPR n'a modifié la structure interne d'aucun domaines, même celui de connexion qui ne joue a priori pas le rôle de charnière physique que nous avons imaginé pour lui.

4.3.3. Rotation et changements conformationnels au niveau du linker

Le large mouvement du domaine FMN entre les formes fermée et ouverte n'est visiblement dû qu'à la rotation de quelques acides aminés du linker qui relie les domaines de connexion et FMN (**Figure 83 A et B**). La nature hautement flexible de ce linker a déjà été décrite que ce soit chez les CPR parentales (**Figure 47**) ou chez la chimère YHs (**Figure 76**). L'alignement des domaines FMN de YHs et Ys permet d'identifier la glycine 217 comme étant le premier résidu du linker à partir duquel les deux structures ouverte et fermée commencent à diverger (**Figure 83 C**). De la même façon, l'alignement des domaines de connexion et FAD de YHs et Rs indique clairement que le serine 220 correspond au premier résidu de ces deux structures dont la conformation est totalement différente (**Figure 83 D**). La glycine et la sérine sont d'ailleurs de petits résidus particulièrement flexibles. L'ensemble ²¹⁷Gly-Glu-Glu-Ser²²⁰ adopte une conformation spécifique dans chacune des formes de la CPR et permet la rotation générale du domaine FMN par rapport au domaine FAD.

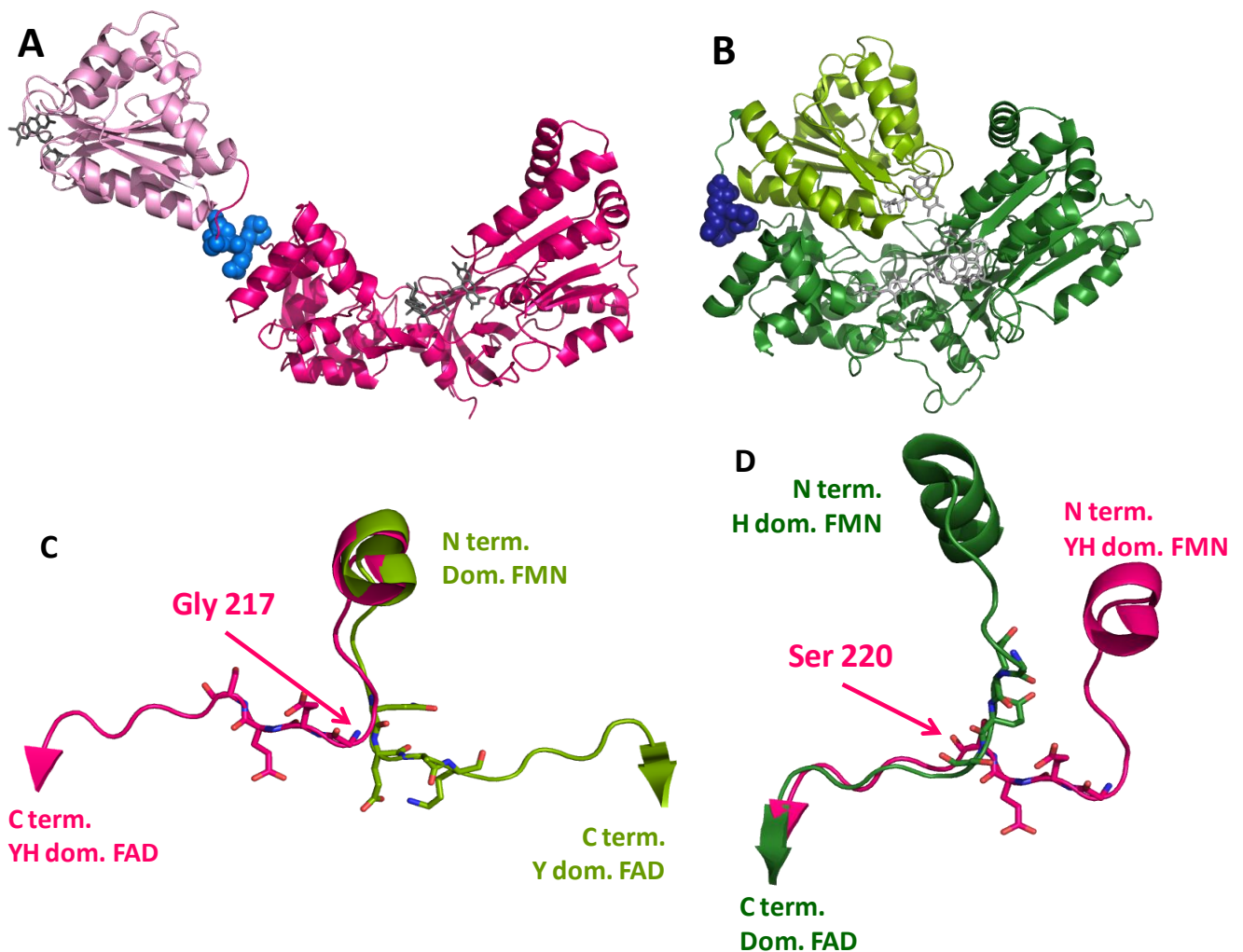


Figure 83 : Les résidus responsables de l'ouverture de YHs (A) en comparaison avec la forme fermée des CPR parentale (B) sont indiqués par des sphères bleues. La rotation de l'ensemble du domaine FMN de YHs se fait autour des 3 résidus 217-220. C et D : Représentation du linker reliant le domaine de connexion au domaine FMN après avoir alignée les domaines FMN de YHs (rose) et Ys (vert clair) en C ou les domaines de connexion de YHs (rose) et Rs (vert foncé). Les résidus 217-220 sont représentés en bâtons.

Enfin, la totalité des changements conformationnels subits par la CPR, lorsqu'on compare les formes ouverte et fermée de celle-ci, ne sont dus qu'à 4 résidus flexibles au milieu du linker reliant le domaine de connexion au domaine FMN.

DISCUSSION

Nos chimères sont ce qui nous ressemble le mieux.

Victor Hugo

1. Propriétés cinétiques et thermodynamiques des CPR chimères

1.1. Reconnaissance et intégrité des domaines

Au cours de ce projet, nous avons construit, purifié et étudié des CPR chimériques constituées de domaines catalytiques provenant d'organismes évolutionnellement éloignés (humain et levure). A travers l'analyse des propriétés spectrales de leurs cofacteurs flaviniques, nous avons pu mesurer leurs caractéristiques enzymologiques de ces chimères, la vitesse de certains transferts électroniques qu'elles catalysent, les valeurs des potentiels standards de leurs cofacteurs, ou encore leurs stabilités vis-à-vis d'agents dénaturants ou de la température. En étudiant ces résultats et en les comparant à ceux obtenus pour les CPR parentales, nous avons pu évaluer et identifier les répercussions de la substitution d'un domaine catalytique sur le comportement général de la CPR. Ces constatations nous permettent finalement de mieux comprendre le fonctionnement des CPR en général.

La construction de chimères combinant des domaines de CPR éloignées en termes d'organismes d'origine et de propriétés biochimiques (mais très proches en termes de structures cristallographiques) a introduit des modifications en particulier au niveau des interfaces entre ces différents domaines. Pourtant, malgré ces perturbations, les chimères restent fonctionnelles, bien que leurs activités soient inférieures à celles des CPR natives. Ce travail confirme donc tout d'abord que le caractère modulaire des systèmes de transport d'électrons au P450 autorise réellement l'échange entre modules de rôle équivalent au sein des systèmes P450 de classe II. Après avoir fusionné et échangé des systèmes de transports d'électrons avec divers accepteurs finaux (Dodhia et al., 2006; Gilep et al., 2001a; Gilep et al., 2001b; Hlavica, 2009; Inui et al., 2007; Sakaki et al., 1994; Shiota et al., 2000), ou avoir substitué des domaines entre différentes NOS (Adak et al., 2001; Haque et al., 2007; Ruan et al., 1996) ou entre NOS et CPR (Roman et al., 2003), nous avons démontré que la CPR présente les mêmes propriétés de souplesse et d'adaptation à la substitution de domaines.

Au vu des analyses biochimiques, il apparaît déjà clairement que si l'intégrité de chacun de leurs domaines catalytiques est bien conservée au sein des CPR chimériques, la reconnaissance et les interactions entre ces domaines ont par contre été fortement modifiées. Les chimères assurent tout de même un transfert électronique vers des accepteurs externes selon la même voie électronique que les CPR parentales. Cela démontre que les domaines catalytiques sont encore capables d'assurer leur rôle et de « communiquer » entre eux. De plus, les valeurs des $k_{cat}^{ferricyanure}$ chez HYs et YHs sont similaires à celles des CPR parentales ayant le même domaine FAD, et la vitesse du transfert correspondant à la réduction du FAD par le ligand NADPH est même accélérée chez les chimères. Le fonctionnement du FAD n'est donc absolument pas affecté chez les chimères. Donc, si les valeurs de $k_{cat}^{cyt\ c}$ sont par contre fortement diminuées chez les CPR chimériques, ce phénomène n'est pas dû à un ralentissement de la réduction du cofacteur FAD lui-même, mais plutôt à l'altération du transfert interflavine et/ou du transfert externe vers un accepteur externe.

Dans le cas où seul ce transfert externe vers le cyt *c* serait limitant, les courbes d'activité en fonction de la concentration en accepteur présenteraient une dépendance du premier ordre. Ce phénomène est bien observé pour de faibles concentrations en cyt *c* (début de l'hyperbole), mais un autre phénomène de saturation apparaît ensuite lorsque les concentrations en accepteur augmentent. Cette saturation provient probablement d'un changement de l'étape cinétiquement déterminante (Purdy et al., 2004) qui ne correspondrait plus au transfert externe vers le cyt *c* mais

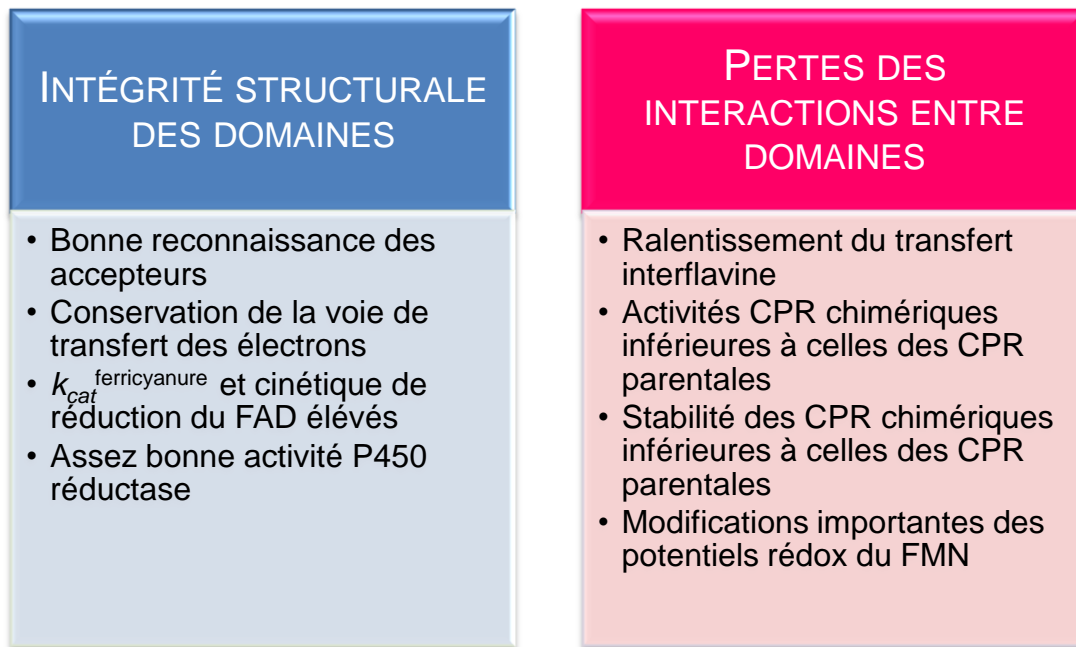
plutôt au transfert interne entre le FAD et le FMN. Chez les CPR chimères, les valeurs de demi-saturation ($K_{1/2}$) vis-à-vis du cyt *c* sont identiques à celles des CPR parentales, voir meilleures dans le cas de YHs. Ainsi, la reconnaissance de l'accepteur artificiel et le transfert externe vers celui-ci ne semblent pas diminués au sein des protéines modifiées. La saturation plus rapide (c'est-à-dire pour une concentration en cyt *c* et une vitesse de transfert plus faibles) résulterait donc plutôt d'une diminution du transfert interne.

Les données de cinétique rapide vont également dans ce sens puisque la cinétique du transfert FAD→FMN est divisée par 2 chez les protéines chimériques comparativement aux protéines parentales. Ces dernières mesures n'expliquent pour autant pas le ralentissement d'un facteur 10 de l'activité cyt *c* réductase chez les CPR chimères car d'autres facteurs de nature thermodynamique doivent également être pris en compte. Ainsi les changements conformationnels entre les domaines catalytiques de la CPR qui permettent de passer de la forme fermée (transfert interflavine) à la forme ouverte (transfert externe) (Gutierrez et al., 2002), ou encore les valeurs des potentiels standards des cofacteurs flaviniques jouent aussi un rôle sur l'efficacité de ce transfert interne. Par exemple, les valeurs étonnamment élevées du potentiel E°_1 du FMN au sein des chimères défavorisent la réduction d'accepteurs externes. C'est donc la somme des facteurs cinétiques et thermodynamiques contrôlant les réactions de transferts qui permettent d'expliquer les variations importantes des propriétés biochimiques des différentes CPR.

Les modifications des constantes de demi-saturation vis-à-vis du cyt *c*, ou encore l'accélération étonnante de la réduction du cofacteur FAD chez les chimères sont très probablement reliées à des différences conformationnelles entre les CPR chimériques et parentales, certaines géométries pouvant favoriser tel ou tel transfert ou la reconnaissance des accepteurs externes et du ligand. Par ailleurs, les analyses de dénaturation des différentes CPR démontrent une diminution de la stabilité mais également une baisse de la coopérativité chez les protéines chimériques. Ces caractéristiques dépendent aussi de la géométrie adoptée par chacune des CPR qui favorise ou non les interactions entre les domaines catalytiques. Or la conformation d'une CPR en solution dépend de phénomènes statiques (constante d'équilibre en solution dictant la conformation moyenne de la CPR) et/ou dynamiques (vitesse de l'échange entre les différentes conformations adoptées par la CPR). Seules des études ciblant directement les propriétés dynamiques de changements de géométries au sein de chaque CPR (à l'échelle de la milliseconde) permettraient de discerner ces différents phénomènes.

Chez nos CPR chimères, les activités P450 réductases semblent étonnamment moins affectées que les activités cyt *c* réductases. Il est pourtant important de noter que ces tests P450 ont été effectués pour des ratios accepteurs vs. CPR bien plus faibles que lors des mesures d'activité cyt *c* réductase (conditions michaeliennes). Les tests P450 correspondent donc à des conditions pour lesquelles le transfert interne n'est pas ou peu limitant par rapport au transfert externe (début de la courbe de saturation). Ceci pourrait expliquer la diminution de l'écart d'activités mesurée entre CPR chimériques et natives, les chimères étant pratiquement aussi actives que Ym et seulement 3 fois moins actives que Hm. Par ailleurs, le transfert de la CPR vers le P450 est bien plus lent que celui vers le cyt *c* et nécessite une réelle reconnaissance entre les différents partenaires. Ce dernier paramètre est probablement à l'origine de la saturation de l'activité P450 réductase lorsque le ratio CPR :P450 est élevé.

Globalement, les analyses biochimiques des chimères et leur comparaison avec les CPR parentales indiquent que (i) l'affinité et la reconnaissance des CPR chimériques pour les accepteurs artificiels ou naturels ne sont pas ou peu affectées, (ii) le transfert interne entre les deux cofacteurs flaviniques est par contre diminué, et (iii) les constantes d'équilibre et la dynamique entre les différentes conformations des CPR sont très probablement perturbées.



1.2. Interprétation des résultats de potentiométrie

Malgré des perturbations structurelles importantes chez les chimères ayant conduit entre autre à des changements conformationnels majeurs entre les structures cristallographiques de YHs et des CPR parentales, les valeurs des potentiels standard des cofacteurs des protéines chimères restent agencées de la même façon que celles de Hs (Ys présente une inversion des potentiels $FMN_{ox/sq}$ et $FMN_{sq/hq}$ qui empêche l'accumulation de semiquinone). L'intégrité de chacun des domaines préserve donc la force électromotrice favorisant un transfert du FAD vers le FMN. Pourtant quelques particularités des protéines chimériques sont à noter telles que les valeurs particulièrement basses des potentiels du FAD chez YHs ou encore l'écart très important entre les deux potentiels du FMN chez les deux chimères ($E^{\circ}_1 \approx 0$ mV et $E^{\circ}_2 \approx E^{\circ}_3$). D'un point de vue thermodynamique, ces caractéristiques singulières devraient freiner la réduction du FAD par le NADPH chez YHs et empêcher la réduction totale des chimères qui n'a de toute façon pas lieu au cours du cycle catalytique des CPR.

Ces résultats ont déjà été commentés et comparés à ceux trouvés dans la littérature (voir Résultats § 3.4); mais par ailleurs, les mesures de potentiométrie à l'équilibre doivent être interprétées avec précaution car la titrage des CPR à l'équilibre ne permet pas obligatoirement d'accéder aux valeurs des potentiels standards des espèces actives dans des conditions catalytiques (Murataliev and Feyereisen, 2000b; Murataliev et al., 2004). En effet, ces résultats ne reflètent que le comportement moyen de l'ensemble des molécules de CPR à l'équilibre. Or, non seulement la conformation moyenne de ces protéines mais également les constantes d'équilibre entre ces différentes conformations peuvent varier selon la nature de la CPR et le potentiel de la solution. La

mesure de potentiométrie à l'équilibre ne permet donc malheureusement pas d'accéder à la valeur du potentiel standard de l'espèce chimique directement responsable du transfert électronique à telle ou telle étape du cycle catalytique des CPR, mais seulement à la moyenne des potentiels des espèces en équilibre.

Un autre facteur pouvant modifier significativement les potentiels standards des flavines est occulté lors des mesures de potentiométrie ; il s'agit de l'influence du NADPH. Des modifications des potentiels standards des flavines dues à la fixation du ligand NAD(P)H ont été caractérisées chez de nombreuses flavoprotéines. Chez les diflavines réductases en général et la CPR en particulier, le transfert d'hydrure entre le NADPH et le FAD passe tout d'abord par la formation d'une espèce compétente pour le transfert de charge via des changements conformationnels au niveau des sites de fixation des cofacteurs (Gutierrez et al., 2003; Murataliev and Feyereisen, 2000a; Welland et al., 2008). Il s'agit principalement du déplacement d'un tryptophane à l'extrémité C-terminale de la CPR (avant-dernier résidu chez les CPR mammifères et dernier résidu chez Y) qui protège le FAD du solvant en l'absence de ligand (Hubbard et al., 2001; Shen and Kasper, 2000). Ces changements conformationnels, et les interactions nicotinamide-flavine qui en découlent, se répercutent sur les valeurs des potentiels des deux cofacteurs car ils changent leur environnement au cœur de la protéine (Finn et al., 2003; Garnaud et al., 2004; Murataliev and Feyereisen, 2000b). Or ce phénomène n'est pas du tout appréhendé lors des expériences de potentiométrie puisque le potentiel de la solution est alors fixé par le dithionite et est mesuré via des électrodes en l'absence de NADPH.

