



HAL
open science

Etude des interactions entre les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH Oxydase

Sylvie Chenavas

► **To cite this version:**

Sylvie Chenavas. Etude des interactions entre les facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH Oxydase. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00540636

HAL Id: tel-00540636

<https://theses.hal.science/tel-00540636>

Submitted on 28 Nov 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 JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I
CHIMIE & SCIENCES DU VIVANT

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université Joseph FOURIER

Discipline □ Biologie Structurale et Nanotechnologie

présentée et soutenue publiquement par

Sylvie CHENAVAS

le 10 février 2005

**Etude des interactions entre les facteurs cytosoliques
du complexe de la NADPH Oxydase**

Membres du jury □

Rapporteurs □

Dr Jamel El Benna

Dr François Penin

Examineurs □

Dr Gérard Brandolin

Dr Bernhard Brutscher

Directeurs de thèse □

Dr Franck Fieschi

Pr Eva Pebay-Peyroula

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel
au laboratoire des Protéines Membranaires

Je tiens tout d'abord à remercier Eva Pebay-Peyroula pour m'avoir accueilli dans son laboratoire des protéines membranaires depuis mon DEA. Je souhaite aussi remercier Franck Fieschi pour avoir encadré mon travail de thèse. J'ai beaucoup appris durant ces années et malgré les moments plus difficiles, nous sommes allées au bout du travail. Je voudrais dire un grand merci à Claudine Cohen-Addad pour son aide précieuse en cristallogénèse et ses nombreux conseils.

Je souhaite également remercier Bernhard Brutscher pour m'avoir «[pris sous son aile]» afin de me faire découvrir la RMN. Cela a été très agréable de travailler avec toi. Je voudrais également remercier Jean-Pierre Simorre pour son accueil dans le laboratoire de RMN, ses conseils et son aide pour nous permettre d'avancer dans l'étude structurale. Et puis, bien sûr, je tiens à remercier Pierre Gans, non seulement pour son implication dans le travail de RMN, mais aussi pour nos discussions diverses et variées.

Je voudrais aussi remercier Gérard Brandolin pour son accueil et ses conseils pour les expériences de fluorescence.

Ma thèse m'a également permis de faire de très belles rencontres. Je pense tout d'abord à Corinne et Romain. Corinne, je te remercie pour ton aide au quotidien et surtout pour notre complicité, ton soutien dans les moments les plus durs et nos fous rires... Et puis, Karine, la chance a voulu que nos routes se croisent à nouveau] merci pour ton soutien jusqu'à la fin de la thèse et pour les moments (et discussions) que nous avons partagés. J'ai également vécu cette expérience de thèse avec Virginie] camarade de la NADPH Oxydase] Merci pour ton soutien moral et bibliographique] Une autre chance a été de rencontrer Richard, le physicien, informaticien et psychologue au grand cœur. Merci Richard pour tous ces instants privilégiés (notamment avec Annie). Il y a bien sûr Antôaaane et ses nombreuses histoires... Merci pour ton aide au moment de la rédaction et pour nos moments de délire... Je pense aussi à Sylvestre (ou Sylou) qui fut mon brillant prédécesseur de la NADPH Oxydase et qui m'a suivi de loin pendant toute ma thèse. J'ai également rencontré au cours de ces années Bertrand, alias Bébert, et un peu plus tard Manou. Je remercie mes deux grimpeurs préférés pour les moments hors labo que nous avons passés ensemble. Et puis, à l'autre bout de l'institut, je pense tout particulièrement à la gentillesse de Sébastien et au réconfort de ses petits gâteaux...

Au cours de ces années, de nombreuses personnes ont su créer une ambiance de travail agréable au laboratoire comme à l'extérieur] Dominique et Anne qui ont apporté une touche de dynamisme et de gentillesse, Laurence S., Jean, Jacques, Benjamin, Laure, David, Laetitia, Eve (avec qui j'ai eu mes premières expériences d'enseignement]), Laurence B., Catherine, Dominique, Isabelle, Adrien, Pau, Patricia... Merci pour votre sourire et votre bonne humeur.

Je voudrais maintenant remercier et souhaiter une bonne fin de DEA ou de thèse à Carine (j'espère te voir danser très prochainement☺...), Hugues, Véronique, Guillaume, Meike, Pauline, Monika, Guillaume, Julien, Rémi, Hélène et Paul...

Enfin, je voudrais tout particulièrement remercier toutes ces personnes qui me sont très proches et qui ont toujours été à mes côtés durant ces quatre années. Je pense bien sûr à Denis avec qui j'ai partagé cette expérience. C'est ton soutien quotidien, ta gentillesse et ton écoute qui m'ont permis d'aller au bout de ces années. J'espère que nous raconterons nos expériences de thèse et de plongée en duo à nos enfants et petits-enfants... Je voudrais également remercier les parents de Denis qui nous ont apporté un petit coin de ciel bleu dans les moments les plus gris. Je n'oublie pas mon frère, Cyril, qui, bien qu'il soit toujours en l'air, m'a parfois remis les pieds sur terre. Merci pour ton brin de fantaisie☺ Un grand merci également à Muriel pour son soutien☺ ton écoute m'a été d'une grande aide. Et enfin, je remercie du fond du cœur mes parents qui m'ont offert la possibilité de poursuivre mes études (en pensant que cela était normal), qui m'ont apporté leur soutien et leur réconfort, une vision extérieure et un équilibre de vie... MERCI☺!

Sommaire

Abréviations

Code international des acides aminés

Avant-propos 1

Introduction	3
---------------------	----------

I Le système immunitaire – généralités 3

II L'immunité non spécifique (INS) 4

1- Les macrophages 4

2- Les leucocytes polynucléaires 6

2-a) Les leucocytes polynucléaires neutrophiles 7

2-b) Les leucocytes polynucléaires éosinophiles 8

2-c) Les leucocytes polynucléaires basophiles 9

3- Mécanismes de destruction des pathogènes 9

3-a) La réaction inflammatoire 10

3-b) La phagocytose 11

3-c) La dégranulation 12

3-d) mécanismes de destruction dépendant de l'oxygène 13

III La Granulomatose Septique Chronique 15

1- description 15

2- Modes de transmission de la maladie 16


2-a) Forme de CGD récessive liée au chromosome X 16

2-b) Forme de CGD autosomale récessive 16

3- Aspects cliniques 17

IV Présentation du complexe de la NADPH Oxydase 18

1-Le flavocytochrome b_{558} 18

1-a) la protéine membranaire gp91 ^{phox}	18
1-b) la protéine membranaire p22 ^{phox}	20
2-Les facteurs cytosoliques et la petite protéine G Rac	20
2-a) la petite protéine G Rac	20
2-b) la protéine cytosolique p47 ^{phox}	22
2-c) la protéine cytosolique p67 ^{phox}	23
2-d) la protéine cytosolique p40 ^{phox}	23
V Présentation des modules structuraux	24
1- Le domaine TPR	25
2- Le domaine SH3	26
3- Le motif polyproline	27
4- Le domaine PX	28
4-a) Domaine PX de p40 ^{phox}	29
4-b) Domaine PX de p47 ^{phox}	29
5- Le domaine PB1	31
VI Activation du complexe de la NADPH Oxydase	31
1- Interactions possibles entre les facteurs cytosoliques et identification du rôle des composants de l'oxydase	31
1-a) Interactions et rôle du facteur cytosolique p47 ^{phox}	32
1-b) Interactions et rôle du facteur cytosolique p67 ^{phox}	33
1-c) Interactions et rôle du facteur cytosolique p40 ^{phox}	34
1-d) Interactions et rôle de la petite protéine G Rac	35
2- Voie de signalisation conduisant à l'activation de la NADPH Oxydase	35
3- Activation du complexe de la NADPH Oxydase 	
assemblage à la membrane	37
4- Mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'activation	39
VII Objectifs	41

I Importance de l'interaction p67^{phox}/p40^{phox} au sein du complexe de la NADPH Oxydase	43
--	-----------

II Identification des domaines PB1	44
---	-----------

III Objectifs	47
----------------------	-----------

IV Cristallogenèse des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}	49
--	-----------

1- Cristallogenèse de la région C-terminale de p67^{phox}	49
--	-----------

1-a) Région C-terminale de p67 ^{phox}	49
--	----

1-b) Suppression du domaine SH3 C-terminal	
cristallogenèse de p67 ^{phox} seul et en complexe avec p40 ^{phox}	53

1-c) Domaine PB1 de p67 ^{phox}	57
---	----

2- Les domaines PB1 sont-ils des modules structurés	59
--	-----------

3- Pourquoi la région C-terminale de p67^{phox} ne cristallise t'elle pas	62
--	-----------

V Etude des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} par Résonance Magnétique Nucléaire	64
--	-----------

1- Pourquoi la RMN ?	64
-----------------------------	-----------

2- Objectifs de l'étude RMN	64
------------------------------------	-----------

3- Résultats de l'étude structurale des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}	65
---	-----------

3-a) Comportement des domaines PB1 en solution	65
--	----

3-b) Etude structurale de PB1 ^{p67} seul	66
---	----

3-c) Etude structurale de PB1 ^{p40} seul	70
---	----

3-d) Etude des domaines PB1 de p67 ^{phox} et p40 ^{phox} en complexe	74
---	----

3-e) Mobilité de la chaîne principale de PB1 ^{p67}	78
---	----

4- Discussion	80
----------------------	-----------

4-a) Structure et mobilité de PB1 ^{p67} seul et en complexe avec p40-Cter	80
--	----

4-b) Topologie des domaines PB1	82
---------------------------------	----

4-c) Interaction entre domaines PB1	84
-------------------------------------	----

4-c1) Base commune de l'interaction	84
-------------------------------------	----

4-c2) Spécificité de reconnaissance	87
4-c3) Comportement des domaines PB1 en solution	88
4-d) Le domaine PB1, un module ubiquitaire	92
VI Conclusion et perspectives	94

Evolution de l'interaction SH3/polyproline au cours de l'activation	97
--	-----------

I Interactions SH3/polyproline entre les facteurs cytosoliques

bilan des connaissances	97
1- Interactions motif polyproline/domaine SH3	97
2- Phosphorylation de p47^{phox}	98
3- Structure des domaines SH3 de p40^{phox} et p67^{phox}	100
4- Comparaison des domaines SH3 de p40^{phox} et p67^{phox}	103

II Objectif

III La fluorescence intrinsèque du tryptophane est-elle une technique adaptée à l'étude de l'interaction motif polyproline/SH3

IV Obtention du matériel biologique et préparation des expériences

de fluorescence	108
1- Préparation des échantillons	108
1-a) Clonage, production et purification du domaine C-SH3 ^{p67}	108
1-b) Clonage, production et purification du domaine SH3 ^{p40}	111
1-c) Préparation des peptides dérivés du domaine C-terminal de p47 ^{phox}	113
2- Conditions expérimentales	114
3- Préparation des échantillons pour les expériences de fluorescence	115

V Etude fonctionnelle de l'affinité du polyPro^{p47} pour les domaines

C-SH3^{p67} et SH3^{p40} au cours de l'activation de la NADPH Oxydase	116
1- L'effet Raman de l'eau	116

2- Contrôles des expériences de fluorescence	117
2-a) Est-ce bien la formation d'un complexe	117
2-b) Cinétique d'interaction	118
2-c) Stabilité du complexe en solution	119
3- Résultats	120
3-a) Interactions entre p47 ^{phox} et les deux autres facteurs cytosoliques	122
3-b) Effets de la phosphorylation de p47 ^{phox} sur son interaction avec les deux autres facteurs cytosoliques	123
VI Discussion	126
1- Importance de la région C-terminale	126
2- Interactions au sein du complexe cytosolique au repos	126
2-a) Différence d'affinité entre les protéines entières et les modules isolés	126
2-b) Pourquoi le domaine C-SH3 ^{p67} possède une meilleure affinité que SH3 ^{p40} pour la région C-terminale de p47 ^{phox}	127
3- Interactions entre p47^{phox} phosphorylé et les deux autres facteurs cytosoliques	128
3-a) phosphorylation de p47 ^{phox} au niveau de ses sérines 359/370	128
3-b) phosphorylation de p47 ^{phox} au niveau de sa sérine 379	129
VII Conclusion et perspectives	131

Conclusion et perspectives	133
-----------------------------------	-----

Annexes	139
----------------	-----

Annexe «Cristallogénèse»	139
Annexe «Résonance Magnétique Nucléaire»	143
1- Résonance Magnétique Nucléaire généralités	143
2- Etude structurale des domaines PB1	144

2-a) Attribution de la chaîne principale peptidique	144
2-b) Délimitation des structures secondaires	146
2-c) Orientation des brins α au sein du feuillet β	148
2-d) Détermination de la structure tridimensionnelle	148
3- Etude de l'interface d'interaction par RMN	149
Annexe «Spectroscopie de fluorescence»	151
1- Principes de la fluorescence	151
2- Etude de l'interaction protéine/protéine par fluorescence	155
3- Détermination d'une constante de dissociation	156
Séquences des protéines recombinantes	159
Matériel et méthodes	161
Amplification du fragment de gène d'intérêt	161
Ligation de l'ADN et transformation des cellules compétentes	162
Production des protéines recombinantes	163
Gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide	164
Clonage de C-SH3 ^{p67} dans le vecteur pET15b	165
Expression et purification de C-SH3 ^{p67}	166
Clonage de SH3 ^{p40} dans le vecteur pIVEX2.4	167
Expression et purification de SH3 ^{p40}	168
Clonage de p67-2SH3 dans le vecteur pET15b	169
Expression et purification de p67-2SH3	170
Clonage de p67-SH3NPB1 dans le vecteur pET15b	171
Expression et purification de p67-SH3NPB1	173
Clonage de p40-Cter dans le vecteur pIVEX2.4b	174
Expression et purification de p40-Cter	175

Formation et purification du complexe His-p67-SH3NPB1/p40-Cter	176
Clonage de PB1^{p67} dans le vecteur pET15b	177
Expression et purification de PB1^{p67}	179
Cristallogénèse	180
Protéolyse ménagée par la trypsine	181
Production de protéines marquées ¹⁵N et/ou ¹³C	182
Formation du complexe PB1^{p67}/p40-Cter	
détermination de la stoechiométrie	183
Préparation des échantillons protéiques pour les expériences RMN	184
Echanges H/D	186
Enregistrement des spectres RMN pour l'attribution	187
Mobilité du squelette de PB1^{p67}	188

Références bibliographiques	189
------------------------------------	-----

Communications scientifiques	201
-------------------------------------	-----

Abréviations

AA	Acide Arachidonique
ADN	Acide DéoxyRibonucléique
AIR	Auto Inhibitory Region (région d'auto-inhibition)
DTT	DiThioThréitol
CGD	Chronic Granulomatous Disease (granulomatose septique chronique)
CNS	Central Nervous System (système nerveux central)
cps	coups
DAG	DiAcylGlycérol
DO	Densité Optique
EDTA	acide Ethylène Diamine TétraAcétique
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide et rapide de protéines)
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanosine Exchange Factor
GTP	Guanosine TriPhosphate
Hepes	acide N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(éthanesulfonique)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IL-1	InterLeukine-1
INS	Immunité Non Spécifique
IP3	Inositol TriPhosphate
IPTG	IsoPropyl- β -D-ThioGalactopyranoside
IS	Immunité Spécifique
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Broth
LPS	LipoPolySaccharide
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation—Time OfFlight (désorption et ionisation de matrice assistées par laser—temps de vol)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MPO	MyéloPerOxydase

NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
Ni-NTA	Nickel-NitriloTriAcétate
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
NO synthase	Nitric Oxide synthase
PB1	Phox/Bem1p
PC	Phox/Cdc24p
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyEthylène Glycol
phox	<u>p</u> hagocyte <u>o</u> xydase
PI3-K	PhosphatidyInositol-3 Kinase
PIP2	PhosphatidyInositol-4,5 BiPhosphate
PIP3	PhosphatidyInositol-3,4,5 TriPhosphate
PKC	Protéine Kinase C
PLA2	PhosphoLipase A2
PLC	PhosphoLipase C
PMSF	PhenylMethyl Sulfonyl Fluoride
PolyPro ^{p47}	peptide correspondant à la région 358-372 de p47 ^{phox}
p47 ^{phox} -Cter	peptide correspondant à la région 358-390 de p47 ^{phox}
PP	polyproline
PP _{II}	PolyProline de type II
PtdIns	PhosphatidyInositol
PVDF	PolyVinyliDène Fluoride (hydrophobe)
PX	PhoX domain
PxxP	motif Proline,x,x,Proline, où x est un résidu quelconque
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rmsd	root mean squared deviation (écart quadratique moyen)
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
rpm	rotation par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophesis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS)
SH3	Src Homologie de type 3
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool

TNF Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose des tumeurs)
TPR TetratricoPeptide Repeat

Code international des acides aminés

G	Glycine	Gly
P	Proline	Pro
A	Alanine	Ala
V	Valine	Val
L	Leucine	Leu
I	Isoleucine	Ile
M	Méthionine	Met
C	Cystéine	Cys
F	Phénylalanine	Phe
Y	Tyrosine	Tyr
W	Tryptophane	Trp
H	Histidine	His
K	Lysine	Lys
R	Arginine	Arg
Q	Glutamine	Gln
N	Asparagine	Asn
E	Glutamate	Glu
D	Aspartate	Asp
S	Sérine	Ser
T	Thréonine	Thr

Avant-propos

Le complexe de la NADPH Oxydase des neutrophiles permet la destruction des pathogènes phagocytés en produisant des espèces réactives de l'oxygène. Il est composé d'une partie membranaire, le flavocytochrome b_{558} , et de facteurs cytosoliques, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, et d'une petite protéine G, Rac. L'activation du complexe se traduit par la phosphorylation des facteurs cytosoliques qui migrent alors jusqu'au flavocytochrome b_{558} . Le complexe actif ainsi formé permet le transfert des électrons du NADPH jusqu'à l'oxygène du phagosome pour former les espèces réactives de l'oxygène.

Les facteurs cytosoliques sont des protéines modulaires. Il est généralement admis que ces protéines forment au repos un complexe ternaire $p40^{\text{phox}}/p67^{\text{phox}}/p47^{\text{phox}}$. Les processus d'activation et de régulation du complexe de la NADPH Oxydase dépendent des interactions entre les modules structuraux des différents composants du système. Il est donc important de définir et de caractériser l'ensemble de ces interactions au sein du complexe au repos ou activé. Nous avons ainsi étudié les interactions entre les trois facteurs cytosoliques d'un point de vue structurale mais aussi fonctionnel.

Dans l'introduction de ce manuscrit, les différents acteurs de l'immunité non spécifique ainsi que les mécanismes de destruction des pathogènes sont présentés. Le complexe de la NADPH Oxydase joue un rôle majeur dans la défense de l'organisme. Ainsi, des mutations dans les gènes codant pour certains composants du complexe engendrent une maladie héréditaire grave, nommée Granulomatose Septique Chronique. Le rôle des facteurs cytosoliques au sein du complexe de la NADPH Oxydase est étroitement lié à leurs propriétés d'interaction conférées par leurs modules structuraux. Le point sur les données structurales décrites dans la littérature au début de mon travail de thèse ainsi que le rôle des facteurs cytosoliques sont également présentés dans cette partie.

Un second chapitre est consacré à la caractérisation de l'interaction entre $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$. Au début de ce travail, nous ne disposions d'aucune information structurale sur cette interaction. Nous savions seulement que $p67^{\text{phox}}$ interagissait par sa région C-terminale avec la région contenant le motif PC de $p40^{\text{phox}}$. Nous avons donc entrepris l'étude structurale de cette interaction par une approche cristallographique. Suite aux difficultés rencontrées, ce travail a été poursuivi par Résonance Magnétique Nucléaire.

Lors de l'activation, $p47^{\text{phox}}$ est le facteur cytosolique qui subit le plus de phosphorylations, notamment au niveau de sa région C-terminale comprenant son motif

polyproline. Ce motif étant capable d'interagir soit avec le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}, soit avec le domaine SH3 de p40^{phox}, plusieurs auteurs suggèrent que le motif polyproline de p47^{phox} change de partenaire suite à l'activation. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse. Pour cela, nous avons estimé les affinités entre le motif polyproline de p47^{phox} et les domaines SH3 C-terminal de p67^{phox} et SH3 de p40^{phox} à différents stade de l'activation, c'est-à-dire à différents degrés de phosphorylation du motif polyproline de p47^{phox}. Les résultats de ce travail, réalisé par fluorescence intrinsèque du tryptophane, ainsi que l'analyse des structures des complexes SH3 C-terminal de p67^{phox}/polyproline de p47^{phox} (Kami *et al.*, 2002) et SH3 de p40^{phox}/polyproline de p47^{phox} (réalisée par Claire Massenet au laboratoire) sont présentés dans une troisième partie.

Introduction

I Le système immunitaire □ généralités

L'organisme humain doit sans cesse lutter contre divers pathogènes tels que des bactéries, des virus ou encore des parasites. Cette défense est assurée par de nombreux mécanismes qui constituent l'immunité. Celle-ci est composée schématiquement de l'immunité spécifique (IS) et de l'immunité non spécifique (INS).

L'immunité spécifique, comme son nom l'indique, est une réponse adaptée à chaque agent pathogène. Cette voie du système immunitaire nécessite une reconnaissance préalable de l'agresseur, d'où une phase de latence de la réaction « primaire ». Cependant, il existe une mémoire de la première agression. Les infections futures par le même pathogène seront alors plus vite neutralisées, avec une réponse immunitaire plus affine et plus intense. C'est la réaction dite « secondaire » ou « anamnétique ». Les acteurs principaux de cette immunité sont d'une part les lymphocytes B, producteurs d'anticorps, responsables de la réponse immunitaire spécifique humorale. D'autre part les lymphocytes T qui, une fois activés ou sensibilisés, remplissent différentes fonctions et constituent l'immunité spécifique cellulaire (Presscott, Harley and Klein, 1995).

L'immunité non spécifique est, quant à elle, polyvalente. La présence permanente de ses acteurs, même en absence de pathogènes, lui confère une capacité de contre-attaque immédiate. Quel que soit l'agent infectieux, son mode d'action face à l'agression est toujours le même □ la phagocytose et/ou la dégranulation. Les principaux responsables de cette immunité sont donc les cellules phagocytaires, comprenant les macrophages et les leucocytes polynucléaires neutrophiles.

In vivo, il n'est cependant pas si simple de différencier ces deux immunités. En effet, l'INS est indispensable à l'activation de l'IS en lui présentant les antigènes. Inversement, les immunités spécifiques cellulaire et humorale améliorent les performances de l'INS. Ce lien étroit entre ces deux immunités est visualisé sur la Figure 1 qui souligne le rôle de l'interleukine-1 (IL-1). Ce polypeptide, produit principalement par les macrophages, stimule, entre autres, la différenciation des lymphocytes et la fonction des cellules T (Presscott, Harley and Klein, 1995).