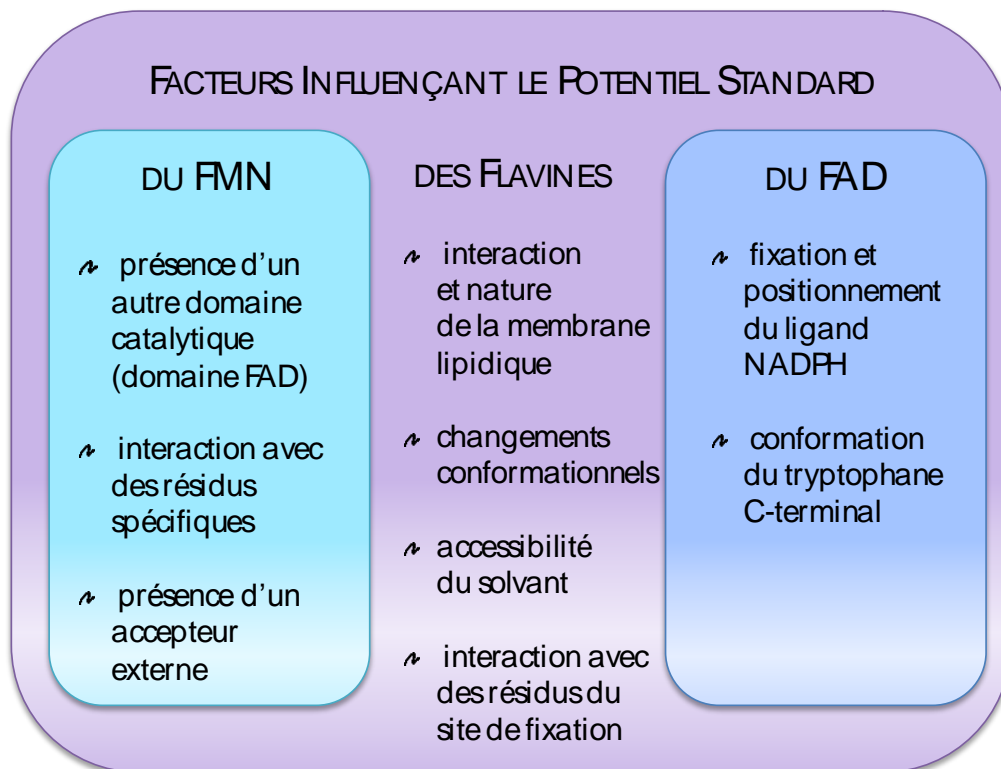
Les potentiels standards très négatifs du cofacteur FAD chez la chimère HYs, qui devraient d'un point de vue thermodynamique défavoriser le transfert d'hydrure, ne correspondent probablement pas aux valeurs réelles en présence de NADPH. De plus, ce transfert d'hydrure est plus rapide chez YHs ($52,9 \text{ s}^{-1}$) que chez Hs (24 s^{-1}) alors que, selon nos résultats de potentiométrie, ce transfert d'hydrure serait plus défavorable chez la chimère que chez le CPR native. L'interprétation des données expérimentales est à nouveau limitée par la difficulté à connaître la nature du contrôle cinétique et/ou thermodynamique régissant les réactions de transferts au sein des CPR étudiées.

L'ensemble des études de potentiométrie sur les diflavines réductases montre un domaine FAD peu sensible à la présence et à la nature du domaine FMN. En effet, les potentiels du cofacteur FAD et les activités ferricyanure réductase restent du même ordre chez les protéines natives (Hubbard et al., 2001; Louerat-Oriou et al., 1998; Murataliev et al., 1999; Shen et al., 1999), disséquées entre deux parties catalytiques distinctes (Smith et al., 1994) ou chimériques. Par contre la cinétique du transfert d'hydrure entre le NADPH et le FAD est influencée par l'autre domaine flavinique qui peut en quelque sorte « attirer » les électrons (Gutierrez et al., 2003; Gutierrez et al., 2002).

Le comportement et le bon fonctionnement du domaine FMN sont bien plus dépendants de son environnement protéique externe. D'un point de vue thermodynamique, les valeurs des potentiels du cofacteur FMN sont encore plus variables que celles du FAD selon la nature et l'organisme d'origine des diflavines réductases ($\Delta(E_2^\circ - E_1^\circ) \in [-50; +300 \text{ mV}]$; $\Delta(E_4^\circ - E_3^\circ) \in [+50; +200 \text{ mV}]$). L'environnement du FMN au sein d'une CPR pouvant adopter des géométries apparemment très diverses est bien plus variable que celui du FAD. En effet, les changements conformationnels majeurs entre les formes ouverte et fermée de la CPR font passer respectivement le FMN d'un environnement très hydrophobe à une exposition totale au solvant, tandis que l'environnement

majoritairement hydrophobe de la molécule de FAD reste assez semblable quelle que soit la géométrie de la CPR. De telles modifications de l'environnement du cofacteur FMN sont certainement à l'origine des différences entre les potentiels standards de ce cofacteur (Muller, 1983) chez les protéines parentales et chimériques.

Ces mesures de potentiométrie confirment bien la sensibilité des potentiels standards des cofacteurs flaviniques vis-à-vis des modifications de leur environnement que ce soit à l'échelle de leur site de fixation ou de la géométrie des domaines au sein des CPR en général. Elles appuient également l'hypothèse selon laquelle les potentiels standards mesurés ne correspondent pas exactement à ceux de telle ou telle espèce chimique compétente à une étape précise du cycle catalytique des CPR mais seulement à la moyenne des espèces ou conformations en équilibre. Par ailleurs, ces équilibres sont probablement déplacés au cours du cycle catalytique de la CPR sous l'influence de la fixation/libération du ligand nicotinamide ou encore de l'état rédox des flavines. Ces différents phénomènes ont un impact sur les valeurs des potentiels standards des flavines qui n'a pas été pris en compte lors de nos mesures.



2. Propriétés structurales de la chimère YHs

2.1. L'éloignement des domaines catalytiques

Ce que les analyses biochimiques laissent supposer quant à la diminution de la reconnaissance et des transferts interdomaines chez nos chimères est finalement confirmé pour l'une d'elle par la résolution cristallographique de YHs. Cette structure de YHs dans une conformation ouverte confirme le bon repliement de chacun des domaines FAD, FMN et de connexion. Elle présente aussi la protéine dans une géométrie des domaines flaviniques complètement différente de celle connue jusqu'alors chez les CPR native. Or, bien que la conformation dans laquelle une protéine cristallise ne corresponde pas obligatoirement à la conformation majoritaire en solution, le simple fait que le repliement propre à chaque domaine soit parfaitement intact prouve qu'une ouverture aussi large des CPR est possible sans pour autant atteindre l'intégrité de ces domaines. Par ailleurs, YHs a cristallisé dans une conformation totalement ouverte dans laquelle les domaines catalytiques ne sont plus du tout en interaction (rotation de 180°C) à l'opposé des conformations très compactes de Ys et Rs. On peut alors supposer que la perturbation de la reconnaissance interdomaine chez cette chimère est telle qu'elle permet la stabilisation de la forme ouverte ou, d'un autre point de vue, qu'elle déstabilise fortement la forme fermée.

Il est donc possible de substituer un domaine entier d'une diflavine réductase tout en conservant son activité catalytique et son mode de fonctionnement. La préservation de la voie de transfert d'électrons chez les chimères prouve entre autre que, malgré la conformation cristallographique ouverte de YHs, ces protéines se referment bien lors de certaines étapes de leur cycle catalytique afin d'autoriser le transfert électronique interne entre le FAD et le FMN. La cristallogénèse de HYs n'a malheureusement pas abouti ; mais le comportement de cette seconde chimère, souvent très proche de la première, nous assure au moins le bon repliement de ses domaines, et laisse à penser que les adaptations des deux chimères aux mêmes perturbations structurales sont certainement assez proches. Ces résultats confirment donc le caractère intrinsèquement mobile de la CPR dont les mouvements de domaines sont considérés comme nécessaires à la livraison des électrons aux P450 de manière synchronisée.

2.2. Les interactions aux interfaces entre les domaines de la CPR

La construction et l'analyse de protéines multidomaines chimériques dont un domaine catalytique entier a été substitué revient finalement à étudier le rôle des interfaces au sein de cette protéine, dès lors que chacun des domaines catalytiques reste fonctionnel. Ces interfaces sont le lieu de la reconnaissance et des interactions entre ces domaines qui contrôlent finalement l'efficacité des transferts électroniques catalysés par la CPR. Pour mesurer l'impact de la substitution des domaines FMN lors de la construction des CPR chimères, nous devons évaluer les interactions existant entre les différents domaines des CPR parentales. Afin de mieux visualiser ces interactions, nous avons identifié les résidus appartenant à des domaines différents, et formant des interactions aux interfaces de ces domaines. Les interfaces entre les domaines FMN, connexion et FAD de Ys se sont révélées plus riches en interactions que celles de Rs avec respectivement 25 et 20 interactions dénombrées.

Une analyse un peu plus fine de ces interactions a permis de les classer selon leur nature (interactions hydrophobes, ponts salins, liaisons hydrogènes, interactions π -cation), et selon leur localisation (**Tableau 17**). En effet, trois zones d'interaction se sont alors distinguées : la zone 1 à l'interface entre les domaines FMN et FAD, la zone 2 à l'interface entre le domaine FMN et le domaine de connexion, et la zone 3 à l'interface entre le domaine FMN et le linker (**Figure 84**).

Tableau 17 : Recensement des interactions aux interfaces entre les domaines de la CPR selon les 3 zones d'interactions et selon la nature de ces interactions.

	Type d'interaction	Total	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Ys	Hydrophobe	6	1	-	5
	Ponts salins	10	5	3	2
	Liaisons hydrogènes	6	2	3	1
	π -cations	3	1	2	-
	Total	25	9	8	8
Rs	Hydrophobe	4	-	-	4
	Ponts salins	9	3	4	2
	Liaisons hydrogènes	6	1	3	2
	π -cations	1	-	1	-
	Total	20	4	8	8

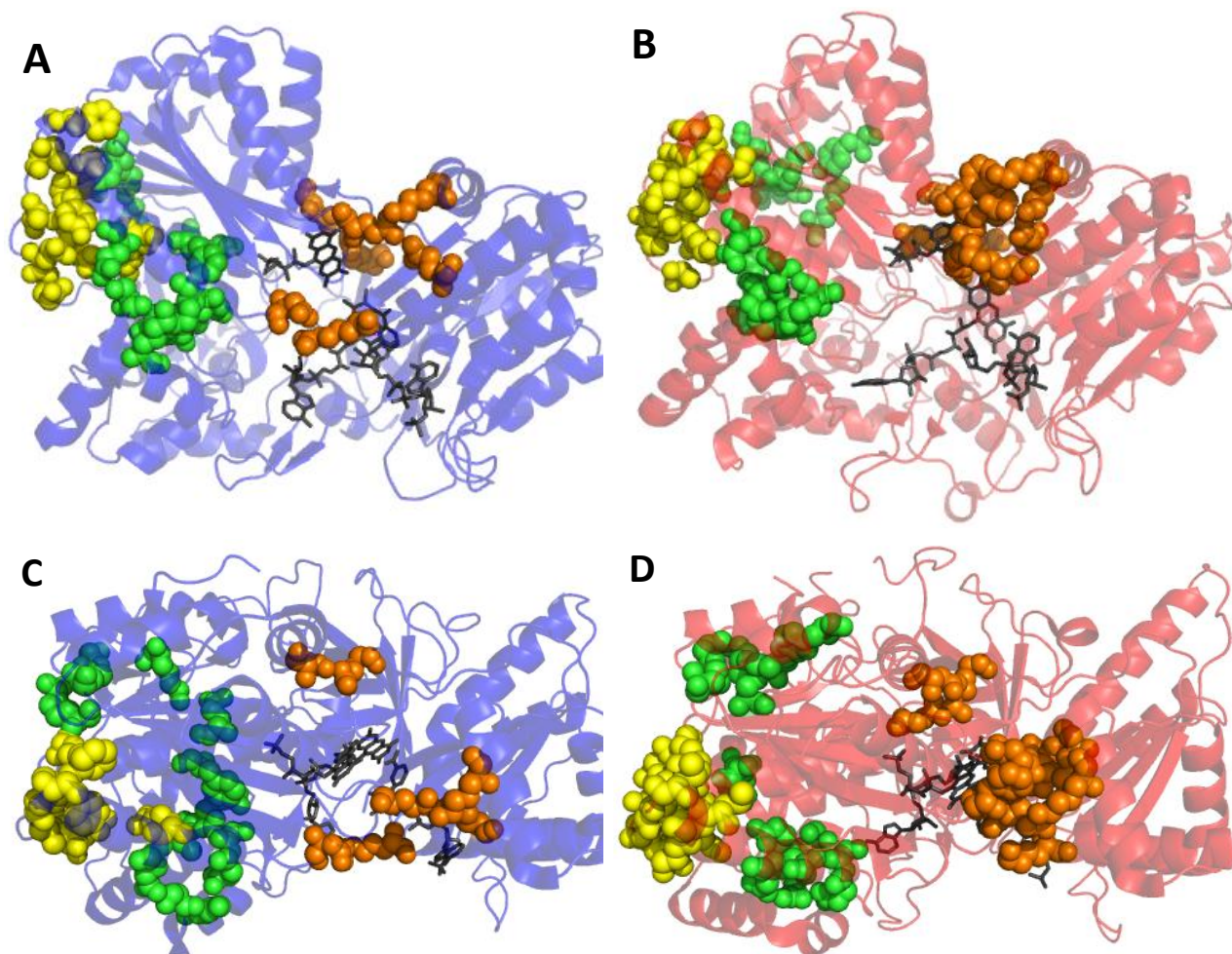


Figure 84 : Représentation des interactions interdomaines chez Rs qui sert de modèle pour Hs (A et C en bleu) et chez Ys (B et D en rouge) vue de face (A et B) et de dessus (C et D). Les interactions entre les différents domaines Hs et Ys peuvent se classer en trois groupes distincts : 1. les interactions entre les domaines FMN et le domaine FAD (résidus en orange), 2. les interactions entre le domaine FMN et le domaine de connexion (résidus en vert), et 3. Les interactions entre le domaine FMN et le linker reliant celui-ci au domaine de connexion (résidus en jaune).

Les différences entre les interfaces de Ys et Rs se localisent principalement au niveau de la zone 1. En effet, si le nombre d'interactions recensées dans les zones 2 et 3 est identique chez les deux CPR, il existe chez Ys 5 interactions absentes de la zone 1 de Rs. Globalement, les trois zones sont assez équivalentes entre elles avec 8 à 9 interactions par zone à l'exception de la zone 3 de Rs (4 interactions seulement). Au sein de chacune des zones, seule la zone 3 présente un nombre important d'interactions hydrophobes, tandis que les liaisons hydrogènes et les ponts salins sont assez bien répartis. Finalement, les interactions π -cations restent toujours assez rares (**Tableau 17**).

Pour comparer les surfaces d'interactions présentes chez l'une ou l'autre des CPR natives, nous avons mis au point une représentation en cercle (**Figure 85**). Ces cercles correspondent aux trois zones d'interfaces définies précédemment pour Ys et Rs. Seuls les résidus impliqués dans des interactions chez l'une ou l'autre des CPR sont inventoriés autour de ces cercles. Enfin, pour une zone d'interaction donnée, les résidus équivalents chez Ys et Rs, c'est-à-dire ayant la même position au niveau de leur structure cristallographique, ont le même positionnement à la périphérie du cercle. Les interactions sont symbolisées par une droite reliant les deux résidus concernés, et la couleur de ces lignes correspond à la nature de l'interaction. Les interactions hydrophobes, π -cation, les liaisons hydrogènes ou les ponts salins sont respectivement symbolisés en orange, vert, bleu et rouge.

Cette représentation permet de rapidement visualiser (**Figure 85 et Tableau 18**) :

- les interactions spécifiques à l'une ou l'autre des CPR (lignes épaisses) ;
- les interactions conservées chez les deux protéines (lignes fines) ;
- les interactions considérées comme équivalentes car ne correspondant pas exactement aux mêmes résidus chez Ys et Rs, mais à des résidus extrêmement proches (position et orientation des chaînes latérales) dans les deux structures (lignes discontinues).

Tableau 18 : Recensement des interactions conservées ou équivalentes chez Ys et Rs, ou bien spécifiques à l'une des CPR.

	Interactions	Total	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Ys	spécifiques	15	7	5	3
	conservées	6	2	1	3
	équivalentes	5	1	2	2
	Totales	25	9	8	8
Rs	spécifiques	8	1	5	3
	conservées	6	2	1	3
	équivalentes	5	1	2	2
	Totales	20	4	8	8

Grâce à ces observations, nous pouvons ensuite déterminer quelles interactions ont probablement été conservées ou perdues aux niveaux des interfaces entre domaines des chimères HYs et YHs lors de la substitution des domaines FMN. Les interactions dites équivalentes mettent en jeu chez l'une et l'autre de CPR parentales des résidus tellement proches qu'elles peuvent probablement encore se former au sein des CPR chimères. De la même façon, les interactions conservées devraient toujours exister au sein des chimères, tandis que les interactions spécifiques y sont probablement perdues.

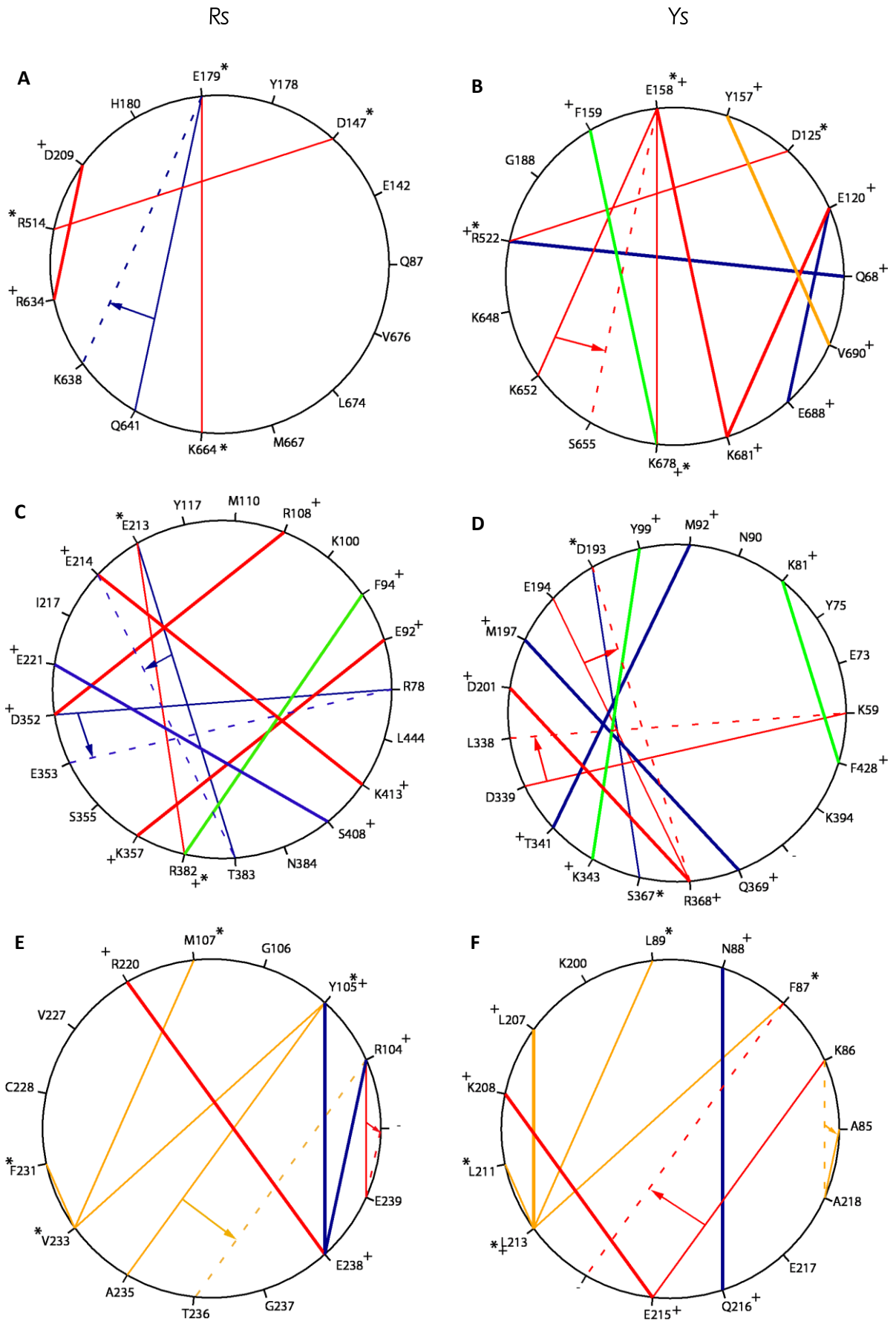


Figure 85 : Représentation des interactions entre les domaines des CPR de levure (Ys à droite) et de rat (Rs à gauche) utilisée comme modèle de la CPR humaine, Hs. Autour de chacun des cercles sont indiqués le type et le numéro des résidus impliqués dans des interactions chez l'une des deux CPR parentales. Les interactions de type hydrophobe sont en oranges, les liaisons hydrogènes sont en bleues, les ponts salins en rouge et les interactions π -cation sont en vert. Les interactions communes aux deux CPR parentales sont représentées par de fines lignes continues (et une étoile à côté des résidus concernés) tandis que celles spécifiques de l'une ou de l'autre des CPR sont marquées par des lignes plus épaisses (et une croix à côté des résidus concernés). Lorsqu'une interaction n'est pas tout à fait identique mais équivalente, c'est-à-dire mettant en jeu des résidus pas exactement analogues mais extrêmement proches au niveau de la structure des CPR, alors l'interaction équivalente chez l'autre CPR est indiquée sur le cercle de la première par des lignes discontinues et une flèche reliant les deux interactions équivalentes. Les cercles A et B représentent la zone d'interaction 1 correspondant à l'interface domaines FMN/FAD. Les cercles C et D représentent la zone d'interaction 2 correspondant à l'interface domaines de connexion/FMN. Les cercles E et F représentent la zone d'interaction 3 correspondant à l'interface domaines FMN/linker.

Comme Rs présente un nombre total d'interactions inférieur à Ys, 55 % des interactions de Rs et 45 % des interactions de Ys sont *a priori* conservées chez les chimères (**Figure 86** et **Tableau 18**). La zone la plus critique est à l'interface entre les domaines FMN et FAD qui ne conserve qu'une seule interaction (avec 2 interactions équivalentes). Cette interface semble *a priori* primordiale pour la stabilisation de la forme fermée des CPR, et la perte de pratiquement 90 % des interactions de la zone 1 de Ys et 75 % de celle de Rs caractérise bien la diminution de la reconnaissance entre les deux domaines catalytiques chez les chimères HYs et YHs. Par ailleurs, les interactions π -cations qui correspondent pourtant au type de liaisons le plus haut en énergie sont totalement perdues lors de la substitution des domaines FMN. La forme fermée de la CPR est donc significativement moins bien stabilisée chez les CPR chimères que chez les CPR parentales.

Si la perte de la reconnaissance entre les domaines catalytiques lors de la construction des chimères était bien sûr prévisible, cette analyse permet de mieux l'évaluer. La zone 3 correspondant à l'interface entre les domaines FMN et le linker est assez bien conservée chez les chimères comparées aux CPR parentales (> 60 % des interactions présentes chez Ys et Rs existent *a priori* encore chez HYs et YHs) (**Tableau 18**). On peut noter que cette zone met en jeu un grand nombre d'interactions hydrophobes ; l'exposition de ces résidus au solvant lors de l'ouverture de la CPR aurait donc un coût énergétique important et nuirait à la stabilité de l'ensemble. Ainsi, le linker qui semblait à première vue très flexible et peu structuré joue certainement un rôle majeur dans le contrôle de l'ouverture ou de la fermeture de la CPR en empêchant un éloignement trop important entre les domaines catalytiques qui diminuerait aussi drastiquement la probabilité d'un transfert interflavine. Bien que le linker ne possède pas de structure secondaire, le réseau d'interactions hydrophobes dans la zone 3 empêche son élongation complète.

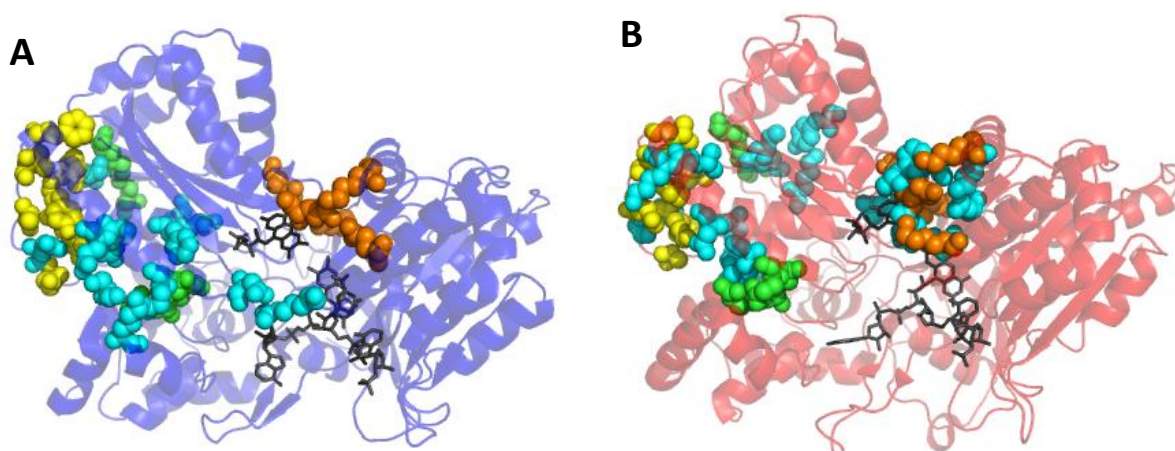


Figure 86 : Les interactions entre domaines de la CPR spécifiques à Hs (A) ou à Ys (B) représentent à peu près 50 % de la totalité des interactions. Ainsi la moitié de ces interactions permettant la reconnaissance des domaines et la stabilisation de la forme fermée a été perdue lors de la construction des chimères telles que YHs.

Lors de l'ouverture de YHs, toutes les interactions des zones 1 et 2 sont rompues à cause de la rotation du domaine FMN qui l'éloigne complètement des domaines de connexion et FAD. Par contre, au vu de la modélisation de la forme fermée de YHs, les interactions de la zone 3 sembleraient totalement conservées entre les deux géométries extrêmes de YHs (**Figure 88**). Cette constatation souligne à nouveau le rôle structurant du linker dont les interactions avec le domaine FMN sont probablement un des éléments clés du contrôle de la dynamique et du mouvement des domaines chez les CPR.

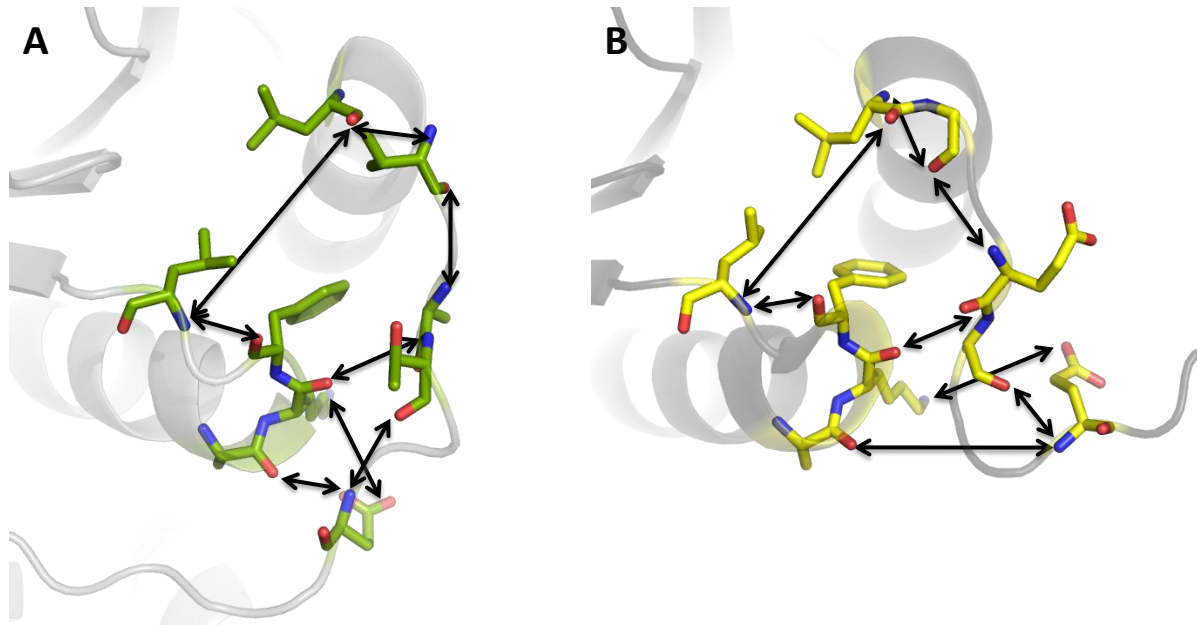


Figure 87 : Zone 3 d'interactions à l'interface du domaine FMN et du linker dans le modèle de YHs en conformation fermée (A), et dans la structure cristallographique ouverte de YHs (B). Les interactions sont symbolisées par des flèches et sont totalement conservées dans les deux conformations malgré le fait que des résidus s'éloignent ou se rapprochent lors du changement de géométrie de la CPR chimérique.

En conclusion, la majeure partie des interactions entre le domaine FMN et le linker se maintient entre les mouvements de fermeture et d'ouverture de la CPR. Seul un tiers des interactions à l'interface des domaines FMN et de connexion, et quelques interactions entre les deux domaines catalytiques sont conservées chez les CPR chimères ; ces quelques interactions se font et se défont au cours des mouvements de leurs domaines.

3. Caractère dynamique de la CPR et des diflavines réductases en général

3.1. Origine et contrôle des mouvements de domaines au sein de la CPR

Au cours de ma thèse, deux articles concernant le caractère dynamique de la CPR et les mouvements supposés de ces domaines ont été publiés par d'autres groupes de recherche. Premièrement Hamdane & *al.* ont rapporté un travail d'analyse biochimique et cristallographique de variants de Hs dont le linker avait été muté, allongé, ou encore raccourci (Hamdane et al., 2009). Leurs résultats sont proches de ceux obtenus par Grunau & *al.* (Grunau et al., 2007) (voir Introduction § 4.4) concernant des mutants de Hs possédant un linker plus court ou plus rigide (poly-prolines). Il ressort de ces deux études que si l'allongement de quelques résidus du linker n'est en rien défavorable à l'activité et à la vitesse de transfert de la CPR, sa rigidification ou son

raccourcissement deviennent rapidement critiques. Dans les deux cas, les mutants délétés de 7 et 4 résidus au cœur du linker ne sont plus capables de transférer des électrons au cytochrome P450 et présentent un cinétique de réduction du cyt c 50 à 200 fois plus lente que Hs native. La perte d'activité chez ces variants est due au ralentissement de leur transfert interflavine. Visiblement, une longueur minimum du linker est requise pour le bon fonctionnement de la CPR. Ce phénomène a également été noté chez la NOS (Haque et al., 2007) et est parfaitement cohérent avec l'importance des interactions entre le domaine FMN et le linker décrite dans le paragraphe précédent (voir § 2.2).

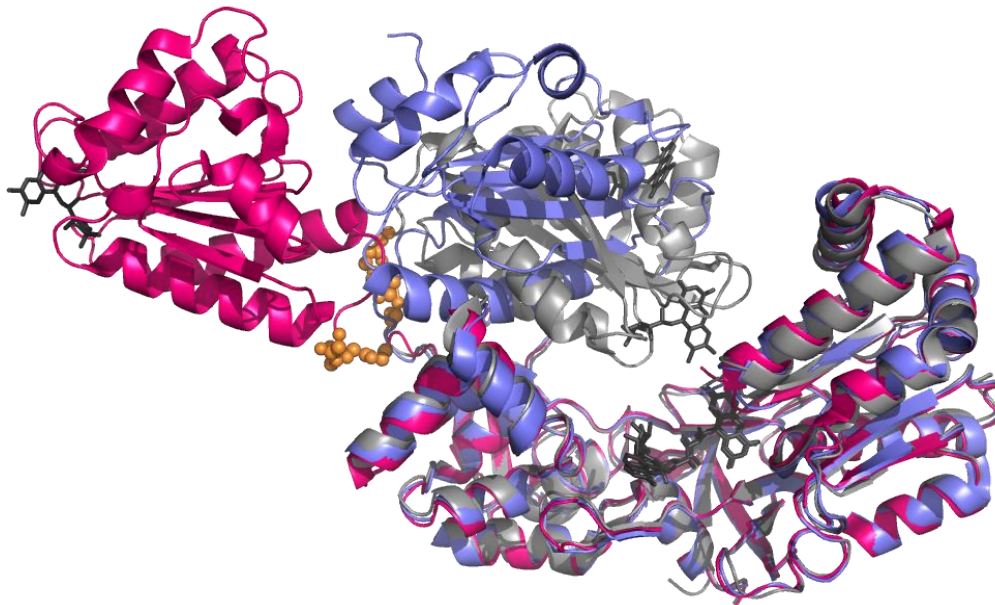


Figure 88 : Aligement sur les domaines FAD des structures fermée de Rs (1J9Z, (Wang et al., 1997)) en gris, partiellement ouverte d'un mutant de Hs (3SE9, (Hamdane et al., 2009)) en bleu et totalement ouverte de la chimère YHs (3FJO, (Aigrain et al., 2009)) en rose. Les résidus TGEE absents du linker dans le mutant de Hs sont indiqués sur les autres structures en orange.

Hamdane & al. présentent aussi la structure cristallographique du mutant délété de 4 résidus dans trois conformations différentes (Hamdane et al., 2009). Mais si dans les trois formes, les domaines de connexion et FAD sont bien résolus et correspondent à la structure fermée déjà connue des CPR, les domaines FMN sont peu, voir pas du tout visibles (3ES9). Dans la structure où le domaine FMN est encore visible et qui correspond à celle la moins ouverte, ce domaine FMN subit des contraintes structurales dues à une plus grande tension dans le linker qui conduisent à un début de dépliement du domaine (**Figure 88**). L'ouverture partielle de la structure de ce mutant est plus certainement due à une moins grande flexibilité du linker qui empêche le domaine FMN d'aller s'insérer au creux des domaines de connexion et FAD, réduisant justement le caractère dynamique de la protéine pourtant nécessaire aux transferts internes et externes.

La seconde étude concernant la dynamique de la CPR a également été publiée en 2009. Ellis & al. ont caractérisé différentes conformations de la CPR humaine suivant son état d'oxydoréduction en couplant des données de RMN et de SAXS (Ellis et al., 2009). Dans l'état oxydé, l'enveloppe ou la forme générale de Hs identifiée par SAXS correspondrait selon les auteurs à une moyenne entre deux conformations en ratio équimolaire, l'une compacte comme les structures cristallographiques en conformation fermée, et l'autre plus étendue mais pas aussi ouverte que YHs. L'addition de NADPH sur Hs conduit à sa réduction totale et modifie alors complètement cet équilibre conformationnel

avec un ratio entre les formes fermées et partiellement ouverte de 85 :15 (au lieu de 50 :50 pour Hs oxydée).

Ces résultats de SAXS soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle la fixation du ligand NADPH et/ou le transfert d'hydrure stabiliserait la forme fermée de la CPR afin de favoriser le transfert interflavine consécutif. La séparation du complexe CPR réduite-NADP⁺ permettrait au contraire l'ouverture de la CPR. Par ailleurs, les analyses RMN ont permis la comparaison du spectre du domaine FMN de Hs (Zhao et al., 1999) avec celui de la CPR soluble entière, toujours à l'état oxydé. Les résidus du domaine FMN qui subissent des modifications conformationnelles dues à la présence du reste de la protéine ont ainsi été identifiés. Il s'agit entre autres des acides aminés entourant la molécule de FMN (résidus 85 à 93) (Ellis et al., 2009), ce qui semble assez logique au vu de la structure fermée de Rs. Mais les auteurs sont également étonnés de détecter des modifications au niveau des résidus 212 à 231 assez éloignés des cofacteurs. Or ce sont ces mêmes résidus que nous avons identifiés comme faisant partie de la zone d'interaction 3 entre le domaine FMN et le linker et qui permettent à cette boucle de contrôler, malgré sa flexibilité, les mouvements du domaine FMN.

L'ensemble des recherches de ces dernières années concernant les mouvements de domaines au sein de la CPR soutiennent l'idée selon laquelle ces réarrangements conformationnels seraient dictés ou tout au moins influencés, par la présence de NADPH et/ou l'état rédox de ses cofacteurs. Nos résultats vont d'ailleurs également dans ce sens puisque la forme ouverte de YHs constitue la première structure de CPR obtenue en l'absence de NADP⁺, tandis que toutes les structures précédemment publiées (Lamb et al., 2006; Wang et al., 1997) contenaient du NADP⁺ et correspondaient à des formes fermées. Nous avons d'ailleurs effectué des tests afin d'introduire du NADP⁺ au sein de nos cristaux de YHs et de suivre ainsi les modifications conformationnelles probables qui en découleraient. Mais lors de ces expériences, les cristaux se sont systématiquement brisés. Ce phénomène peut être simplement dû à l'ajout de la solution contenant le NADP⁺ qui conduirait à la re-solubilisation de la protéine. Mais on peut également imaginer que si la fixation du ligand entraîne des modifications structurales, alors la maille cristalline ne peut y résister. Par ailleurs, les travaux de Grunau & al. démontrent que des modifications du linker, à plus de 60 Å du site de fixation du NADPH, affectent l'affinité de Hs pour ce ligand (Grunau et al., 2007). Il existe donc probablement un réseau reliant le site de fixation du ligand dans le domaine FAD au domaine FMN via le linker, et permettant de transmettre un certain type d'information tel que la présence de NADPH ou l'état rédox du FAD. Mais si ces dernières études ont prouvé l'implication du linker dans cet échange d'information, le rôle du domaine de connexion lui-même n'a pas encore pu être bien caractérisé.