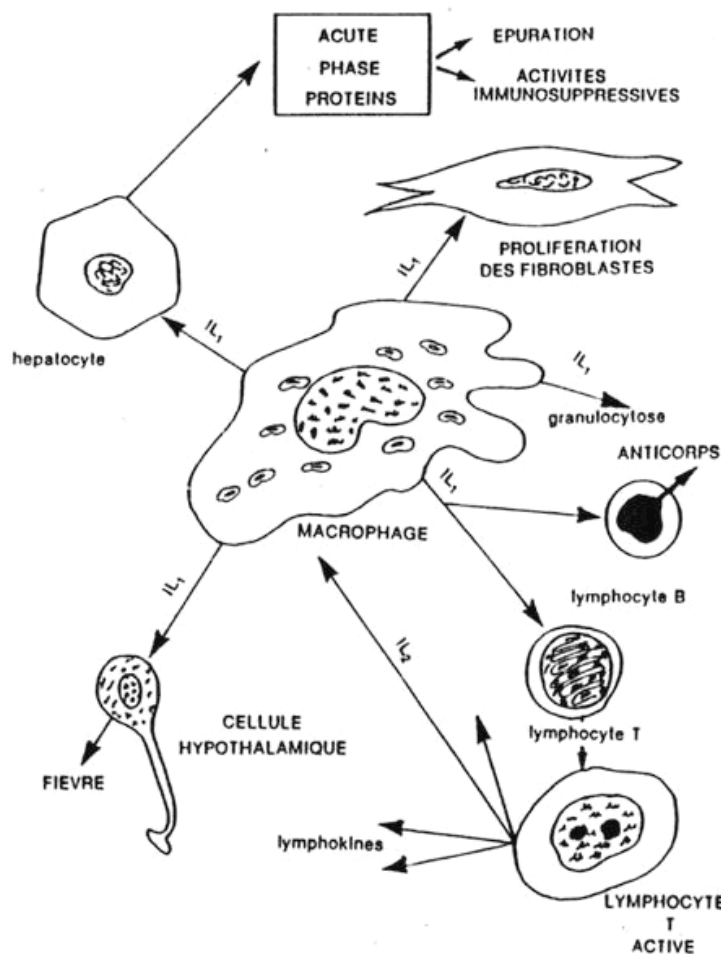


Figure 1: Complémentarité de l'immunité spécifique (IS) et non spécifique (INS) — exemple de la production de l'interleukine-1 (IL-1), peptide impliqué dans de nombreuses voies de l'immunité telles que l'activation des cellules du système immunitaire spécifique (lymphocytes T et B) (<http://anne.decoستر.free.fr/immuno/inonspe/ins.htm>).

II L'immunité non spécifique (INS)

La cytologie et la biochimie des cellules qui constituent l'INS ainsi que leurs mécanismes de destruction des pathogènes vont être présentés dans cette partie. Nous verrons que les principaux acteurs de cette immunité sont les cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles).

1- Les macrophages

Les précurseurs circulants des macrophages sont les monocytes qui, eux-mêmes, proviennent de monoblastes produits dans la moelle osseuse. Les monocytes peuvent rester

pendant de longues périodes dans la circulation sanguine. Après leur entrée dans un tissu, ils se différencient en macrophages. Ceux-ci sont placés stratégiquement, aux sites d'entrée potentiels de micro-organismes. Ils peuvent également être différenciés en cellules spécialisées dans des tissus particuliers (Figure 2). Ils sont capables d'intervenir aussi rapidement face à l'agresseur que les polynucléaires neutrophiles, autres phagocytes essentiels, avec l'avantage de pouvoir rester plus longtemps sur le site de l'inflammation, jusqu'à un ou deux jours après l'infection. Ils ont en effet une durée de vie plus longue que les neutrophiles (plusieurs mois) et la capacité de se diviser sur le site de l'infection (Abbas and Lichtman, 2003).

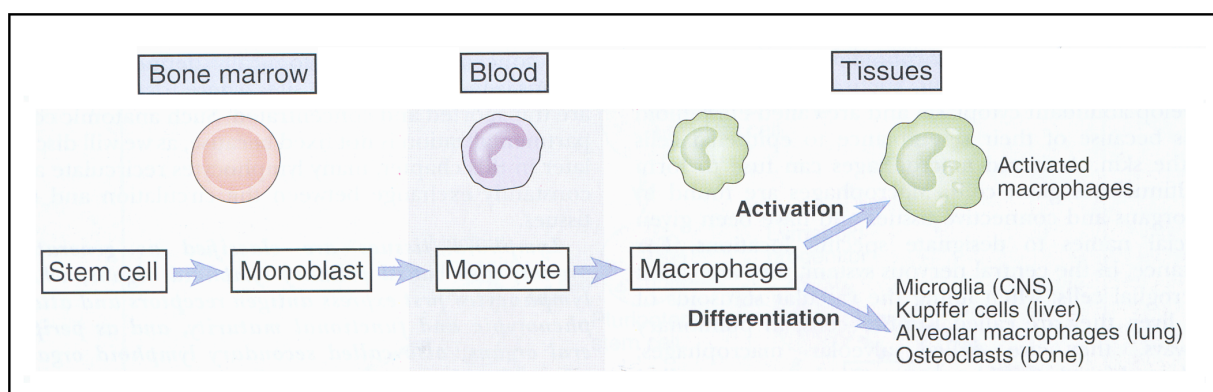


Figure 2: Maturation des phagocytes mononucléaires. Les phagocytes mononucléaires se développent dans la moelle osseuse, circulent dans le sang comme monocytes et résident dans les tissus en tant que macrophages. Ils peuvent être différenciés en cellules spécialisées dans des tissus particuliers. CNS pour système nerveux central (Abbas and Lichtman, 2003).

Les monocytes ont un diamètre compris entre 10 et 15 μm avec un noyau en forme de fer à cheval. Une fois différenciés en macrophages, leur diamètre augmente et dépasse largement les 20 μm . Ils possèdent alors des vacuoles de phagocytose (les phagosomes) et de nombreuses granules cytoplasmiques (Figure 3).

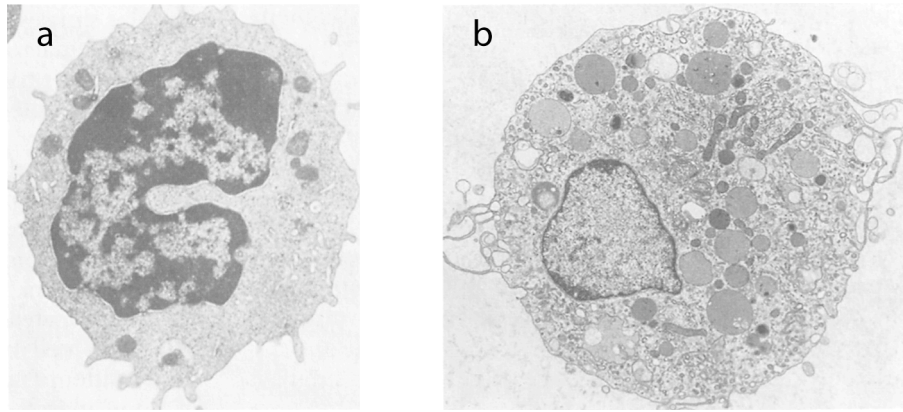


Figure 3: Morphologie d'un phagocyte mononucléaire. a) monocyte avec un noyau en forme de fer à cheval vu en microscopie électronique b) macrophage activé possédant de nombreuses vacuoles de phagocytose et des granules cytoplasmiques (Abbas and Lichtman, 2003).

Les macrophages vont permettre le recrutement des leucocytes et monocytes sur le site de l'infection. Ils vont également phagocyter les agents infectieux et intervenir directement dans leur destruction grâce à des mécanismes dépendant de l'oxygène et à la dégranulation. Ce dernier processus correspond au déversement du contenu des granules cytoplasmiques dans le phagosome. Ces granules, appelées lysosomes, renferment essentiellement des hydrolases acides, du lysozyme (qui décompose les parois bactériennes) et des protéines cationiques aux propriétés antibactériennes (Abbas and Lichtman, 2003; Roitt, Brostoff and Male, 1998).