3.2. YHs, la première structure ouverte d'une diflavine réductase

L'étude des CPR chimères HY et YH effectuée au cours de ma thèse correspond à la première caractérisation fonctionnelle et structurale des mouvements de domaines d'une protéine de la famille des diflavines réductases. En effet, des analyses de la CPR avaient auparavant suggéré l'existence de mouvements des domaines au sein de la CPR soit (i) au travers d'études du comportement biochimique de CPR natives et de variant (Garnaud et al., 2004; Grunau et al., 2007; Gutierrez et al., 2002), soit (ii) via la comparaison des structures cristallographiques de domaines isolés (Zhao et al., 1999) avec la forme fermée de la CPR (Lamb et al., 2006; Wang et al., 1997). De la même façon, les mouvements des domaines FMN et FAD, indispensables au bon fonctionnement

d'autres diflavines réductases telles que la NOS (Garcin et al., 2004; Ilagan et al., 2008; Welland et al., 2008), avaient pu être caractérisés grâce à (i) des analyses cinétiques pointues des transferts électroniques au sein de ces enzymes, de leurs propriétés électrochimiques, ou encore de variant ; soit grâce à (ii) la résolution partielle (domaine FAD) de la structure de la SiR (Gruetz et al., 2000) ou la MSR (Wolthers et al., 2007). Mais YHs constitue la première diflavine réductase active à avoir cristallisé dans une conformation différente de la conformation fermée connue jusqu'alors pour l'ensemble des diflavines réductases natives, et dont la baisse d'activité est due à une diminution du transfert interne entre le FAD et le FMN.

Si une hypothèse scientifique est rarement prouvée ou totalement réfutée en une seule expérience, le faisceau de résultats cités précédemment permet d'affirmer que non seulement les diflavines réductases subissent des mouvements de domaines, mais que la nécessité fonctionnelle et les trajectoires de ces mouvements sont certainement communes aux différentes protéines de cette famille. La fonction de navette du domaine FMN qui transporte les électrons du domaine FAD à l'accepteur final se traduit physiquement par un mouvement de va-et-vient entre ces deux partenaires.

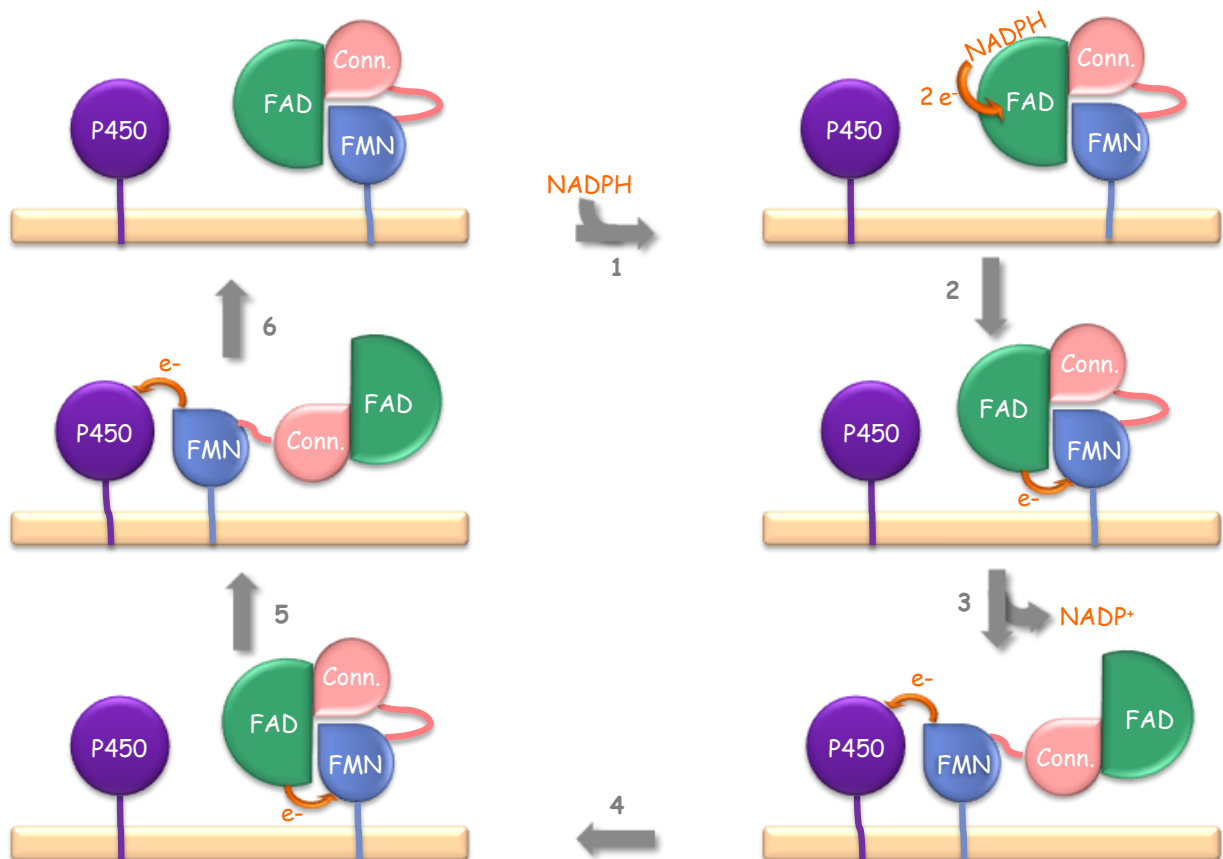


Figure 89 : Mouvements des domaines des diflavines réductases membranaires, et plus spécifiquement de la CPR, au cours de leur cycle catalytique. L'accepteur final, ici un cytochrome P450 également membranaire, est représenté en violet, les domaines FMN, linker-connexion, et FAD sont respectivement en bleu, rose et vert et la membrane est symbolisée en beige. La fixation du ligand NADPH se fait sur la forme fermée de l'enzyme (0 ou 1 électrons suivant l'organisme d'origine et la stabilité de la semiquinone du cofacteur FMN) qui autorise, après réduction du FAD, le transfert interne direct entre le FAD et le FMN (2 ou 3 électrons sur la CPR). La libération du NADP+ favorise l'ouverture de la protéine et permet ainsi l'approche du cytochrome P450 qui peut alors recevoir les électrons provenant du FMN, et jusque là inaccessible (plus que 1 ou 2 électrons sur la CPR). La fermeture de la CPR autorise le second transfert interne avant une dernière réouverture et un dernier transfert externe (retour à l'état rédox initial à 0 ou 1 électron).

Concernant la CPR, il faut garder à l'esprit que cette protéine est de nature membranaire (tout comme la eNOS) au travers de son extrémité N-terminale, c'est-à-dire son domaine FMN, par laquelle elle s'ancre à la membrane du réticulum endoplasmique. Comme cette partie membranaire est tronquée lors des études structurales pour faciliter la cristallo-genèse, les mouvements des domaines catalytiques sont souvent présentés dans les figures des articles comme étant ceux du domaine FMN, plus petit, vis-à-vis des domaines de connexion et FAD. Mais ces mouvements concernent en réalité plus probablement la partie C-terminale de l'enzyme qui est bien moins contrainte puisque reliée uniquement via un linker au domaine FMN. Le mécanisme d'une CPR s'apparente donc probablement à celui proposé par *Iyanagi & al.* et présenté en **Figure 89**.

4. Interfaces, linker, et domaine de connexion

L'étude de la CPR en tant que protéine multidomaine nous renseigne sur plusieurs interrogations soulevées dans l'introduction de ce manuscrit. Nous avons en effet vu la difficulté de définir la notion de domaine protéique d'une façon claire et commune aux différents domaines de la biologie. Nous avons nommé domaine « une chaîne polypeptidique, continue ou non, formant une unité structurale compacte, possédant une fonction spécifique au sein de la protéine, mais pas obligatoirement à l'état isolé, et dont la structure, à défaut de séquence, est particulièrement conservée ». Cette définition très générale nous a assuré une certaine sécurité lors de la chimérogénèse et de la délimitation des domaines de la CPR, car les domaines ainsi identifiés sont *a priori* interchangeables à partir du moment où l'architecture globale de la protéine multidomaine est conservée. Et le fait même que nos chimères de CPR soient bien actives, et que leur domaine garde un repliement identique à celui des protéines parentales, prouve la justesse de cette définition.

L'analyse de protéines multidomaines chimériques a aussi révélé l'importance des interfaces entre les domaines, chacune correspondant en réalité à un élément de la protéine. En d'autres termes, les interfaces doivent être considérées comme des entités composant une protéine au même titre que les domaines. Ces entités ont des propriétés particulières, variant selon leur rôle (interface interne entre domaines d'une même protéine, interface externe entrant en interaction avec d'autres protéines) et leur nature (type d'interactions mises en jeu) et peuvent être conservées, modifiées ou détruites lors d'expériences d'ingénierie des protéines. Ce sont bien sûr ces interfaces qui ont été modifiées lors de la construction de nos chimères de CPR, et nous avons ainsi constaté que l'incompatibilité ou la baisse de reconnaissance au niveau de ces interfaces peuvent diminuer l'activité de la protéine.

Concernant le domaine de connexion lui-même, les interactions entre celui-ci et le domaine FMN (zone 2 d'interface) ont été conservées à plus de 35 % (**Tableau 18**). Ceci a certainement permis la cristallisation de YHs dans une conformation nouvelle (ouverte), sans pour autant couper toute communication entre les deux domaines catalytiques chez les chimères de CPR. Bien que dans cette conformation ouverte, seules les interactions de la zone 3 (domaine FMN/linker) soient visiblement maintenues, le réseau d'interactions de la zone 2, dont un tiers est sauvegardé au sein des chimères, permet certainement la fermeture de celles-ci lors des transferts internes. Le rôle supposé du domaine de connexion des diflavines réductases qui serait une charnière physique autorisant la fermeture ou l'ouverture des protéines n'a pas pu être confirmé puisqu'une réorganisation conformationnelle entre les deux formes de la CPR n'est pas détectable au niveau de ce domaine. Mais les interfaces que celui-ci entretient avec le reste de la CPR sont par contre apparues comme un

élément essentiel du fonctionnement de la protéine multidomaine. On ne regarde plus ici le domaine de connexion comme une entité pouvant changer complètement de forme entre deux états ouvert et fermé, mais plutôt comme un élément juste assez « jointif » pour stabiliser la forme fermée sans pour autant empêcher l'ouverture à une étape du cycle catalytique. La perte et le gain d'un petit nombre d'interactions, en réponse à des changements conformationnels minimes à l'échelle non pas des domaines mais des résidus (dus par exemple à la fixation du NADPH), permettent probablement de basculer d'un côté ou de l'autre de l'équilibre entre les formes fermées et ouvertes de la CPR. Par ailleurs, il est toujours possible que les hélices du domaine de connexion subissent réellement des mouvements lors du passage d'une conformation à l'autre, mais nos résultats démontrent que ce domaine adopte la même structure dans les deux états extrêmes. Et malgré la faible résolution des structures, Hamdane & *al.* (Hamdane et al., 2009) ne détectent aucune modification au sein du domaine de connexion dans les trois conformations *a priori* intermédiaires entre la première conformation totalement fermée et notre conformation très ouverte.

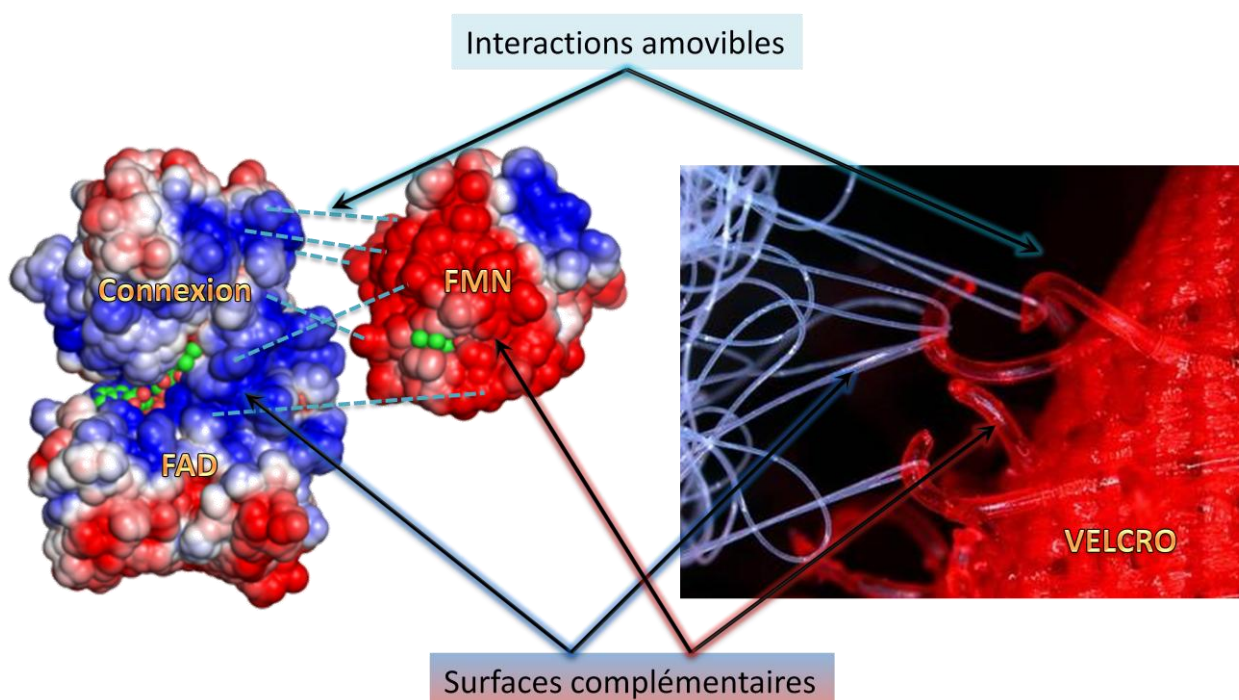


Figure 90 : La reconnaissance des domaines met en jeu deux phénomènes : un mode d'interaction constant qui est la compatibilité des surfaces (surface complémentaires, géométrie...) et des interactions amovibles qui autorisent une certaine flexibilité et liberté de mouvement. La figure ci-dessus fait l'analogie entre la reconnaissance des domaines de la CPR à gauche et l'interaction entre deux bandes Velcro à droite.

Une nouvelle vision des domaines et de leur interface nous est alors offerte. Le réseau d'interactions permettant la reconnaissance des domaines et leur affinité les uns pour les autres pourraient facilement se faire et se défaire dès lors que quelques unes de leurs interactions sont perdues. D'autres modes de reconnaissance plus « constants » ne dépendent pas de la géométrie adoptée par les domaines. Il peut s'agir de la géométrie des partenaires ou encore des charges à leur surface. Nous avons par exemple analysé la conservation des potentiels de surface chez les composants des systèmes P450 qui favorisent la reconstitution des interactions spécifiques entre les différents partenaires après une ouverture ou dissociation du système. Si l'on compare en effet l'interface entre les domaines FMN/connexion de la CPR et celle entre la ferrédoxine réductase et la flavodoxine, la surface et le nombre des interactions (zone 2) sont pratiquement perdus dans le

second complexe. Le domaine de connexion correspondrait en réalité à une surface de liaisons amovibles, comme une bande « Velcro » (**Figure 90**), augmentant l'affinité entre les partenaires.

5. Perspectives

Le travail effectué au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Protéines Membranaires durant ces années de thèse, ainsi que les recherches réalisées dans d'autres groupes, ont confirmé le caractère dynamique de la CPR et des protéines de la famille des diflavines réductases en général. Il ne s'agit ici pas seulement de mouvements ponctuels, à l'échelle d'un résidu ou d'un site de fixation, mais de larges déplacements de domaines entiers, la structure même de ces domaines est par ailleurs *a priori* parfaitement conservée au cours de ces mouvements, ou du moins dans les deux conformations extrêmes. Ces résultats permettent également de mieux cerner les facteurs ou paramètres pouvant influencer, voir même dicter cette dynamique. Il existe chez d'autres diflavines réductases telles que les NOS des motifs structuraux (queue C-terminale, site de fixation de la CaM, boucle d'auto-inhibition, et β -fingers), absents de la CPR, et jouant explicitement des rôles de régulateurs d'activité en contrôlant notamment le positionnement du domaine FMN vis-à-vis de ses partenaires. On peut alors se demander si, en l'absence de motifs régulateurs visibles, la CPR ne subit pas des mouvements aléatoires entre les formes ouverte et fermée, prenant des électrons lorsque la source électronique se fixe, et les transférant au premier accepteur externe venu. Or non seulement un tel fonctionnement serait extrêmement peu efficace (fuites d'électrons), mais par ailleurs la fixation du ligand NAD(P)H et/ou la réduction du cofacteur FAD stabilisent la forme fermée de la CPR. Les mouvements de domaine de cette réductase, bien que moins contrôlés que ceux de la NOS, ne semblent donc pas non plus totalement aléatoires. Finalement, il se peut que des éléments protéiques ou des facteurs externes de régulation n'aient pas encore été identifiés. Ceux-ci pourraient peut-être expliquer le rôle du domaine de connexion qui reste encore incompris.

Les développements futurs de ce travail viseront probablement l'étude directe de la dynamique de la CPR en utilisant des méthodes d'analyses spécifiques telles que le FRET, la RMN hétéronucléaire ou encore le SAXS. Nous avons tenté au cours de ce travail de développer une stratégie de marquage des différents domaines de la CPR par des fluorophores distincts, afin de suivre la distance moyenne entre les domaines catalytiques en fonction du potentiel d'oxydoréduction ou de la présence de tel ou tel facteur (NAD(P)H, accepteurs...). La technique d'expression et de purification séparées des domaines via une fusion avec des intéines n'a malheureusement pas abouti. Quoiqu'il en soit, d'autres stratégies alternatives sont actuellement développées au laboratoire, telles que l'introduction d'acides aminés non naturels autorisant le marquage sélectif des domaines pour des mesures de FRET. Par ailleurs, des expériences de SAXS dans des conditions d'anaérobiose autorisant l'imposition d'un potentiel d'oxydoréduction spécifique à la solution protéique analysée, devraient permettre de suivre l'évolution de l'enveloppe globale de la CPR en fonction de son état rédox et de la présence d'autres cofacteurs. Finalement, des études de RMN hétéronucléaire seraient applicables à la CPR malgré sa taille, si elles se focalisent sur les modifications structurales au niveau des interfaces entre les domaines qui sont justement représentatives de l'état conformationnel général de l'enzyme.

La collaboration fructueuse avec le Laboratoire d'Enzymologie et de Biologie Structurale (CNRS – Gif-sur-Yvette), qui nous a permis de résoudre la structure de la CPR chimère YHs dans une conformation jusqu'alors inconnue, continue également. Le projet principal vise à co-cristalliser cette

CPR avec un cytochrome P450 afin de valider l'hypothèse selon laquelle une forme ouverte de la CPR correspond bien la conformation de la protéine dans le complexe bimoléculaire de transfert d'électrons. En effet, la structure du domaine FMN isolée du P450-BM3 co-cristallisée avec le cytochrome P450 lui-même (Sevrioukova et al., 1999b) n'est pas compatible avec les formes fermées de la CPR ; l'alignement des domaines FMN dans les deux structures conduisant à un recouvrement (clash) entre le domaine FAD de la CPR fermée et le cytochrome P450. Par contre, l'alignement de notre forme ouverte de YHs avec le domaine FMN du complexe P450-BM3 est tout à fait compatible (**Figure 91**). Mais si cet alignement n'est pas une preuve en soi de la structure du complexe cytochrome P450/CPR, leur co-cristallisation dans une conformation analogue serait bien plus probante.