2- Les leucocytes polynucléaires

Ces cellules, essentielles à l'immunité non spécifique, sont fabriquées dans la moelle osseuse (7 millions par minute) où elles sont stockées avant d'être libérées dans le sang. Leur recrutement sur le site de l'infection se fait lors de la réaction inflammatoire.

Par comparaison avec les monocytes/macrophages, leur durée de vie est courte 2 à 3 jours seulement.

Ces leucocytes sont appelés polynucléaires à cause de la forme de leur noyau polylobé (2 à 5 lobes réunis entre eux par de fins ponts nucléaires). Leur cytoplasme contient des granules spécifiques qui permettent de distinguer 3 types de leucocytes polynucléaires en fonction de la nature du colorant capable de les teinter. Ainsi, il existe des leucocytes polynucléaires neutrophiles (PNN), éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB) différant par leur mode d'action.

2-a) Les leucocytes polynucléaires neutrophiles

Ce sont les leucocytes polynucléaires les plus abondants (en moyenne 7400 par μL de sang) et représentent environ 95% des granulocytes (leucocytes et macrophages) circulants.

Après la phagocytose, leur action anti-infectieuse se réalise par deux types de mécanismes ceux dépendant de l'oxygène, notamment grâce au complexe enzymatique de la NADPH Oxydase situé au niveau de la membrane cytoplasmique du phagosome, et la dégranulation qui permet la dégradation du pathogène mort. Leurs granules sont de trois types les granules primaires (ou azurophiles), les granules secondaires (ou spécifiques) et les granules tertiaires (vésicules sécrétoires) (Figure 4).

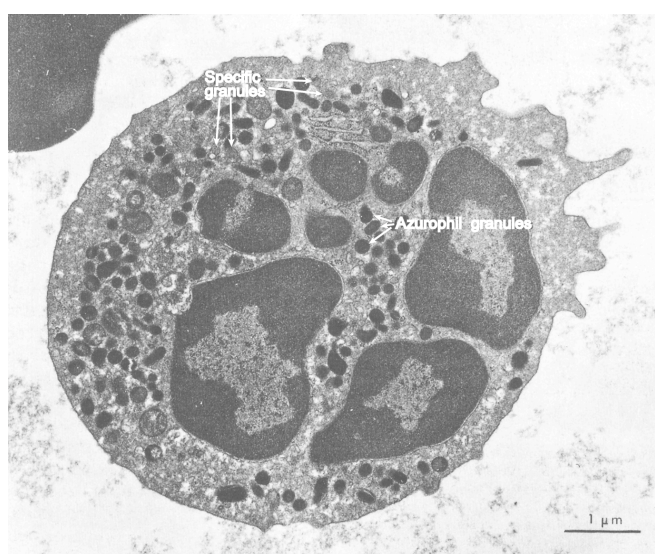


Figure 4: Morphologie d'un leucocyte polynucléaire neutrophile. Leucocyte polynucléaire neutrophile vu en microscopie électronique les lobes nucléaires et les granules cytoplasmiques (azurophiles et spécifiques) sont visibles (Roitt, 1990).

Les **granules azurophiles** sont des lysosomes qui contiennent, en plus de ceux des macrophages, une myéloperoxydase (MPO) (Roitt, Brostoff and Male, 1998). Elles doivent leur nom au fait qu'elles apparaissent en premier lors de la maturation du PN dans la moelle et qu'elles ont une affinité particulière pour le composé azure. Elles constituent le tiers des granulations du PNN. Ce sont des organites de petites taille (0,5-0,8 μm), de forme allongée et qui apparaissent très dense en microscopie électronique (Genetet, 1997).

Les **granules spécifiques** contiennent, en plus du lysozyme et d'une lactoferrine, une forte concentration de protéines antibiotiques comme, par exemple, les défensines (Roitt, Brostoff and Male, 1998). Ces sont des organites sphériques de taille inférieure à celle des granules azurophiles (environ 0,2 μm) ou en forme de bâtonnet (0,1 \times 1 μm). Ils apparaissent clairs en microscopie électronique (Genetet, 1997).

Enfin, les **granules tertiaires**, de petite taille, contiennent essentiellement des hydrolases acides.

2-b) Les leucocytes polynucléaires éosinophiles

Ces polynucléaires sont relativement peu abondants (en moyenne 200 par μL de sang) et représentent 2 à 5% des leucocytes dans le sang.

Les leucocytes polynucléaires éosinophiles humains ont généralement un noyau bilobé. Ils contiennent de nombreuses granules pouvant être teintées avec des colorants acides comme l'éosine. Chez les éosinophiles matures, ces granules sont accrochées à la membrane et possèdent un cœur cristallin visible en microscopie électronique (Figure 5).

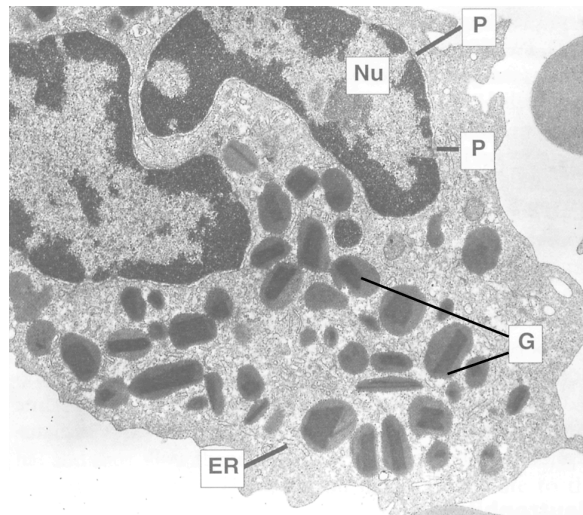


Figure 5: Morphologie d'un leucocyte polynucléaire éosinophile. Eosinophile mature vu en microscopie électronique ($\times 17500$). Le noyau (Nu) est bilobé et ses granules (G) possèdent un cœur cristallin. ER = réticulum endoplasmique. P = pore nucléaire (Roitt, Brostoff and Male., 1998).

Ces cellules sont impliquées dans de nombreux processus d'inflammation, spécialement lors d'allergies. Elles sont cependant spécialisées dans la destruction des grands parasites qui ne peuvent être phagocytés en raison de leur taille. En effet, les éosinophiles peuvent réaliser la phagocytose mais ils agissent surtout par des mécanismes de destruction extracellulaire. Une fois qu'ils ont adhéré au parasite, les granules fusionnent avec la membrane plasmique puis leur contenu est déversé autour du parasite (dégranulation).

Le cœur cristallin des granules est composé d'une protéine toxique, la MBP (Major Basic Protein). Leur matrice contient une protéine cationique spécifique, l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), capable de former des pores dans la membrane de la cellule hôte, permettant ainsi l'entrée des molécules toxiques. Une neurotoxine, l'EDN (Eosinophil-

Derived Neurotoxin) et une peroxydase, l'EPO (Eosinophil PerOxidase) (Rothenberg *et al.*, 2001).

2-c) Les leucocytes polynucléaires basophiles

Les basophiles sont trouvés en très petite quantité dans le sang (environ 40 par μL de sang) et constituent moins de 1% des leucocytes.

Ces leucocytes possèdent un noyau polylobé et des granules cytoplasmiques qui peuvent être teintées par des colorants basiques (Figure 6).

Les basophiles peuvent être recrutés sur le lieu de l'infection, généralement avec les leucocytes éosinophiles, où ils réalisent la dégranulation.

Le stimulus qui va entraîner la dégranulation est souvent un allergène (un antigène qui entraîne une réaction allergique). Les granules cytoplasmiques vont alors fusionner entre elles dans le cytoplasme puis décharger leur contenu, entre autres des peroxydases, par exocytose.