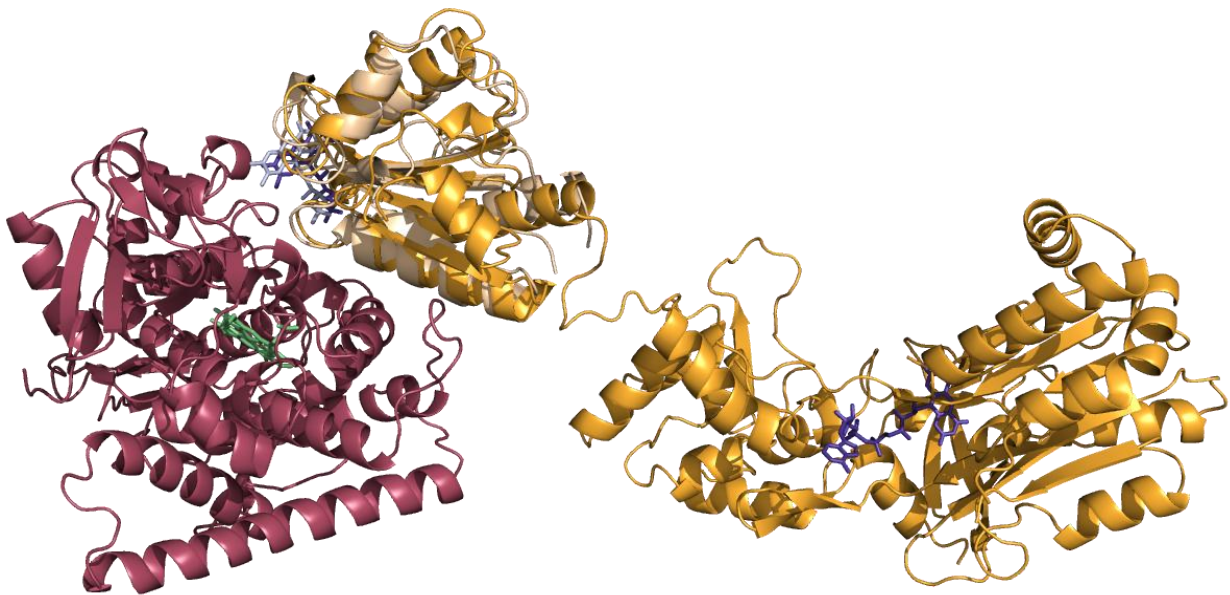


Figure 91 : Alignement des structures du complexe cytochrome P450-BM3/domaine FMN (Sevrioukova et al., 1999b) (1BVY) et de YHs (3FJO). Le cytochrome P450 est en rouge et son cofacteur hémique en vert. YHs en orange avec les cofacteurs flaviniques en bleu, et le domaine FMN co-cristallisé avec le cytochrome P450 est en beige avec la molécule de FMN en bleu clair.

Par ailleurs, il serait très intéressant d'utiliser notre analyse des zones d'interactions entre les domaines chez les CPR parentales et YHs pour tenter de construire des révertants chimériques adoptant préférentiellement une conformation fermée. Il s'agirait plus précisément de réintroduire par mutagenèse dirigée les acides aminés impliqués dans des interactions spécifiques à l'une ou l'autre des CPR parentales, ces interactions ayant été perdues lors de la construction des chimères. Une étude structurale et/ou dynamique de tels révertants confirmerait ou infirmerait le rôle des interactions identifiées dans la stabilisation de la forme fermée adoptée par les CPR natives.

A plus long terme, il serait intéressant de suivre les mouvements des domaines de la CPR en temps réel au cours de son cycle catalytique. Les méthodes d'analyses sur molécule unique sont particulièrement appropriées à ce type de recherche car elles permettent de s'affranchir des problèmes de moyennage dus à l'absence de synchronisation entre les molécules d'une solution qui diminuent le caractère informatif des mesures effectuées. En appliquant ces techniques à l'étude de protéines multidomaines ou de complexes multiprotéines, il devient alors possible d'analyser le positionnement de différentes entités structurales les unes par rapport aux autres, et d'en suivre l'évolution. Mais de telles expériences nécessitent non seulement des outils de mesure et d'analyse spécifiques, mais aussi une préparation des échantillons complexe et délicate. Quoi qu'il en soit, ces méthodes permettant de suivre le comportement d'une molécule au cours du temps font

certainement partie des outils les plus appropriés pour l'analyse dynamique de protéines. Le développement des méthodes d'analyse citées plus haut approfondira notre compréhension des mécanismes dynamiques au cours des cycles catalytiques des CPR mais également des diflavines réductases en général. La description des événements moléculaires à l'origine des mouvements de domaines dans ces protéines redox et leurs conséquences en termes de géométrie globale devrait également s'appliquer à d'autres protéines multidomaines.

Depuis quelques années, les protéines multidomaines ne sont plus perçues comme des blocs figés mais plutôt comme des assemblages dynamiques d'éléments, de motifs ou de domaines. Comprendre les interconnexions et les réseaux de communications entre ces entités protéiques, c'est avancer d'un pas dans la résolution des phénomènes régissant le fonctionnement de ces protéines. Ce travail a approfondi notre compréhension du mode d'action des systèmes de transport d'électrons au P450. Nos résultats valident l'hypothèse selon laquelle la CPR est une protéine dynamique dont la réorganisation conformationnelle, à l'échelle des domaines, contrôle son cycle catalytique et son interaction avec ses partenaires redox. La construction et l'analyse de protéines multidomaines chimériques a confirmé le rôle important des interfaces qui, à mon sens, constituent un élément descripteur des protéines au même titre que les domaines. Notre étude n'a pas encore répondu aux nombreuses interrogations concernant le rôle exact du domaine de connexion dans le contrôle de la géométrie de la CPR et, comme c'est souvent le cas dans la recherche, ont suscité de nouvelles questions.

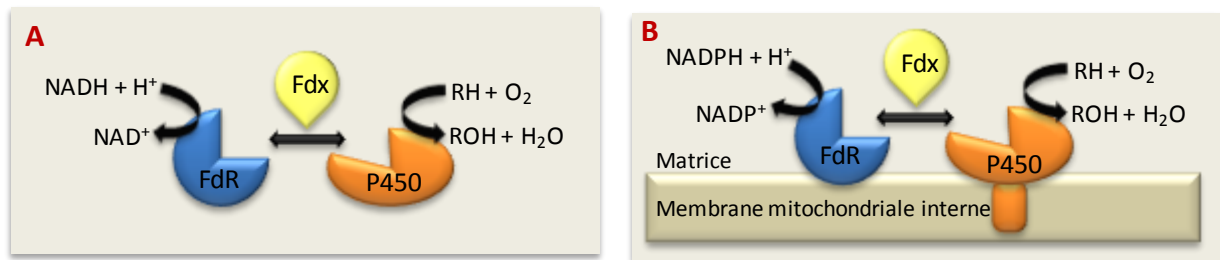
*Oh teachers are my lessons done?
I cannot do another one.
They laughed and laughed and said « Well child,
Are your lessons done? »*

*« Teachers »
Leonard Cohen*

ANNEXES

1. Classement des systèmes de transport d'électrons au P450

Classe I



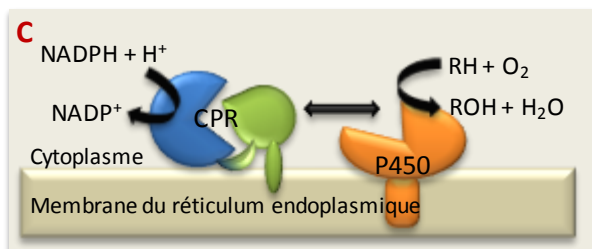
La classe I des systèmes P450 comprend la plupart des cytochromes bactériens, ainsi que ceux se trouvant dans les mitochondries eucaryotes. Malgré leur éloignement au niveau phylogénétique, les deux sont composés des trois protéines isolées : une ferrédoxine réductase, comprenant un cofacteur FAD et transférant les électrons provenant d'un nucléotide pyridine (NADPH ou NADH) à une ferrédoxine qui joue alors le rôle de transporteur. Mais tandis que les systèmes bactériens sont totalement solubles, tous les composants des systèmes eucaryotes sont ancrés à la membrane interne de la mitochondrie à l'exception de la ferrédoxine.

Le prototype du système P450 bactérien est le P450cam de *Pseudomonas putida* dont le cytochrome (CYP101, EC 1.14.15.1) catalyse la première étape de la dégradation du D-camphre afin d'utiliser cette molécule comme source de carbone (Omura, 2010). La flavoprotéine du système, la putidarédoxine réductase, est strictement NADH dépendante de part l'absence des quelques résidus spécifiques de la séquence de fixation du NADPH. La protéine à centre fer-soufre, la putidarédoxine, fait partie des ferrédoxines à cluster [2Fe-2S].

Chez les mammifères, les P450 mitochondriaux prennent en charge la biosynthèse d'hormones stéroïdes dérivées du cholestérol, de la vitamine D, ou encore d'acides biliaires. D'autres P450 mitochondriaux ont également été identifiés chez des insectes et des nématodes, mais ils semblent absents du règne végétal.

Classe II

Les systèmes P450 de classe II sont majoritaires chez les eucaryotes. Ils catalysent des réactions extrêmement diverses. Chez les mammifères, ils sont responsables autant du métabolisme oxydatif de composés endogènes (acides gras, stéroïdes...) qu'exogènes (médicaments, polluants ou carcinogènes). Chez les champignons et les plantes, ils prennent part au métabolisme secondaire de composants liposolubles impliqués dans la protection cellulaire.

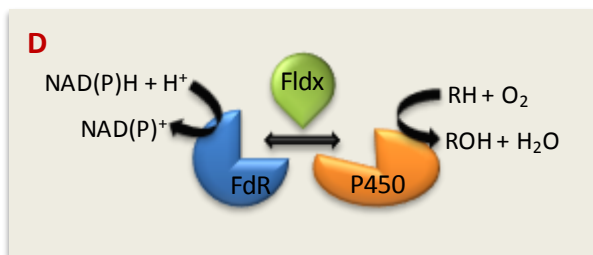


Ces systèmes monooxygénases de classe II sont ancrés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et présentent un premier cas de fusion entre deux de leurs composants. Ainsi la totalité du système de transport d'électrons est prise en charge par une unique protéine, la NADPH-cytochrome P450 réductase (CPR) qui réunit deux domaines catalytiques, correspondant à l'oxydoréductase et au transporteur et contenant les

cofacteurs FMN et FAD respectivement. La CPR, et dans certains cas le *cyt b₅*, sont capables de transférer les électrons nécessaires à de nombreux izoenzymes. Une description plus détaillée de ce partenaire rédox est présentée dans le chapitre 4.

A côté de l'abondance de systèmes eucaryotes, un seul système procaryote de classe II a été identifié. Il se compose du P450sca et d'une réductase NADH-dépendante contenant également un FAD et un FMN. Cette monooxygénase soluble catalyse l'hydroxylation d'un inhibiteur sélectif de la biosynthèse du cholestérol.

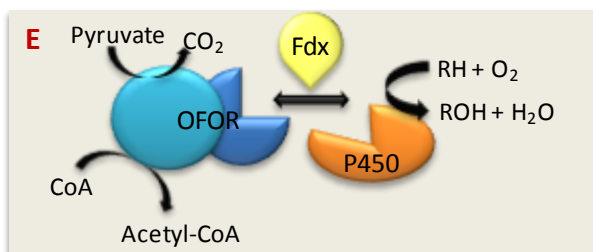
Classe III



La classe III des systèmes P450, découverte en 2002, est une combinaison des deux classes précédemment présentées. En effet, ces systèmes ressemblent grandement aux systèmes bactériens classiques de part leur structure en trois composants distincts dont une oxydoréductase NAD(P)H dépendante à

cofacteur FAD de type ferrédoxine réductase. Le transporteur est pourtant différents de celui des systèmes de classe I (centre fer-soufre), car il s'agit ici d'une flavodoxine ; par exemple, de la cindoxine dans le cas du P450cin de *Citrobacter braakii*. Les électrons provenant du NADPH transitent donc par deux flavines, respectivement FAD et FMN, comme c'est le cas dans les systèmes de classe II avec la CPR.

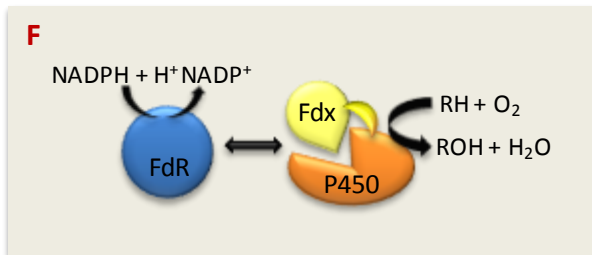
Classe IV



Cette classe renferme des systèmes P450 issus d'organismes extrêmophiles tels que les archées acidothermophile *Sulfolobus solfataricus* ou *Thermus thermophilus*. Les cytochromes P450 y sont plus petits (~370 résidus pour 400 en moyenne dans les autres systèmes) et présentent des stabilités

extraordinaires vis-à-vis de la température ($T_M > 90^\circ\text{C}$) et de la pression (jusqu'à 200 MPa). Ces propriétés seraient principalement dues à une grande quantité de ponts salins, à un packing plus dense des chaînes latérales, et à la présence de clusters aromatiques absents des structures de P450 mésophiles. Quant aux partenaires rédox de ces systèmes encore assez méconnus, le cytochrome CYP119 de *S. Solfataricus* obtiendrait ses électrons via une ferrédoxine et une ferrédoxine oxydoréductase. Il s'agit donc du premier système identifié ne recevant pas ses électrons d'une flavoprotéine NAD(P)H-dépendante.

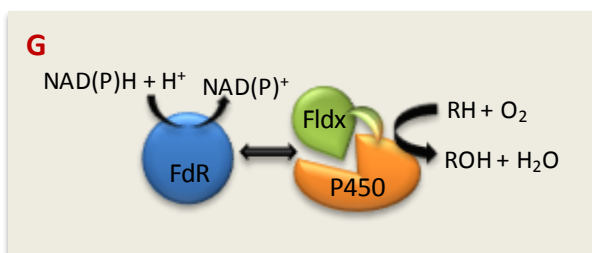
Classe V



Ces systèmes, tout comme ceux de classe II, présentent une fusion entre certains composants. Dans ce cas, il ne s'agit pas de la fusion des composants oxydoréductase et transporteur, mais du rapprochement du transporteur avec le cytochrome lui-même. Ainsi les deux protéines des systèmes de classe V sont

d'une part une réductase NAD(P)H dépendante encore très mal caractérisée, et d'autre part une protéine multidomaine correspondant à la fusion d'un P450 et d'une ferrédoxine.

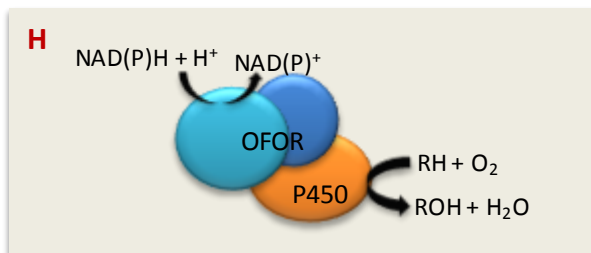
Classe VI



Comme précédemment, les systèmes de classe VI présentent une fusion du transporteur et du P450. Mais dans ce cas ci, le cytochrome est relié à une flavodoxine. L'oxydoréductase étant également une flavoprotéine NAD(P)H dépendante, les électrons transitent via un FAD puis un FMN, avant de réduire le P450, tout

comme chez les systèmes de classe II et III. Le premier exemple de cette nouvelle classe de système est le XlpA de *Rhodococcus rhodochrous* qui permet la dégradation de l'explosif militaire très communément employé, le hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine ou RDX.

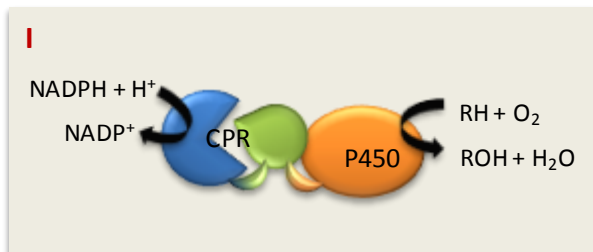
Classe VII



Ce système bactérien constitue une classe complètement nouvelle de P450. Par une organisation structurale unique, le cytochrome P450 y est fusionné par son extrémité C-terminale au domaine oxydoréductase, normalement séparé de l'accepteur final par le composant transporteur. Ce dernier présente

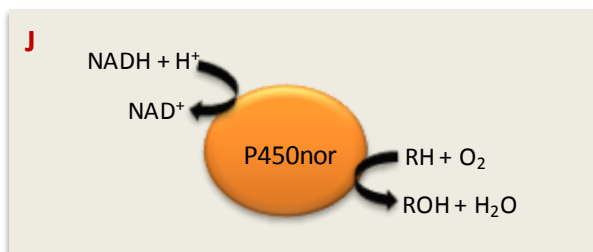
plus de 40 % d'homologie de séquence avec la sous-unité réductase de la famille des phthalate dioxygénases (PFOR) (Munro et al., 2007). Elle est relié au P450 par un connecteur de 16 résidus, et comprend trois domaines distincts : un domaine fixant le FMN, un autre fixant le NADH, et un domaine ferrédoxine à centre [2Fe-2S]. Les électrons provenant du pyridine nucléotide sont transmis non pas par une molécule de FAD, comme c'est le cas dans d'autres classes de P450, mais par le FMN du domaine réductase. Les électrons sont ensuite transférés au cluster fer-soufre avant de réduire le cytochrome. Ni le substrat naturel du P450RhF, premier membre de la classe VII des systèmes P450, ni son rôle physiologique n'ont encore pu être déterminés.

Classe VIII



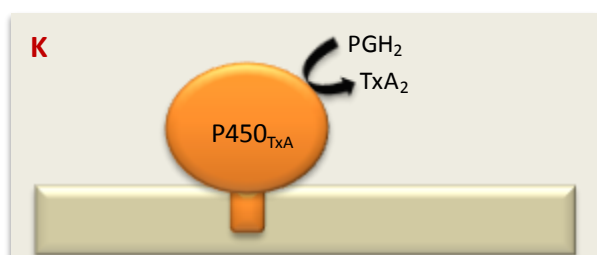
Le membre de la classe VIII (initialement décrite comme la 3^{ème} classe, (Narhi and Fulco, 1986) le plus intensément étudié est le flavocytochrome cytosolique CYP102A1, mieux connu sous le nom de P450-BM3, qui catalyse d'hydroxylation d'acides gras, et qui est issu de la bactérie *Bacillus megaterium*. Le système entier correspond alors à une unique protéine multidomaine correspondant à la fusion d'une CPR et d'un cytochrome P450 (Munro et al., 2007). De par sa structure unitaire, et parce que sa structure cristallographique du domaine hémique a été publiée dès 1993 (Ravichandran et al., 1993), le P450-BM3 a longtemps été un modèle pour l'étude des cytochromes P450 hépatiques de mammifères qui utilisent un système de transport d'électrons similaire (CPR) mais de nature membranaire et séparé du cytochrome. Des études montreront ensuite que le mécanisme de ce P450 particulier est bien différent de celui des P450 microsomaux (Black and Martin, 1994; Kitazume et al., 2007; Neeli et al., 2005) (voir § 4.5.2). Le P450-BM3 est une macroprotéine de 119 kDa dont le domaine P450 oxygénase hémique est connecté via un court linker au domaine réductase diflavinique qui contient un équivalent de chaque cofacteur FMN et FAD. Ce système bactérien se rapproche fortement des systèmes mammifères par la nature de ses composants, leurs séquences, leurs structures et leurs fonctions. D'autres systèmes de la classe VIII ont été identifiés lors des projets de séquençages des génomes de certains procaryotes et eucaryotes primaires.

Classe IX



La classe IX est composée, pour le moment, uniquement de l'oxyde nitrique réductase (P450nor, EC 1.7.99.7). Cette protéine est un cas à part dans la super famille des cytochromes P450. Localisée dans des fractions mitochondriales et cytosoliques de cellules de *Fusarium oxysporum*, elle constitue le seul système P450 eucaryote soluble connu. Elle catalyse des réactions de dénitrification afin de protéger de l'inhibition des mitochondries du champignon par le NO, particulièrement lorsque que les ressources en oxygène sont limitées. Le P450nor utilise directement le NADH comme source d'électrons en court-circuitant tout autre système de transport d'électrons (Narhi and Fulco, 1986). La conversion de deux molécules d'oxyde nitrique en oxyde nitreux est un processus réductif unique chez les P450. Des analyses de génomes démontrent la présence apparemment courante d'isoenzymes du P450nor chez d'autres les champignons.

Classe X



Les P450 de classe X catalysent la conversion de substrats via un système de transfert intramoléculaire totalement indépendant, l'absence de monooxygénation permettant de s'affranchir de l'apport classique de deux électrons et donc des partenaires rédox. L'allène oxyde synthase, l'acide gras

hydropéroxyde lyase, la divinyl éther synthase, ou encore la thromboxane synthase constituent quelques exemples de P450 de classe X (TXAS). Ce dernier catalyse l'isomérisation de la prostaglandine H2 en prostaglandine A2 qui est un vasoconstricteur potentiel impliqué dans une variété de maladies cardiovasculaires et pulmonaires.

2. Résidus impliqués dans la reconnaissance entre le P450 et ses partenaires rédox

Tableau 19 : Liste des résidus de P450 jouant un rôle dans la reconnaissance de la CPR et également parfois du *cyt b₅*. Ces résidus ont été identifiés aux travers de mutations ou de modifications chimiques. Les positions sont données vis-à-vis de l'alignement des différents P450 avec le P450-102 et/ou le P450-2C5 entre parenthèses (Hlavica et al., 2003).

P450	Résidu(s) modifié(s)	Position(s)	Interaction <i>cyt b₅</i>	Référence(s)
1A1	K97	59		(Shen and Strobel, 1992; Shen and Strobel, 1994)
1A2	K94	59		(Shimizu et al., 1991)
1A2	K99	64		(Mayuzumi et al., 1993; Shimizu et al., 1991)
2B4	R122	97 (121)	+	(Bridges et al., 1998)
2B1	K122-T231	97-106	+	(Frey et al., 1985)
2B4	R126	101 (125)	+	(Bridges et al., 1998)
102	L104	104		(Sevrioukova et al., 1999a)
2B4	R133	108 (132)	+	(Bridges et al., 1998)
2B4	F135	110 (134)	+	(Bridges et al., 1998)
2B4	M137	112 (136)	+	(Bridges et al., 1998)
2B4	K139	113 (138)	+	(Bernhardt et al., 1988; Bridges et al., 1998)
2C9	R144	188 (144)		(Crespi and Miller, 1997)
2B4	F223	- (222)		(Lehnerer et al., 2000)
2B4	K225	- (224)		(Lehnerer et al., 2000)
2B4	H226	197 (225)	+	(Bridges et al., 1998),63
2B4	F227	198 (226)		(Lehnerer et al., 2000)
2B4	R232	203 (231)		(Lehnerer et al., 2000)
2B4	F244	215 (243)		(Lehnerer et al., 2000)
1A1	K271	221		(Shen and Strobel, 1992; Shen and Strobel, 1994)
2B1	K251	222 (250)		(Shen and Strobel, 1993; Shen and Strobel, 1994)
2B4	K251	222 (250)		(Bernhardt et al., 1988)
1A2	Y271	224		(Janig et al., 1987)
2B4	R253	224 (252)		(Lehnerer et al., 2000)

1A1	K279	229		(Cvrk and Strobel, 2001; Shen and Strobel, 1994)
1A1	L269 – H281	219 – 231		(Shen and Strobel, 1995)
1A1	C292	241		(Parkinson et al., 1986)
1A2	S290 – N296	241 – 245		(Edwards et al., 1990)
2B4	H285	250 (281)		(Schulze et al., 2000)
17A1	R347	308		(Geller et al., 1999; Lee-Robichaud et al., 1999; Lee-Robichaud et al., 1995)
17A1	R358	319	+	(Geller et al., 1999; Lee-Robichaud et al., 1999; Lee-Robichaud et al., 1995)
1A1	K407	349	+	(Shen and Strobel, 1992; Shen and Strobel, 1994)
2B1	K384	349 (380)		(Shen and Strobel, 1993; Shen and Strobel, 1994)
2B4	K384	349 (380)		(Bernhardt et al., 1984; Shen and Strobel, 1993)
2B1	K422	386 (418)		(Shen and Strobel, 1993; Shen and Strobel, 1994)
2B4	R422	386 (418)		(Bridges et al., 1998)
102	Q387	387		(Sevrioukova et al., 1999a)
1A2	K440	388		(Shimizu et al., 1991)
1A2	K453	397		(Furuya et al., 1989; Mayuzumi et al., 1993)
2B1	K433	397 (429)		(Shen and Strobel, 1993; Shen and Strobel, 1994)
2A4	K433	397 (429)	+	(Bridges et al., 1998)
1A2	R455	399		(Furuya et al., 1989)
1A1	F454 – G463	393 – 402		(Shen and Strobel, 1995)
2B4	R443	407 (439)		(Bridges et al., 1998)

3. Fichiers PDB des structures de CPR et autres diflavines réductases

Tableau 20 : Récapitulatif des structures et fichiers PDB associés des différentes CPR natives et mutantes, et autres diflavines réductases.

Organisme	Fichier PDB	Remarques	Référence
CPR natives			
Rat	1AMO		(Wang et al., 1997)
Levure	2BF4, 2BN4		(Lamb et al., 2006)
Humain	1B1C	domaine FMN uniquement	(Zhao et al., 1999)
CPR mutants			
Rat	1J9Z	W677G	(Hubbard et al., 2001)
	1JA0	X677X	
	1JA1	S457A-C360A-D675N	
Levure	2BPO	D74G-Y75F-K78A	(Yermalitskaya, 2000)
Humain	3ES9	délétion de T236 à E236	(Hamdane et al., 2009)
Autres diflavines réductase			
eNOS de rat	1TLL		(Garcin et al., 2004)
SiR de <i>E. coli</i>	1DDG	domaine FAD/NADPH uniquement	(Gruez et al., 2000)
SiR de <i>E. coli</i>	1YKG	domaine FMN uniquement	(Sibille et al., 2005)
MSR	2QTL	domaine FAD/NADPH uniquement	(Wolthers et al., 2007)
BM3	1BVY	domaines FMN et hème uniquement	(Sevrioukova et al., 1999b)

BIBLIOGRAPHIE

Rien de grand ne se fait sans chimères.

« *L'avenir de la Science* », 1848
J. E. Renan

1. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 760-763.
2. Abrams, C.F. and Vanden-Eijnden, E. (2010) Large-scale conformational sampling of proteins using temperature-accelerated molecular dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 4961-4966.
3. Adak, S., Aulak, K.S. and Stuehr, D.J. (2001) Chimeras of nitric-oxide synthase types I and III establish fundamental correlates between heme reduction, heme-NO complex formation, and catalytic activity. *J Biol Chem*, **276**, 23246-23252.
4. Adams, R.M., Das, S. and Smith, T.F. (1996) Multiple domain protein diagnostic patterns. *Protein Sci*, **5**, 1240-1249.
5. Agarwal, R., Burley, S.K. and Swaminathan, S. (2007) Structural analysis of a ternary complex of allantoin amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. *J Mol Biol*, **368**, 450-463.
6. Aigrain, L., Pompon, D., Morera, S. and Truan, G. (2009) Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *EMBO Rep*.
7. Ambroggio, X.I. and Kuhlman, B. (2006) Design of protein conformational switches. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 525-530.
8. Apic, G., Gough, J. and Teichmann, S.A. (2001) Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes. *J Mol Biol*, **310**, 311-325.
9. Backes, W.L. and Eyer, C.S. (1989) Cytochrome P-450 LM2 reduction. Substrate effects on the rate of reductase-LM2 association. *J Biol Chem*, **264**, 6252-6259.
10. Backes, W.L. and Kelley, R.W. (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol Ther*, **98**, 221-233.
11. Barber, M.J., Pollock, V. and Spence, J.T. (1988) Microcoulometric analysis of trimethylamine dehydrogenase. *Biochem J*, **256**, 657-659.
12. Bashton, M. and Chothia, C. (2007) The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure*, **15**, 85-99.
13. Batey, S. and Clarke, J. (2006) Apparent cooperativity in the folding of multidomain proteins depends on the relative rates of folding of the constituent domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18113-18118.
14. Batey, S., Randles, L.G., Steward, A. and Clarke, J. (2005) Cooperative folding in a multi-domain protein. *J Mol Biol*, **349**, 1045-1059.
15. Bell, S.G., Xu, F., Johnson, E.O., Forward, I.M., Bartlam, M., Rao, Z. and Wong, L.L. Protein recognition in ferredoxin-P450 electron transfer in the class I CYP19A2 system from *Rhodospseudomonas palustris*. *J Biol Inorg Chem*, **15**, 315-328.
16. Bernado, P. (2010) Effect of interdomain dynamics on the structure determination of modular proteins by small-angle scattering. *Eur Biophys J*, **39**, 769-780.
17. Bernhardt, R., Kraft, R., Otto, A. and Ruckpaul, K. (1988) Electrostatic interactions between cytochrome P-450 LM2 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biomed Biochim Acta*, **47**, 581-592.
18. Bernhardt, R., Makower, A., Janig, G.R. and Ruckpaul, K. (1984) Selective chemical modification of a functionally linked lysine in cytochrome P-450 LM2. *Biochim Biophys Acta*, **785**, 186-190.
19. Bertini, I., Gaudemer, A., Luchinat, C. and Piccioli, M. (1993) Electron self-exchange in high-potential iron-sulfur proteins. Characterization of protein I from *Ectothiorhodospira vacuolata*. *Biochemistry*, **32**, 12887-12893.
20. Bhattacharya, S., Dai, Z., Li, J., Baxter, S., Callaway, D.J., Cowburn, D. and Bu, Z. (2010) A conformational switch in the scaffolding protein NHERF1 controls autoinhibition and complex formation. *J Biol Chem*, **285**, 9981-9994.
21. Black, S.D. and Coon, M.J. (1982) Structural features of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Hydrophobic domain, hydrophilic domain, and connecting region. *J Biol Chem*, **257**, 5929-5938.
22. Black, S.D. and Martin, S.T. (1994) Evidence for conformational dynamics and molecular aggregation in cytochrome P450 102 (BM-3). *Biochemistry*, **33**, 12056-12062.
23. Bortolotti, A., Perez-Dorado, I., Goni, G., Medina, M., Hermoso, J.A., Carrillo, N. and Cortez, N. (2009) Coenzyme binding and hydride transfer in *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin/ferredoxin NADP(H) oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta*, **1794**, 199-210.

24. Brenner, S., Hay, S., Munro, A.W. and Scrutton, N.S. (2008) Inter-flavin electron transfer in cytochrome P450 reductase - effects of solvent and pH identify hidden complexity in mechanism. *Febs J*, **275**, 4540-4557.
25. Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.T., Vakser, I.A., Loew, G. and Waskell, L. (1998) Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem*, **273**, 17036-17049.
26. Bumpus, N.N. and Hollenberg, P.F. (2010) Cross-linking of human cytochrome P450 2B6 to NADPH-cytochrome P450 reductase: Identification of a potential site of interaction. *J Inorg Biochem*.
27. Canova-Davis, E. and Waskell, L. (1984) The identification of the heat-stable microsomal protein required for methoxyflurane metabolism as cytochrome b5. *J Biol Chem*, **259**, 2541-2546.
28. Carrillo, N. and Ceccarelli, E.A. (2003) Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem*, **270**, 1900-1915.
29. Causey, K.M., Eyer, C.S. and Backes, W.L. (1990) Dual role of phospholipid in the reconstitution of cytochrome P-450 LM2-dependent activities. *Mol Pharmacol*, **38**, 134-142.
30. Chen, H.C. and Swenson, R.P. (2008) Effect of the Insertion of a Glycine Residue into the Loop Spanning Residues 536-541 on the Semiquinone State and Redox Properties of the Flavin Mononucleotide-Binding Domain of Flavocytochrome P450BM-3 from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*, **47**, 13788-13799.
31. Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L. and Quijcho, F.A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, **12**, 651-661.
32. Choi, M.H., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (2005) Characterization of testosterone 11 beta-hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos*, **33**, 714-718.
33. Chothia, C. and Gough, J. (2009) Genomic and structural aspects of protein evolution. *Biochem J*, **419**, 15-28.
34. Chothia, C. and Lesk, A.M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J*, **5**, 823-826.
35. Churbanova, I.Y., Poulos, T.L. and Sevrioukova, I.F. (2010) Production and characterization of a functional putidaredoxin reductase-putidaredoxin covalent complex. *Biochemistry*, **49**, 58-67.
36. Coon, M.J. (2005) Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **45**, 1-25.
37. Cooper, D.Y., Estabrook, R.W. and Rosenthal, O. (1963) The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *J Biol Chem*, **238**, 1320-1323.
38. Copley, R.R., Ponting, C.P., Schultz, J. and Bork, P. (2002) Sequence analysis of multidomain proteins: past perspectives and future directions. *Adv Protein Chem*, **61**, 75-98.
39. Crane, B.R., Sudhamsu, J. and Patel, B.A. (2010) Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annu Rev Biochem*.
40. Crawford, J.M., Thomas, P.M., Scheerer, J.R., Vagstad, A.L., Kelleher, N.L. and Townsend, C.A. (2008) Deconstruction of iterative multidomain polyketide synthase function. *Science*, **320**, 243-246.
41. Crespi, C.L. and Miller, V.P. (1997) The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics*, **7**, 203-210.
42. Cvrk, T. and Strobel, H.W. (2001) Role of LYS271 and LYS279 residues in the interaction of cytochrome P4501A1 with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys*, **385**, 290-300.
43. Daff, S.N., Chapman, S.K., Turner, K.L., Holt, R.A., Govindaraj, S., Poulos, T.L. and Munro, A.W. (1997) Redox control of the catalytic cycle of flavocytochrome P-450 BM3. *Biochemistry*, **36**, 13816-13823.
44. Das, A., Grinkova, Y.V. and Sligar, S.G. (2007) Redox potential control by drug binding to cytochrome P450 3A4. *J Am Chem Soc*, **129**, 13778-13779.
45. Das, A. and Sligar, S.G. (2009) Modulation of the cytochrome P450 reductase redox potential by the phospholipid bilayer. *Biochemistry*, **48**, 12104-12112.

46. Davydov, D.R., Kariakin, A.A., Petushkova, N.A. and Peterson, J.A. (2000) Association of cytochromes P450 with their reductases: opposite sign of the electrostatic interactions in P450BM-3 as compared with the microsomal 2B4 system. *Biochemistry*, **39**, 6489-6497.
47. de Alba, E. (2009) Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *J Biol Chem*, **284**, 32932-32941.
48. Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Ottado, J., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. and Karplus, P.A. (1999) A productive NADP⁺ binding mode of ferredoxin-NADP⁺ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nat Struct Biol*, **6**, 847-853.
49. Diez, M., Zimmermann, B., Borsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekyan, S., Kudryavtsev, V., Seidel, C.A. and Graber, P. (2004) Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 135-141.
50. Dignam, J.D. and Strobel, H.W. (1977) NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat liver: purification by affinity chromatography and characterization. *Biochemistry*, **16**, 1116-1123.
51. Dodhia, V.R., Fantuzzi, A. and Gilardi, G. (2006) Engineering human cytochrome P450 enzymes into catalytically self-sufficient chimeras using molecular Lego. *J Biol Inorg Chem*, **11**, 903-916.
52. Duchstein, H.J., Fenner, H., Hemmerich, P. and Knappe, W.R. (1979) (Photo)chemistry of 5-deazaflavin. A clue to the mechanism of flavin-dependent (de)hydrogenation. *Eur J Biochem*, **95**, 167-181.
53. Edwards, R.J., Singleton, A.M., Murray, B.P., Sesardic, D., Rich, K.J., Davies, D.S. and Boobis, A.R. (1990) An anti-peptide antibody targeted to a specific region of rat cytochrome P-450IA2 inhibits enzyme activity. *Biochem J*, **266**, 497-504.
54. Egawa, T., Shimada, H. and Ishimura, Y. (1994) Evidence for compound I formation in the reaction of cytochrome P450cam with m-chloroperbenzoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, **201**, 1464-1469.
55. Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I.L., Huang, W.C., Grossmann, J.G. and Roberts, G.C. (2009) Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J Biol Chem*, **284**, 36628-36637.
56. Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 2126-2132.
57. Enoch, H.G. and Strittmatter, P. (1979) Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem*, **254**, 8976-8981.
58. Ernster, L. and Orrenius, S. (1965) Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. *Fed Proc*, **24**, 1190-1199.
59. Estabrook, R.W., Shet, M.S., Fisher, C.W., Jenkins, C.M. and Waterman, M.R. (1996) The interaction of NADPH-P450 reductase with P450: an electrochemical study of the role of the flavin mononucleotide-binding domain. *Arch Biochem Biophys*, **333**, 308-315.
60. Falzone, C.J., Mayer, M.R., Whiteman, E.L., Moore, C.D. and Lecomte, J.T. (1996) Design challenges for hemoproteins: the solution structure of apocytochrome b5. *Biochemistry*, **35**, 6519-6526.
61. Fernandez, C. and Wider, G. (2003) TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 570-580.
62. Finn, R.D., Basran, J., Roitel, O., Wolf, C.R., Munro, A.W., Paine, M.J. and Scrutton, N.S. (2003) Determination of the redox potentials and electron transfer properties of the FAD- and FMN-binding domains of the human oxidoreductase NR1. *Eur J Biochem*, **270**, 1164-1175.
63. Fox, R.J. and Huisman, G.W. (2008) Enzyme optimization: moving from blind evolution to statistical exploration of sequence-function space. *Trends Biotechnol*, **26**, 132-138.
64. Frey, A.B., Waxman, D.J. and Kreibich, G. (1985) The structure of phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4. Production and characterization of site-specific antibodies. *J Biol Chem*, **260**, 15253-15265.
65. Friedberg, F. (2010) Single and multiple CH (calponin homology) domain containing multidomain proteins in Arabidopsis and Saccharomyces: an inventory. *Mol Biol Rep*.
66. Furuya, H., Shimizu, T., Hirano, K., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y., Raag, R. and Poulos, T.L. (1989) Site-directed mutageneses of rat liver cytochrome P-450d: catalytic activities toward benzphetamine and 7-ethoxycoumarin. *Biochemistry*, **28**, 6848-6857.