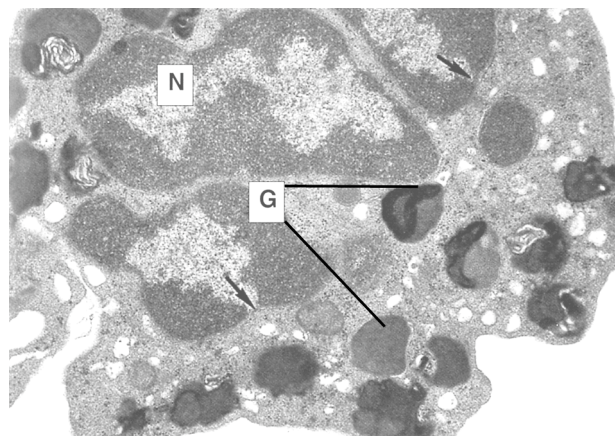


Figure 6: Morphologie d'un leucocyte polynucléaire basophile. Le basophile est vu en microscopie électronique ($\times 11000$) le noyau (N) et polylobé et ses granules (G) relativement grosses. Les flèches montrent les pores nucléaires (Roitt, Brostoff and Male., 1998).

3- Mécanismes de destruction des pathogènes

Au cours de la réaction inflammatoire, les cellules de l'immunité sont recrutées sur le site de l'infection. Selon le type de cellule, il y a ensuite phagocytose du pathogène, mécanismes de destruction dépendant de l'oxygène et/ou dégranulation.

3-a) La réaction inflammatoire

Suite à une blessure ou à une lésion produite par un agent pathogène, il se produit une réaction inflammatoire au cours de laquelle les cellules de l'immunité sont recrutées. Les leucocytes et les monocytes, contrairement aux macrophages qui résident dans les tissus, circulent dans le sang et leur recrutement sur le site de l'infection se fait en plusieurs étapes : attachement à l'endothélium vasculaire, roulement jusqu'au site de l'infection, puis ancrage et passage à travers la paroi vasculaire (la diapédèse). Ce mécanisme est initié par la présence de macrophages sur le lieu de l'infection. En effet, après avoir reconnu et phagocyté les pathogènes, ils sécrètent des chimioattractants (cytokines et chimiokines), essentiels à ce processus (Figure 7).

Les cytokines vont induire l'expression de molécules d'adhésion : les sélectines et les ligands des intégrines. De leur côté, les leucocytes possèdent à leur surface les sucres ligands de ces lectines ainsi que des intégrines.

Ainsi, dans un premier temps, l'ancrage des leucocytes à l'endothélium vasculaire se fait par l'interaction sélectine/sucre ligand. L'affinité modérée de cette interaction permet le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium par des cycles de décrochage/accrochage successifs.

Puis, les chimiokines vont passer dans le sang et se lier à leurs récepteurs présents à la surface de l'endothélium. Ces molécules vont alors activer les leucocytes en modifiant leurs intégrines. Celles-ci peuvent alors interagir fortement avec leurs récepteurs endothéliaux. Les leucocytes arrêtent ainsi leur roulement et leur cytosquelette se réorganise (étalement des cellules à la surface de l'endothélium). Les chimiokines agissent enfin sur l'adhérence des leucocytes et stimulent leur migration à travers la paroi vasculaire. C'est le phénomène de diapédèse (Abbas and Lichtman, 2003).

Il en résulte une accumulation de leucocytes puis de monocytes sur le site de l'infection. La destruction des pathogènes se déroule alors à l'aide de la phagocytose et de la dégranulation.

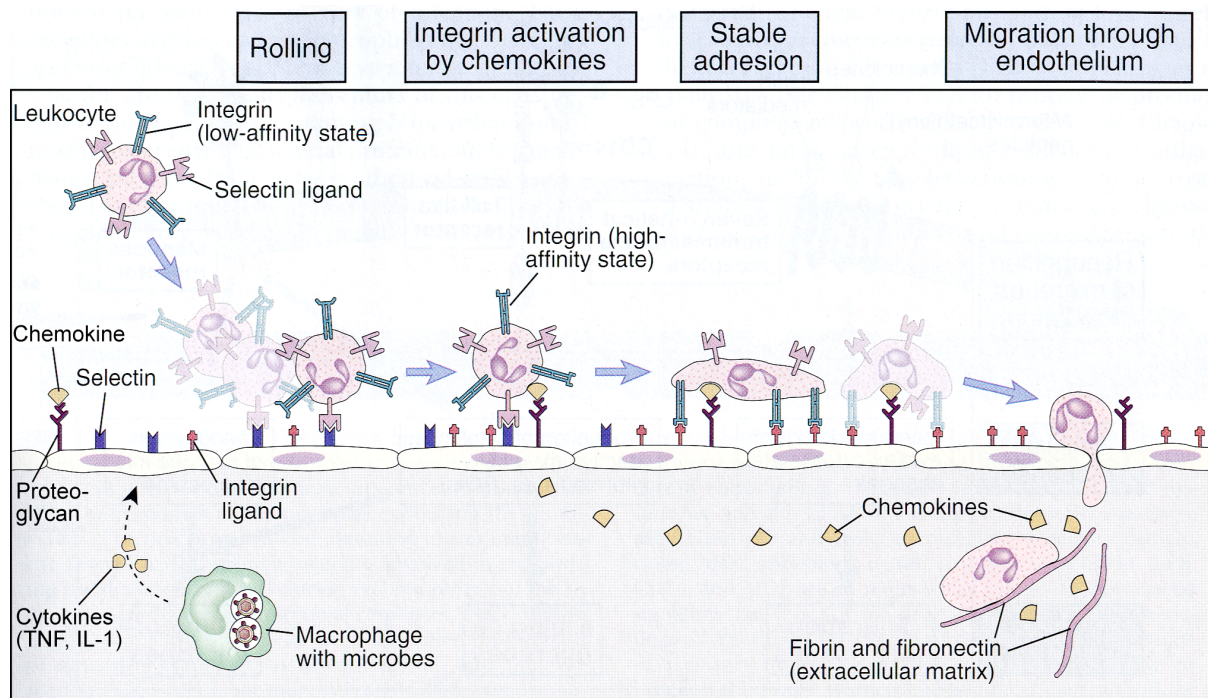


Figure 7: Recrutement des leucocytes. Sur les sites d'infection, les macrophages qui ont phagocyté les micro-organismes pathogènes, produisent des cytokines (TNF, IL-1) qui activent les cellules de l'endothélium vasculaire pour produire des sélectines, des ligands d'intégrine et des chimiokines. Les sélectines permettent une faible adhésion et le roulement des leucocytes sanguins sur l'endothélium, les intégrines permettent une adhésion forte des leucocytes et les chimiokines augmentent l'affinité des intégrines pour leurs récepteurs et stimulent le passage des cellules à travers l'endothélium jusqu'au site de l'infection. Ce mécanisme est utilisé pour migrer sur le site de l'infection par les leucocytes, les monocytes et les lymphocytes T activés (Abbas and Lichtman, 2003).

3-b) La phagocytose

Ce mécanisme est réalisé par les macrophages et une partie des leucocytes polynucléaires, les neutrophiles.

La première étape est la reconnaissance pathogène/phagocyte. Les macrophages et les neutrophiles expriment à leur surface différents récepteurs qui vont permettre la reconnaissance et l'adhésion des micro-organismes. Ces récepteurs peuvent reconnaître soit des structures bactériennes ou parasitaires comme des sucres (récepteurs de mannose) ou des lipopolysaccharides (LPS) (Abbas and Lichtman, 2003), soit des opsonines. Les opsonines proviennent d'une reconnaissance préalable de l'agent infectieux soit par l'immunité spécifique, soit par l'immunité non spécifique. Ils peuvent donc être respectivement des anticorps ou des protéines du complément (Park, 2003).

Les interactions ligand/récepteur induisent une réorganisation des microtubules et des microfilaments du phagocyte pour former des pseudopodes qui vont entourer progressivement la particule étrangère. Les pseudopodes vont ensuite fusionner pour former une vésicule de phagocytose, le phagosome, contenant le pathogène (Figure 8).

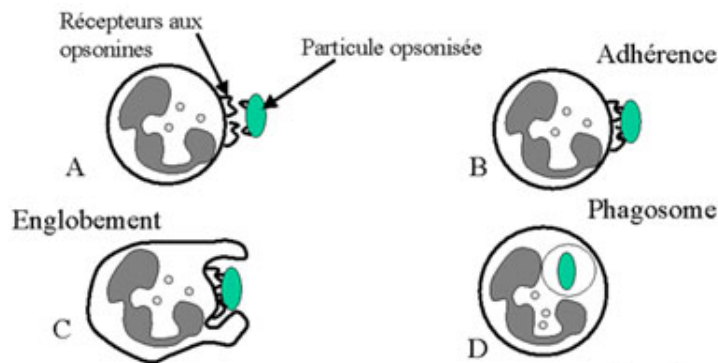


Figure 8: Phagocytose la formation du phagosome. Reconnaissance du micro-organisme opsonisé par le phagocyte (A) Adhérence (B) puis réorganisation du phagocytes pour former des pseudopodes qui enveloppent le pathogène (C) et fusion des pseudopodes pour former le phagosome (D) (<http://www.chups.jussieu.fr/polys/anapath/Cours/POLY.Chp.3&IMG28.html>).

Il y a alors activation des mécanismes de destruction des pathogènes dépendant de l'oxygène (NADPH Oxydase, NO Synthase). Le phagosome migre dans le cytoplasme puis fusionne avec la membrane des granules cytoplasmiques (mécanisme de dégranulation) pour former un phagolysosome dont le pH devient acide. Il y a enfin élimination des déchets par un mécanisme d'exocytose (Figure 9) (Reveillard, 1998).

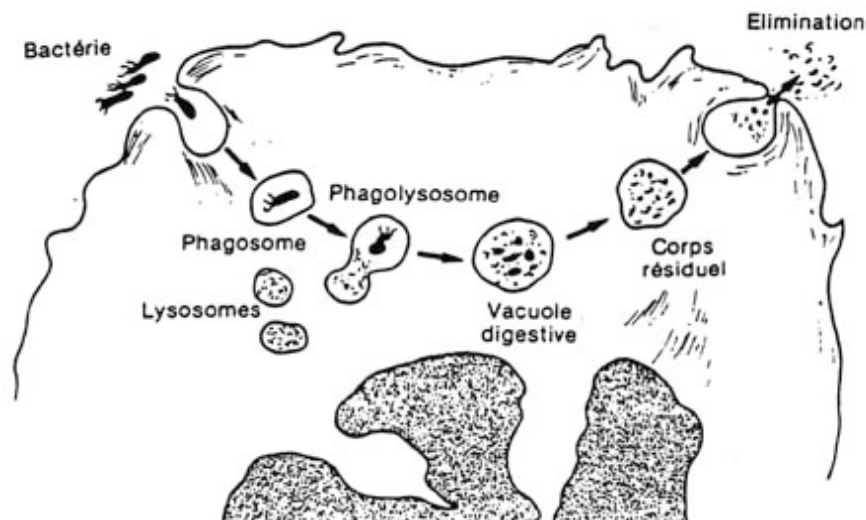


Figure 9: La phagocytose. Au cours de sa migration dans le cytoplasme, le phagosome fusionne avec la membrane des granules du phagocyte (lysosomes) pour former le phagolysosome. Il y a destruction du pathogène par des mécanismes dépendant de l'oxygène et par la dégranulation. Les déchets sont ensuite éliminés par exocytose (<http://anne.decoستر.free.fr/immuno/inonspe/ins.htm>).

3-c) La dégranulation

Lorsqu'il y a fusion des granules cytoplasmiques avec le phagosome, les granules déversent leur contenu. Selon le type de cellule (macrophage, leucocyte polynucléaire

neutrophile, éosinophile et basophile), les molécules déversées sont de natures différentes mais permettent toutes la destruction et la dégradation du pathogène.

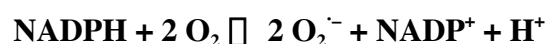
La composition des différentes granules selon le type de cellules est détaillée dans les paragraphes II-1 et II-2.

3-d) mécanismes de destruction dépendant de l'oxygène

Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles activés convertissent l'oxygène dissout dans le phagosome en espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce au complexe de la NADPH Oxydase. Ce complexe est aussi présent dans les polynucléaires éosinophiles (Segal *et al.*, 1981) et les lymphocytes B (Babior, 1999). Il existe également dans d'autres cellules non phagocytaires où les ions superoxydes produits sont impliqués dans la signalisation cellulaire (Vignais, 2002).

La NADPH Oxydase est composée d'une partie membranaire, le flavocytochrome b_{558} , et de facteurs cytosoliques. Dans les neutrophiles au repos, le flavocytochrome b_{558} est fortement associé ou inséré dans la membrane des granules spécifiques et seulement une petite fraction (10-20%) dans la membrane plasmique. En présence d'un pathogène, quelques granules spécifiques vont à la membrane plasmique et fusionnent avec elle. Celle-ci s'enrichit alors en flavocytochrome b_{558} (Borregaard *et al.*, 1983). Après internalisation du micro-organisme, le cytochrome se trouve dans la membrane du phagosome. Dans les macrophages, la majorité du flavocytochrome b_{558} est située dans la membrane plasmique avant même que la cellule soit stimulée (Johansson *et al.*, 1995).

Très rapidement après l'internalisation du pathogène par le phagocyte, le complexe de la NADPH Oxydase est activé. Il permet la réduction de l'oxygène en ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) en utilisant un par un les électrons fournis par le NADPH (Figure 10). Il catalyse la réaction suivante□



L'augmentation soudaine de la consommation d'oxygène est souvent appelée «□explosion respiratoire□». Une accélération du cycle des pentoses-phosphates permet de fournir suffisamment de NADPH pour réduire une grande quantité d'oxygène (Figure 10).

Les ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) ainsi formés sont spontanément convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en milieu acide□



A partir de l'eau oxygénée (H_2O_2), il peut se former d'autres espèces réactives de l'oxygène telles que des radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$. Dans le cas des neutrophiles, une enzyme contenue dans les granules azurophiles, la myéloperoxydase (MPO), permet la formation en milieu acide et à partir de l' H_2O_2 d'acide hypochloreux, HOCl (eau de Javel), espèce hautement toxique et essentielle dans la destruction des micro-organismes (Figure 10 et Figure 11). La réaction catalysée par la MPO est la suivante

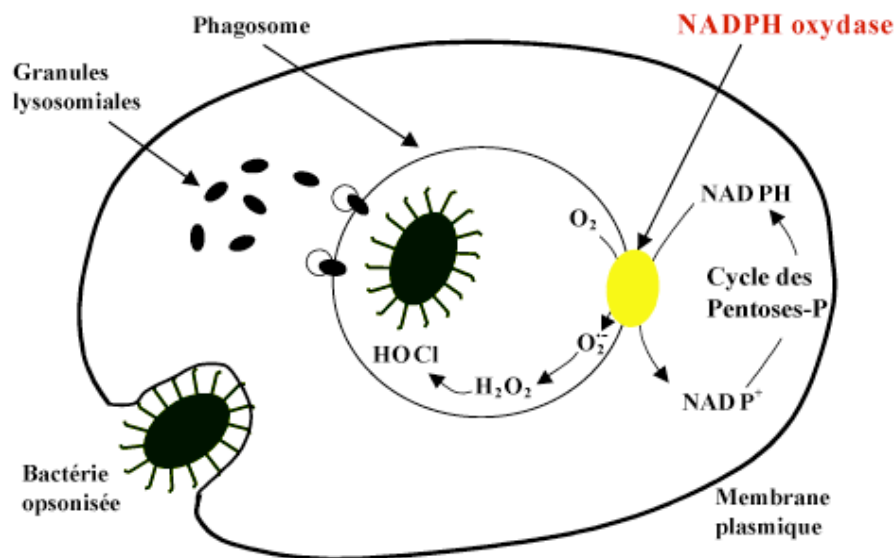


Figure 10: Explosion respiratoire et dégranulation liées à la phagocytose. Après internalisation du pathogène (ici une bactérie) et formation du phagosome, deux événements se produisent : la formation d'espèces réactives de l'oxygène, amorcée par la NADPH Oxydase, et la dégranulation, c'est-à-dire le déversement du contenu des granules cytoplasmiques dans le phagosome (Morel *et al.*, 1992).