67. Gan, L., von Moltke, L.L., Trepanier, L.A., Harmatz, J.S., Greenblatt, D.J. and Court, M.H. (2009) Role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome-b5/NADH-b5 reductase in variability of CYP3A activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, **37**, 90-96.
68. Gao, Q., Doneanu, C.E., Shaffer, S.A., Adman, E.T., Goodlett, D.R. and Nelson, S.D. (2006) Identification of the interactions between cytochrome P450 2E1 and cytochrome b5 by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **281**, 20404-20417.
69. Garcin, E.D., Bruns, C.M., Lloyd, S.J., Hosfield, D.J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D.J., Tainer, J.A. and Getzoff, E.D. (2004) Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, **279**, 37918-37927.
70. Garnaud, P.E., Koetsier, M., Ost, T.W. and Daff, S. (2004) Redox properties of the isolated flavin mononucleotide- and flavin adenine dinucleotide-binding domains of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **43**, 11035-11044.
71. Geller, D.H., Auchus, R.J. and Miller, W.L. (1999) P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Mol Endocrinol*, **13**, 167-175.
72. George, R.A. and Heringa, J. (2002) An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng*, **15**, 871-879.
73. Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.M. and Mayhew, S.G. (1974) Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. *Biochemistry*, **13**, 589-597.
74. Gilep, A.A., Guryev, O.L., Usanov, S.A. and Estabrook, R.W. (2001a) An enzymatically active chimeric protein containing the hydrophilic form of NADPH-cytochrome P450 reductase fused to the membrane-binding domain of cytochrome b5. *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 937-941.
75. Gilep, A.A., Guryev, O.L., Usanov, S.A. and Estabrook, R.W. (2001b) Expression, purification, and physical properties of recombinant flavocytochrome fusion proteins containing rat cytochrome b(5) linked to NADPH-cytochrome P450 reductase by different membrane-binding segments. *Arch Biochem Biophys*, **390**, 222-234.
76. Gillam, E.M., Baba, T., Kim, B.R., Ohmori, S. and Guengerich, F.P. (1993) Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in Escherichia coli and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*, **305**, 123-131.
77. Gillette, J.R. (1966) Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. *Adv Pharmacol*, **4**, 219-261.
78. Glazer, R.I., Schenkman, J.B. and Sartorelli, A.C. (1971) Immunochemical studies on the role of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c (P-450) reductase in drug oxidation. *Mol Pharmacol*, **7**, 683-688.
79. Gokhale, R.S. and Khosla, C. (2000) Role of linkers in communication between protein modules. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 22-27.
80. Gomez-Moreno, C. (2009) Structural and mechanistic aspects of flavoproteins. *Febs J*, **276**, 3929.
81. Gruez, A., Pignol, D., Zeghouf, M., Coves, J., Fontecave, M., Ferrer, J.L. and Fontecilla-Camps, J.C. (2000) Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module. *J Mol Biol*, **299**, 199-212.
82. Grunau, A., Geraki, K., Grossmann, J.G. and Gutierrez, A. (2007) Conformational dynamics and the energetics of protein-ligand interactions: role of interdomain loop in human cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, **46**, 8244-8255.
83. Grunberg, R., Ferrar, T.S., van der Sloot, A.M., Constante, M. and Serrano, L. (2010) Building blocks for protein interaction devices. *Nucleic Acids Res*.
84. Guntas, G. and Ostermeier, M. (2004) Creation of an allosteric enzyme by domain insertion. *J Mol Biol*, **336**, 263-273.
85. Gutierrez, A., Lian, L.Y., Wolf, C.R., Scrutton, N.S. and Roberts, G.C. (2001) Stopped-flow kinetic studies of flavin reduction in human cytochrome P450 reductase and its component domains. *Biochemistry*, **40**, 1964-1975.
86. Gutierrez, A., Munro, A.W., Grunau, A., Wolf, C.R., Scrutton, N.S. and Roberts, G.C. (2003) Interflavin electron transfer in human cytochrome P450 reductase is enhanced by coenzyme binding. Relaxation kinetic studies with coenzyme analogues. *Eur J Biochem*, **270**, 2612-2621.

87. Gutierrez, A., Paine, M., Wolf, C.R., Scrutton, N.S. and Roberts, G.C. (2002) Relaxation kinetics of cytochrome P450 reductase: internal electron transfer is limited by conformational change and regulated by coenzyme binding. *Biochemistry*, **41**, 4626-4637.
88. Hall, A., Parsonage, D., Horita, D., Karplus, P.A., Poole, L.B. and Barbar, E. (2009) Redox-dependent dynamics of a dual thioredoxin fold protein: evolution of specialized folds. *Biochemistry*, **48**, 5984-5993.
89. Hall, D.A., Vander Kooi, C.W., Stasik, C.N., Stevens, S.Y., Zuiderweg, E.R. and Matthews, R.G. (2001) Mapping the interactions between flavodoxin and its physiological partners flavodoxin reductase and cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9521-9526.
90. Hamdane, D., Xia, C., Im, S.C., Zhang, H., Kim, J.J. and Waskell, L. (2009) Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J Biol Chem*.
91. Han, J.H., Batey, S., Nickson, A.A., Teichmann, S.A. and Clarke, J. (2007) The folding and evolution of multidomain proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 319-330.
92. Hanley, S.C., Ost, T.W. and Daff, S. (2004) The unusual redox properties of flavocytochrome P450 BM3 flavodoxin domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 1418-1423.
93. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M. and Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*, **1770**, 330-344.
94. Haque, M.M., Panda, K., Tejero, J., Aulak, K.S., Fadlalla, M.A., Mustovich, A.T. and Stuehr, D.J. (2007) A connecting hinge represses the activity of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9254-9259.
95. Hawkins, A.R. and Lamb, H.K. (1995) The molecular biology of multidomain proteins. Selected examples. *Eur J Biochem*, **232**, 7-18.
96. Henzler-Wildman, K. and Kern, D. (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature*, **450**, 964-972.
97. Higashimoto, Y., Sato, H., Sakamoto, H., Takahashi, K., Palmer, G. and Noguchi, M. (2006) The reactions of heme- and verdoheme-heme oxygenase-1 complexes with FMN-depleted NADPH-cytochrome P450 reductase. Electrons required for verdoheme oxidation can be transferred through a pathway not involving FMN. *J Biol Chem*, **281**, 31659-31667.
98. Higashimoto, Y., Sugishima, M., Sato, H., Sakamoto, H., Fukuyama, K., Palmer, G. and Noguchi, M. (2008) Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, **367**, 852-858.
99. Hlavica, P. (2009) Assembly of non-natural electron transfer conduits in the cytochrome P450 system: a critical assessment and update of artificial redox constructs amenable to exploitation in biotechnological areas. *Biotechnol Adv*, **27**, 103-121.
100. Hlavica, P., Schulze, J. and Lewis, D.F. (2003) Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *J Inorg Biochem*, **96**, 279-297.
101. Horecker, B.C. (1950) Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome *c* reductase in liver. *Journal of Biological Chemistry*, **183**, 12.
102. Hubbard, P.A., Shen, A.L., Paschke, R., Kasper, C.B. and Kim, J.J. (2001) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hydride and electron transfer. *J Biol Chem*, **276**, 29163-29170.
103. Huber Iii, W.J., Scruggs, B.A. and Backes, W.L. (2009) C-Terminal membrane spanning region of human heme oxygenase-1 mediates a time-dependent complex formation with cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, **48**, 190-197.
104. Huber, W.J., 3rd and Backes, W.L. (2007) Expression and characterization of full-length human heme oxygenase-1: the presence of intact membrane-binding region leads to increased binding affinity for NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, **46**, 12212-12219.
105. Hurt, J.A., Thibodeau, S.A., Hirsh, A.S., Pabo, C.O. and Joung, J.K. (2003) Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12271-12276.

106. Ilagan, R.P., Tejero, J., Aulak, K.S., Ray, S.S., Hemann, C., Wang, Z.Q., Gangoda, M., Zweier, J.L. and Stuehr, D.J. (2009) Regulation of FMN subdomain interactions and function in neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **48**, 3864-3876.
107. Ilagan, R.P., Tiso, M., Konas, D.W., Hemann, C., Durra, D., Hille, R. and Stuehr, D.J. (2008) Differences in a conformational equilibrium distinguish catalysis by the endothelial and neuronal nitric-oxide synthase flavoproteins. *J Biol Chem*, **283**, 19603-19615.
108. Inui, H., Maeda, A. and Ohkawa, H. (2007) Molecular characterization of specifically active recombinant fused enzymes consisting of CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome b5. *Biochemistry*, **46**, 10213-10221.
109. Itzhaki, Z., Akiva, E., Altuvia, Y. and Margalit, H. (2006) Evolutionary conservation of domain-domain interactions. *Genome Biol*, **7**, R125.
110. Ivanic, J., Wallqvist, A. and Reifman, J. (2008) Evidence of probabilistic behaviour in protein interaction networks. *BMC Syst Biol*, **2**, 11.
111. Iyanagi, T. (2005) Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 520-528.
112. Iyanagi, T. (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol*, **260**, 35-112.
113. Jamakhandi, A.P., Kuzmic, P., Sanders, D.E. and Miller, G.P. (2007) Global analysis of protein-protein interactions reveals multiple CYP2E1-reductase complexes. *Biochemistry*, **46**, 10192-10201.
114. Jang, M.H., Scrutton, N.S. and Hille, R. (2000) Formation of W(3)A(1) electron-transferring flavoprotein (ETF) hydroquinone in the trimethylamine dehydrogenase x ETF protein complex. *J Biol Chem*, **275**, 12546-12552.
115. Janig, G.R., Kraft, R., Blanck, J., Ristau, O., Rabe, H. and Ruckpaul, K. (1987) Chemical modification of cytochrome P-450 LM4. Identification of functionally linked tyrosine residues. *Biochim Biophys Acta*, **916**, 512-523.
116. Janin, J. and Wodak, S.J. (2002) Protein modules and protein-protein interaction. Introduction. *Adv Protein Chem*, **61**, 1-8.
117. Jenkins, C.M., Genzor, C.G., Fillat, M.F., Waterman, M.R. and Gomez-Moreno, C. (1997) Negatively charged anabaena flavodoxin residues (Asp144 and Glu145) are important for reconstitution of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase activity. *J Biol Chem*, **272**, 22509-22513.
118. Jenkins, C.M. and Waterman, M.R. (1998) NADPH-flavodoxin reductase and flavodoxin from *Escherichia coli*: characteristics as a soluble microsomal P450 reductase. *Biochemistry*, **37**, 6106-6113.
119. Jick, H. and Shuster, L. (1966) The turnover of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase in the livers of mice treated with phenobarbital. *J Biol Chem*, **241**, 5366-5369.
120. Jones, S., Marin, A. and Thornton, J.M. (2000) Protein domain interfaces: characterization and comparison with oligomeric protein interfaces. *Protein Eng*, **13**, 77-82.
121. Kabsch, W. (1993) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 125-132.
122. Kamin, H., Masters, B.S., Gibson, Q.H. and Williams, C.H., Jr. (1965) Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Fed Proc*, **24**, 1164-1171.
123. Katzen, F., Deshmukh, M., Daldal, F. and Beckwith, J. (2002) Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD. *Embo J*, **21**, 3960-3969.
124. Kelley, R.W., Reed, J.R. and Backes, W.L. (2005) Effects of ionic strength on the functional interactions between CYP2B4 and CYP1A2. *Biochemistry*, **44**, 2632-2641.
125. Kellner, D.G., Hung, S.C., Weiss, K.E. and Sligar, S.G. (2002) Kinetic characterization of compound I formation in the thermostable cytochrome P450 CYP119. *J Biol Chem*, **277**, 9641-9644.
126. Kim, W.K., Henschel, A., Winter, C. and Schroeder, M. (2006) The many faces of protein-protein interactions: A compendium of interface geometry. *PLoS Comput Biol*, **2**, e124.
127. Kitazume, T., Haines, D.C., Estabrook, R.W., Chen, B. and Peterson, J.A. (2007) Obligatory intermolecular electron-transfer from FAD to FMN in dimeric P450BM-3. *Biochemistry*, **46**, 11892-11901.

128. Krauser, J.A., Voehler, M., Tseng, L.H., Schefer, A.B., Godejohann, M. and Guengerich, F.P. (2004) Testosterone 1 beta-hydroxylation by human cytochrome P450 3A4. *Eur J Biochem*, **271**, 3962-3969.
129. Kuriyan, J. and Eisenberg, D. (2007) The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature*, **450**, 983-990.
130. Lah, L., Krasevec, N., Trontelj, P. and Komel, R. (2008) High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. *Fungal Genet Biol*, **45**, 446-458.
131. Lamb, D.C., Kim, Y., Yermalitskaya, L.V., Yermalitsky, V.N., Lepesheva, G.I., Kelly, S.L., Waterman, M.R. and Podust, L.M. (2006) A second FMN binding site in yeast NADPH-cytochrome P450 reductase suggests a mechanism of electron transfer by diflavin reductases. *Structure*, **14**, 51-61.
132. Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G. and Dupin, E. (2004) Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, **131**, 4637-4650.
133. Lee-Robichaud, P., Akhtar, M.E. and Akhtar, M. (1999) Lysine mutagenesis identifies cationic charges of human CYP17 that interact with cytochrome b5 to promote male sex-hormone biosynthesis. *Biochem J*, **342** (Pt 2), 309-312.
134. Lee-Robichaud, P., Wright, J.N., Akhtar, M.E. and Akhtar, M. (1995) Modulation of the activity of human 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b5: endocrinological and mechanistic implications. *Biochem J*, **308** (Pt 3), 901-908.
135. Lee, B. and Lee, D. (2009) Protein comparison at the domain architecture level. *BMC Bioinformatics*, **10 Suppl 15**, S5.
136. Lehnerer, M., Schulze, J., Achterhold, K., Lewis, D.F. and Hlavica, P. (2000) Identification of key residues in rabbit liver microsomal cytochrome P450 2B4: importance in interactions with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biochem*, **127**, 163-169.
137. Liepinsh, E., Barbals, R., Dahl, E., Sharipo, A., Staub, E. and Otting, G. (2003) The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. *J Mol Biol*, **332**, 1155-1163.
138. Louerat-Oriou, B., Perret, A. and Pompon, D. (1998) Differential redox and electron-transfer properties of purified yeast, plant and human NADPH-cytochrome P-450 reductases highly modulate cytochrome P-450 activities. *Eur J Biochem*, **258**, 1040-1049.
139. Mansuy, D., Battioni, P. and Battioni, J.P. (1989) Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases. *Eur J Biochem*, **184**, 267-285.
140. Marohnic, C.C., Panda, S.P., Martasek, P. and Masters, B.S. (2006) Diminished FAD binding in the Y459H and V492E Antley-Bixler syndrome mutants of human cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem*, **281**, 35975-35982.
141. Marsden, R.L., Ranea, J.A., Sillero, A., Redfern, O., Yeats, C., Maibaum, M., Lee, D., Addou, S., Reeves, G.A., Dallman, T.J. and Orengo, C.A. (2006) Exploiting protein structure data to explore the evolution of protein function and biological complexity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **361**, 425-440.
142. Masters, B.S., Baron, J., Taylor, W.E., Isaacson, E.L. and LoSpalluto, J. (1971) Immunochemical studies on electron transport chains involving cytochrome P-450. I. Effects of antibodies to pig liver microsomal reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase and the non-heme iron protein from bovine adrenocortical mitochondria. *J Biol Chem*, **246**, 4143-4150.
143. Masters, B.S., Bilimoria, M.H., Kamin, H. and Gibson, Q.H. (1965) The mechanism of 1- and 2-electron transfers catalyzed by reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. *J Biol Chem*, **240**, 4081-4088.
144. Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-497.
145. Mayuzumi, H., Sambongi, C., Hiroya, K., Shimizu, T., Tateishi, T. and Hatano, M. (1993) Effect of mutations of ionic amino acids of cytochrome P450 1A2 on catalytic activities toward 7-ethoxycoumarin and methanol. *Biochemistry*, **32**, 5622-5628.
146. McLean, K.J., Sabri, M., Marshall, K.R., Lawson, R.J., Lewis, D.G., Clift, D., Balding, P.R., Dunford, A.J., Warman, A.J., McVey, J.P., Quinn, A.M., Sutcliffe, M.J., Scrutton, N.S. and Munro, A.W. (2005) Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans*, **33**, 796-801.

147. McPherson, A., Malkin, A.J. and Kuznetsov, Y.G. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Structure*, **3**, 759-768.
148. Miller, R.T. and Hinck, A.P. (2001) Characterization of hydride transfer to flavin adenine dinucleotide in neuronal nitric oxide synthase reductase domain: geometric relationship between the nicotinamide and isoalloxazine rings. *Arch Biochem Biophys*, **395**, 129-135.
149. Monera, O.D., Kay, C.M. and Hodges, R.S. (1994) Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci*, **3**, 1984-1991.
150. Muller, F. (1983) The flavin redox-system and its biological function. *Top Curr Chem*, **108**, 71-107.
151. Muller, F., Brustlein, M., Hemmerich, P., Massey, V. and Walker, W.H. (1972) Light-absorption studies on neutral flavin radicals. *Eur J Biochem*, **25**, 573-580.
152. Munro, A.W., Girvan, H.M. and McLean, K.J. (2007) Cytochrome P450--redox partner fusion enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1770**, 345-359.
153. Munro, A.W., Noble, M.A., Robledo, L., Daff, S.N. and Chapman, S.K. (2001) Determination of the redox properties of human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, **40**, 1956-1963.
154. Murataliev, M.B., Arino, A., Guzov, V.M. and Feyereisen, R. (1999) Kinetic mechanism of cytochrome P450 reductase from the house fly (*Musca domestica*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **29**, 233-242.
155. Murataliev, M.B. and Feyereisen, R. (1996) Functional interactions in cytochrome P450BM3. Fatty acid substrate binding alters electron-transfer properties of the flavoprotein domain. *Biochemistry*, **35**, 15029-15037.
156. Murataliev, M.B. and Feyereisen, R. (1999) Mechanism of cytochrome P450 reductase from the house fly: evidence for an FMN semiquinone as electron donor. *FEBS Lett*, **453**, 201-204.
157. Murataliev, M.B. and Feyereisen, R. (2000a) Functional interactions in cytochrome P450BM3. Evidence that NADP(H) binding controls redox potentials of the flavin cofactors. *Biochemistry*, **39**, 12699-12707.
158. Murataliev, M.B. and Feyereisen, R. (2000b) Interaction of NADP(H) with oxidized and reduced P450 reductase during catalysis. Studies with nucleotide analogues. *Biochemistry*, **39**, 5066-5074.
159. Murataliev, M.B., Feyereisen, R. and Walker, F.A. (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta*, **1698**, 1-26.
160. Murataliev, M.B., Guzov, V.M., Walker, F.A. and Feyereisen, R. (2008) P450 reductase and cytochrome b(5) interactions with cytochrome P450: Effects on house fly CYP6A1 catalysis. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 1008-1015.
161. Narhi, L.O. and Fulco, A.J. (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem*, **261**, 7160-7169.
162. Neeli, R., Girvan, H.M., Lawrence, A., Warren, M.J., Leys, D., Scrutton, N.S. and Munro, A.W. (2005) The dimeric form of flavocytochrome P450 BM3 is catalytically functional as a fatty acid hydroxylase. *FEBS Lett*, **579**, 5582-5588.
163. Nelson, D.R. (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics*, **4**, 59-65.
164. Niranjan, B.G., Raza, H., Shayiq, R.M., Jefcoate, C.R. and Avadhani, N.G. (1988) Hepatic mitochondrial cytochrome P-450 system. Identification and characterization of a precursor form of mitochondrial cytochrome P-450 induced by 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem*, **263**, 575-580.
165. Noble, M.A., Munro, A.W., Rivers, S.L., Robledo, L., Daff, S.N., Yellowlees, L.J., Shimizu, T., Sagami, I., Guillemette, J.G. and Chapman, S.K. (1999) Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **38**, 16413-16418.
166. Noshiro, M., Ullrich, V. and Omura, T. (1981) Cytochrome b5 as electron donor for oxy-cytochrome P-450. *Eur J Biochem*, **116**, 521-526.
167. Ohnishi, T. and Salerno, J.C. (2005) Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Lett*, **579**, 4555-4561.
168. Omura, T. (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem*, **147**, 297-306.

169. Omura, T. and Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*, **237**, 1375-1376.
170. Oprian, D.D. and Coon, M.J. (1982) Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. *J Biol Chem*, **257**, 8935-8944.
171. Oprian, D.D., Vatsis, K.P. and Coon, M.J. (1979) Kinetics of reduction of cytochrome P-450LM4 in a reconstituted liver microsomal enzyme system. *J Biol Chem*, **254**, 8895-8902.
172. Ostermeier, M. (2005) Engineering allosteric protein switches by domain insertion. *Protein Eng Des Sel*, **18**, 359-364.
173. Ostrowski, J., Barber, M.J., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M. and Kredich, N.M. (1989) Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem*, **264**, 15796-15808.
174. Ozalp, C., Szczesna-Skorupa, E. and Kemper, B. (2005) Bimolecular fluorescence complementation analysis of cytochrome p450 2c2, 2e1, and NADPH-cytochrome p450 reductase molecular interactions in living cells. *Drug Metab Dispos*, **33**, 1382-1390.
175. Pant, K. and Crane, B.R. (2005) Structure of a loose dimer: an intermediate in nitric oxide synthase assembly. *J Mol Biol*, **352**, 932-940.
176. Parales, R.E. and Ditty, J.L. (2005) Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways. *Curr Opin Biotechnol*, **16**, 315-325.
177. Parkinson, A., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Jerina, D.M., Sayer, J.M., van Bladeren, P.J., Haniu, M., Shively, J.E. and Levin, W. (1986) Chemical modification and inactivation of rat liver microsomal cytochrome P-450c by 2-bromo-4'-nitroacetophenone. *J Biol Chem*, **261**, 11478-11486.
178. Peng, Q. and Li, H. (2009) Domain Insertion Effectively Regulates the Mechanical Unfolding Hierarchy of Elastomeric Proteins: Toward Engineering Multifunctional Elastomeric Proteins. *J Am Chem Soc*.
179. Perret, A. and Pompon, D. (1998) Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry*, **37**, 11412-11424.
180. Perutz, M.F. (1979) Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu Rev Biochem*, **48**, 327-386.
181. Peterson, J.A., Sevrioukova, I., Truan, G. and Graham-Lorence, S.E. (1997) P450BM-3; a tale of two domains--or is it three? *Steroids*, **62**, 117-123.
182. Petschow, D., Wurdinger, I., Baumann, R., Duhm, J., Braunitzer, G. and Bauer, C. (1977) Causes of high blood O₂ affinity of animals living at high altitude. *J Appl Physiol*, **42**, 139-143.
183. Philips, A.H. and Langdon, R.G. (1962) Hepatic triphosphopyridine nucleotide cytochrome *c* reductase: isolation, characterization, and kinetics studies. *Journal of Biological Chemistry*, **237**, 8.
184. Porter, R., Jachymova, M., Martasek, P., Kalyanaraman, B. and Vasquez-Vivar, J. (2005) Reductive activation of Cr(VI) by nitric oxide synthase. *Chem Res Toxicol*, **18**, 834-843.
185. Porter, T.D., Beck, T.W. and Kasper, C.B. (1990) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene organization correlates with structural domains of the protein. *Biochemistry*, **29**, 9814-9818.
186. Porter, T.D. and Kasper, C.B. (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*, **25**, 1682-1687.
187. Poulos, T.L. (1988) Cytochrome P450: molecular architecture, mechanism, and prospects for rational inhibitor design. *Pharm Res*, **5**, 67-75.
188. Poulos, T.L., Finzel, B.C. and Howard, A.J. (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol*, **195**, 687-700.
189. Purdy, M.M., Koo, L.S., Ortiz de Montellano, P.R. and Klinman, J.P. (2004) Steady-state kinetic investigation of cytochrome P450cam: interaction with redox partners and reaction with molecular oxygen. *Biochemistry*, **43**, 271-281.
190. Qian, W., Sun, Y.L., Wang, Y.H., Zhuang, J.H., Xie, Y. and Huang, Z.X. (1998) The influence of mutation at Glu44 and Glu56 of cytochrome b5 on the protein's stabilization and interaction between cytochrome *c* and cytochrome b5. *Biochemistry*, **37**, 14137-14150.

191. Ramachandran, R., Surka, M., Chappie, J.S., Fowler, D.M., Foss, T.R., Song, B.D. and Schmid, S.L. (2007) The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *Embo J*, **26**, 559-566.
192. Ravichandran, K.G., Boddupalli, S.S., Hasermann, C.A., Peterson, J.A. and Deisenhofer, J. (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science*, **261**, 731-736.
193. Reed, J.R., Brignac-Huber, L.M. and Backes, W.L. (2008) Physical incorporation of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 into phospholipid vesicles using glycocholate and Bio-Beads. *Drug Metab Dispos*, **36**, 582-588.
194. Reed, J.R., Eyer, M. and Backes, W.L. (2010) Functional interactions between cytochromes P450 1A2 and 2B4 require both enzymes to reside in the same phospholipid vesicle: evidence for physical complex formation. *J Biol Chem*, **285**, 8942-8952.
195. Rogers, M.S., Jones, G.D., Antonini, G., Wilson, M.T. and Brunori, M. (1994) Electron transfer from *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose oxidase to equine cytochrome c and *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c-551. *Biochem J*, **298 (Pt 2)**, 329-334.
196. Roman, L.J., McLain, J. and Masters, B.S. (2003) Chimeric enzymes of cytochrome P450 oxidoreductase and neuronal nitric-oxide synthase reductase domain reveal structural and functional differences. *J Biol Chem*, **278**, 25700-25707.
197. Romero, A., Caldeira, J., Legall, J., Moura, I., Moura, J.J. and Romao, M.J. (1996) Crystal structure of flavodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 in two oxidation states. *Eur J Biochem*, **239**, 190-196.
198. Ruan, J., Xie, Q., Hutchinson, N., Cho, H., Wolfe, G.C. and Nathan, C. (1996) Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca²⁺. *J Biol Chem*, **271**, 22679-22686.
199. Ryabov, Y. and Fushman, D. (2007a) Structural assembly of multidomain proteins and protein complexes guided by the overall rotational diffusion tensor. *J Am Chem Soc*, **129**, 7894-7902.
200. Ryabov, Y.E. and Fushman, D. (2007b) A model of interdomain mobility in a multidomain protein. *J Am Chem Soc*, **129**, 3315-3327.
201. Saha, S., Biswas, K.H., Kondapalli, C., Isloor, N. and Visweswariah, S.S. (2009) The linker region in receptor guanylyl cyclases is a key regulatory module: mutational analysis of guanylyl cyclase C. *J Biol Chem*, **284**, 27135-27145.
202. Sakaki, T., Kominami, S., Takemori, S., Ohkawa, H., Akiyoshi-Shibata, M. and Yabusaki, Y. (1994) Kinetic studies on a genetically engineered fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 and yeast NADPH-P450 reductase. *Biochemistry*, **33**, 4933-4939.
203. Sancho, J. (2006) Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 855-864.
204. Sauer, J., Sigurskjold, B.W., Christensen, U., Frandsen, T.P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P. and Svensson, B. (2000) Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 275-293.
205. Sazanov, L.A. and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, **311**, 1430-1436.
206. Schay, G., Smeller, L., Tsuneshige, A., Yonetani, T. and Fidy, J. (2006) Allosteric effectors influence the tetramer stability of both R- and T-states of hemoglobin A. *J Biol Chem*, **281**, 25972-25983.
207. Schenkman, J.B. and Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther*, **97**, 139-152.
208. Schuler, M.A. and Werck-Reichhart, D. (2003) Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 629-667.
209. Schulze, J., Tschop, K., Lehnerer, M. and Hlavica, P. (2000) Residue 285 in cytochrome P450 2B4 lacking the NH(2)-terminal hydrophobic sequence has a role in the functional association of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 777-781.
210. Schunemann, V., Jung, C., Ternner, J., Trautwein, A.X. and Weiss, R. (2002) Spectroscopic studies of peroxyacetic acid reaction intermediates of cytochrome P450cam and chloroperoxidase. *J Inorg Biochem*, **91**, 586-596.

211. Schuster-Bockler, B. and Bateman, A. (2007) Reuse of structural domain-domain interactions in protein networks. *BMC Bioinformatics*, **8**, 259.
212. Scott, K.A., Steward, A., Fowler, S.B. and Clarke, J. (2002) Titin; a multidomain protein that behaves as the sum of its parts. *J Mol Biol*, **315**, 819-829.
213. Sevrioukova, I., Shaffer, C., Ballou, D.P. and Peterson, J.A. (1996a) Equilibrium and transient state spectrophotometric studies of the mechanism of reduction of the flavoprotein domain of P450BM-3. *Biochemistry*, **35**, 7058-7068.
214. Sevrioukova, I., Truan, G. and Peterson, J.A. (1996b) The flavoprotein domain of P450BM-3: expression, purification, and properties of the flavin adenine dinucleotide- and flavin mononucleotide-binding subdomains. *Biochemistry*, **35**, 7528-7535.
215. Sevrioukova, I.F., Hazzard, J.T., Tollin, G. and Poulos, T.L. (1999a) The FMN to heme electron transfer in cytochrome P450BM-3. Effect of chemical modification of cysteines engineered at the FMN-heme domain interaction site. *J Biol Chem*, **274**, 36097-36106.
216. Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A. and Poulos, T.L. (1999b) Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1863-1868.
217. Sevrioukova, I.F. and Peterson, J.A. (1995) NADPH-P-450 reductase: structural and functional comparisons of the eukaryotic and prokaryotic isoforms. *Biochimie*, **77**, 562-572.
218. Shen, A.L. and Kasper, C.B. (1995) Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J Biol Chem*, **270**, 27475-27480.
219. Shen, A.L. and Kasper, C.B. (2000) Differential contributions of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase FAD binding site residues to flavin binding and catalysis. *J Biol Chem*, **275**, 41087-41091.
220. Shen, A.L., Porter, T.D., Wilson, T.E. and Kasper, C.B. (1989) Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **264**, 7584-7589.
221. Shen, A.L., Sem, D.S. and Kasper, C.B. (1999) Mechanistic studies on the reductive half-reaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem*, **274**, 5391-5398.
222. Shen, S. and Strobel, H.W. (1992) The role of cytochrome P450 lysine residues in the interaction between cytochrome P450IA1 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys*, **294**, 83-90.
223. Shen, S. and Strobel, H.W. (1993) Role of lysine and arginine residues of cytochrome P450 in the interaction between cytochrome P4502B1 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys*, **304**, 257-265.
224. Shen, S. and Strobel, H.W. (1994) Probing the putative cytochrome P450- and cytochrome c-binding sites on NADPH-cytochrome P450 reductase by anti-peptide antibodies. *Biochemistry*, **33**, 8807-8812.
225. Shen, S. and Strobel, H.W. (1995) Functional assessment of specific amino acid residues of cytochrome P4501A1 using anti-peptide antibodies. *Arch Biochem Biophys*, **320**, 162-169.
226. Shimizu, T., Tateishi, T., Hatano, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (1991) Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450d by site-directed mutagenesis. Interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem*, **266**, 3372-3375.
227. Shiota, N., Kodama, S., Inui, H. and Ohkawa, H. (2000) Expression of human cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 as fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in transgenic tobacco plants. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2025-2033.
228. Sibille, N., Blackledge, M., Brutscher, B., Coves, J. and Bersch, B. (2005) Solution structure of the sulfite reductase flavodoxin-like domain from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **44**, 9086-9095.
229. Smith, G.C., Tew, D.G. and Wolf, C.R. (1994) Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8710-8714.
230. Song, N., Sedgewick, R.D. and Durand, D. (2007) Domain architecture comparison for multidomain homology identification. *J Comput Biol*, **14**, 496-516.
231. Storoni, L.C., McCoy, A.J. and Read, R.J. (2004) Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 432-438.

232. Stuehr, D.J., Tejero, J. and Haque, M.M. (2009) Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain. *Febs J*, **276**, 3959-3974.
233. Sun, Y.L., Wang, Y.H., Yan, M.M., Sun, B.Y., Xie, Y., Huang, Z.X., Jiang, S.K. and Wu, H.M. (1999) Structure, interaction and electron transfer between cytochrome b5, its E44A and/or E56A mutants and cytochrome c. *J Mol Biol*, **285**, 347-359.
234. Szczesna-Skorupa, E., Mallah, B. and Kemper, B. (2003) Fluorescence resonance energy transfer analysis of cytochromes P450 2C2 and 2E1 molecular interactions in living cells. *J Biol Chem*, **278**, 31269-31276.
235. Talfournier, F., Munro, A.W., Basran, J., Sutcliffe, M.J., Daff, S., Chapman, S.K. and Scrutton, N.S. (2001) alpha Arg-237 in *Methylophilus methylotrophus* (sp. W3A1) electron-transferring flavoprotein affords approximately 200-millivolt stabilization of the FAD anionic semiquinone and a kinetic block on full reduction to the dihydroquinone. *J Biol Chem*, **276**, 20190-20196.
236. Teillet, M.A., Ziller, C. and Le Douarin, N.M. (2008) Quail-chick chimeras. *Methods Mol Biol*, **461**, 337-350.
237. Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. and Coon, M.J. (1981) Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem*, **256**, 266-277.
238. Vermilion, J.L. and Coon, M.J. (1978a) Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem*, **253**, 8812-8819.
239. Vermilion, J.L. and Coon, M.J. (1978b) Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J Biol Chem*, **253**, 2694-2704.
240. Voznesensky, A.I. and Schenkman, J.B. (1992) The cytochrome P450 2B4-NADPH cytochrome P450 reductase electron transfer complex is not formed by charge-pairing. *J Biol Chem*, **267**, 14669-14676.
241. Wada, F., Shibata, H., Goto, M. and Sakamoto, Y. (1968) Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in omega-oxidation of fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, **162**, 518-524.
242. Walsky, R.L. and Obach, R.S. (2004) Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos*, **32**, 647-660.
243. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S. and Kim, J.J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8411-8416.
244. Wang, T.W., Zhu, H., Ma, X.Y., Zhang, T., Ma, Y.S. and Wei, D.Z. (2006) Mutant library construction in directed molecular evolution: casting a wider net. *Mol Biotechnol*, **34**, 55-68.
245. Welland, A., Garnaud, P.E., Kitamura, M., Miles, C.S. and Daff, S. (2008) Importance of the domain-domain interface to the catalytic action of the NO synthase reductase domain. *Biochemistry*, **47**, 9771-9780.
246. Welton, A.F., Pederson, T.C., Buege, J.A. and Aust, S.D. (1973) The molecular weight of NADPH-cytochrome C reductase isolated by immunoprecipitation from detergent-solubilized rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, **54**, 161-167.
247. Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*, **1**, REVIEWS3003.
248. Williams, C.H., Jr. and Kamin, H. (1962) Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J Biol Chem*, **237**, 587-595.
249. Wlodawer, A. and Hodgson, K.O. (1975) Crystallization and Crystal Data of Monellin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 398-399.
250. Wolf, Y.I., Brenner, S.E., Bash, P.A. and Koonin, E.V. (1999) Distribution of protein folds in the three superkingdoms of life. *Genome Res*, **9**, 17-26.
251. Wolf, Y.I., Kondrashov, A.S. and Koonin, E.V. (2000) Interkingdom gene fusions. *Genome Biol*, **1**, RESEARCH0013.
252. Wolthers, K.R., Basran, J., Munro, A.W. and Scrutton, N.S. (2003) Molecular dissection of human methionine synthase reductase: determination of the flavin redox potentials in full-length enzyme and isolated flavin-binding domains. *Biochemistry*, **42**, 3911-3920.

253. Wolthers, K.R., Lou, X., Toogood, H.S., Leys, D. and Scrutton, N.S. (2007) Mechanism of coenzyme binding to human methionine synthase reductase revealed through the crystal structure of the FNR-like module and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, **46**, 11833-11844.
254. Yamazaki, H., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Shimada, T. and Guengerich, F.P. (1996) Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b5. *J Biol Chem*, **271**, 27438-27444.
255. Yasukochi, Y. and Masters, B.S. (1976) Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J Biol Chem*, **251**, 5337-5344.
256. Yesylevskyy, S.O., Kharkyanen, V.N. and Demchenko, A.P. (2006) Dynamic protein domains: identification, interdependence, and stability. *Biophys J*, **91**, 670-685.
257. Yonetani, T. and Laberge, M. (2008) Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. *Biochim Biophys Acta*, **1784**, 1146-1158.
258. Yuan, L., Kurek, I., English, J. and Keenan, R. (2005) Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**, 373-392.
259. Zhang, H., Hamdane, D., Im, S.C. and Waskell, L. (2008) Cytochrome b5 inhibits electron transfer from NADPH-cytochrome P450 reductase to ferric cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem*, **283**, 5217-5225.
260. Zhang, H., Im, S.C. and Waskell, L. (2007) Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem*, **282**, 29766-29776.
261. Zhao, Q., Modi, S., Smith, G., Paine, M., McDonagh, P.D., Wolf, C.R., Tew, D., Lian, L.Y., Roberts, G.C. and Driessen, H.P. (1999) Crystal structure of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 Å resolution. *Protein Sci*, **8**, 298-306.

Résumé

Les cytochromes P450 (P450) et la NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) sont les principaux acteurs du métabolisme des xénobiotiques chez les mammifères. La CPR est une protéine multidomaine formée de deux domaines catalytiques comprenant les cofacteurs FAD et FMN et reliés par un domaine de connexion. Grâce aux propriétés rédox de ses deux flavines, la CPR est capable de scinder le flux diélectronique du NADPH en deux transferts monoélectroniques vers les P450. Jusqu'alors, la CPR avait toujours cristallisé dans une conformation dite fermée, compatible avec un transfert interne du FAD au FMN, mais dans laquelle le FMN était tellement enfouie au cœur de la protéine qu'un transfert externe vers les P450 était inenvisageable.

Le projet de cette thèse consistait à construire et analyser les caractéristiques structurales et biochimiques de CPR chimères constituées de domaines issues des CPR humaine et de levure. Ces chimères sont toujours fonctionnelles vis-à-vis d'accepteurs artificiels et naturels. Leurs constantes catalytiques, la vitesse des différents transferts d'électrons internes et externes, les potentiels standards de leurs cofacteurs ou encore leur stabilité vis-à-vis d'agents dénaturants ou de la température ont été mesurés et comparés aux caractéristiques des CPR parentales. De plus, la structure cristallographique de l'une d'elle a pu être déterminée à 2,5 Å de résolution et dans une nouvelle conformation dite ouverte. Celle-ci prouve le caractère dynamique de cette protéine multidomaine, et pourrait correspondre à la conformation de la CPR au sein du complexe bimoléculaire CPR-P450 lors du transfert externe entre le FMN et le cytochrome. Les facteurs pouvant influencer ou dicter ces changements conformationnels ont été appréhendés grâce à des analyses d'enzymologie, de cinétiques rapides, de potentiométrie ou encore de dénaturation.

Mots clés :

NADPH-cytochrome P450 réductase, protéines multidomaines, flavines, transferts d'électrons, dynamique, cristallographie, enzymologie.

LABORATOIRE D'INGENIERIE DES PROTEINES MEMBRANAIRES
CENTRE DE GENETIQUE MOLECULAIRE – CNRS
1 avenue de la Terrasse
91198 GIF-SUR-YVETTE CEDEX

POLE : INGENIERIE DES PROTEINES

UNIVERSITE PARIS-SUD 11
UFR «FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHATENAY-MALABRY CEDEX