Les ROS produits sont toxiques pour les pathogènes bien sûr mais ils sont aussi dangereux pour la cellule elle-même. C'est pourquoi elle possède des enzymes de protection comme la superoxyde dismutase ou la catalase qui les neutralisent en H_2O_2 et H_2O respectivement.

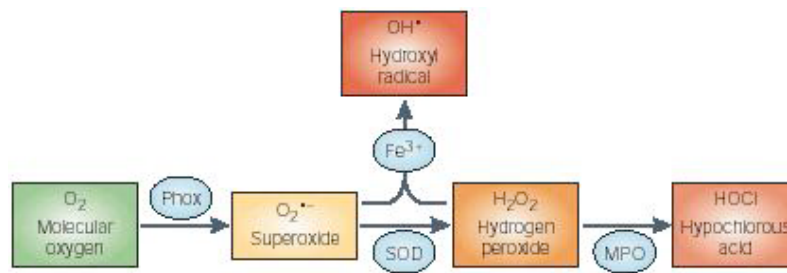


Figure 11 Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le neutrophile. La NADPH Oxydase est le point de départ de la production des ROS. Ce complexe permet la formation d'ions superoxydes qui peuvent donner des radicaux hydroxyles, en présence de Fe^{3+} , ou du peroxyde d'hydrogène. Enfin, la myéloperoxydase (MPO) permet la production d'acide hypochloreux (eau de Javel). Les couleurs indiquent le niveau de réactivité de ces ROS : le vert correspond à des molécules peu réactives, le jaune à une réactivité limitée, l'orange à une réactivité modérée et le rouge à une haute réactivité et non spécifique (Lambeth, 2004).

La NADPH Oxydase, active essentiellement chez les macrophages et les leucocytes polynucléaires neutrophiles, peut être mobilisée très rapidement pour former des espèces réactives de l'oxygène, molécules extrêmement toxiques. Ce complexe est donc un acteur essentiel de l'immunité non spécifique.

Des défauts de régulation de l'activité oxydase peuvent engendrer des troubles importants. Par exemple, il a été montré qu'une augmentation de l'activité oxydase des neutrophiles pouvait provoquer une inflammation des articulations (arthrite) (El Benna *et al.*, 2002).

Une perte de l'activité oxydase peut quant à elle entraîner de graves conséquences pour la santé, ce qui est illustré par la maladie orpheline appelée Granulomatose Septique Chronique.

III La Granulomatose Septique Chronique

1- description

La Granulomatose Septique Chronique ou CGD (Chronic Granulomatous Disease) est une maladie familiale héréditaire rare (une naissance sur un million) caractérisée par des infections graves récurrentes. Elle est due au fait que le complexe de la NADPH Oxydase des neutrophiles est non fonctionnel chez les malades. Cette perte de l'activité oxydase est due à une ou plusieurs mutation(s) dans l'un des gènes codant pour les constituants du complexe. Il

y alors perte ou inactivation de ce composant et les cellules du patient deviennent incapables de détruire les pathogènes phagocytés. Les signes de cette maladie apparaissent très précocement □ dans 70% des cas avant 1 an et rarement à l'âge adulte. La mortalité est très importante et peut même subvenir *in utero* ou dès les premières années de vie.

Les infections sont le plus souvent causées par *Staphylococcus aureus* et *eoiderlis*, des bactéries Gram (-) (*Salmonellas*, *Pseudomonas*) et des champignons du type *Aspergillus* et *Candida*. Les foyers infectieux se localisent fréquemment au niveau des poumons, des ganglions, de la peau, du foie, du tractus gastro-intestinal, des os des bras et des jambes et enfin de la sphère ORL.

2- Modes de transmission de la maladie

Il existe globalement deux types de CGD selon le mode de transmission de la maladie □ une forme récessive liée au chromosome X et une forme récessive autosomale.

2-a) Forme de CGD récessive liée au chromosome X

Cette forme de CGD est la plus courante. Elle peut atteindre jusqu'à 75% des cas en Europe et dans le Nord-américain. Ainsi, aux Etats-Unis sur 368 patients atteints de CGD recensés entre 1993 et 2000, 259 avaient une forme récessive liée au chromosome X (Winkelstein *et al.*, 2000).

Des mutations du gène codant pour l'un des composants de la NADPH Oxydase porté par le chromosome X, gp91^{phox}, sont à l'origine de cette forme de CGD. Comme un garçon (XY) ne possède qu'un seul chromosome X provenant de sa mère, s'il hérite du gène défectueux, il sera forcément malade. Par contre, une fille (XX) qui hérite d'un chromosome X de chacun de ses parents, sera uniquement porteuse de la maladie.

Cette forme de CGD est diagnostiquée très tôt, au cours des toutes premières années de vie. Elle est particulièrement sévère et possède un taux de mortalité deux à trois fois supérieur à la forme autosomale récessive.

2-b) Forme de CGD autosomale récessive

Cette forme de CGD est causée par une ou plusieurs mutation(s) dans les gènes codant pour quatre des composants de la NADPH Oxydase (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac). Chacun des parents peut transmettre un allèle muté à son enfant et ce, de façon équiprobable qu'il soit une fille ou un garçon. Si les deux parents sont porteurs d'un allèle muté, les enfants ont 50%

de risque d'être porteurs de la maladie, 25% de développer une CGD et 25% de chance d'être sains.

Ces CGD sont moins fréquentes que la forme récessive liée au chromosome X et ne peuvent être diagnostiquées qu'à un âge relativement tardif. Aux Etats-Unis, sur les 368 patients atteints de CGD recensés entre 1993 et 2000, 81 avaient une forme autosomale récessive (Winkelstein *et al.*,2000). La consanguinité est dans ce cas un facteur important. Ainsi, en Tunisie, où il existe une très forte endogamie, une fréquence particulièrement élevée des formes autosomales récessives a été rapportée (http://www.stmi.org.tn/docs/granaouina.htm#gr_septique).

3- Aspects cliniques

Pour qu'une Granulomatose Septique Chronique soit suspectée, il faut développer de nombreuses infections plus ou moins graves de façon récurrente. Par exemple, il faut avoir eu au cours d'une année au moins 8 otites ou 2 sinusites, 2 pneumonies, des abcès récurrents de la peau ou des organes ou encore plus de 2 infections graves de type méningite ou septicémie.

L'un des signes apparents de la maladie est la formation de foyers infectieux appelés granulomes. L'existence de granulomes dans différents parenchymes a donné le nom à la maladie. L'examen microscopique de ces granulomes révèle la présence de cellules géantes multi-nucléées (Figure 12). Elles résultent de la fusion de macrophages qui ont emprisonné des bactéries sans pouvoir les détruire, la NADPH Oxydase n'étant plus fonctionnelle. Ces granulomes sont généralement de petite taille (quelques millimètres de diamètre) mais ils peuvent parfois atteindre des dimensions proches d'une petite tumeur (Morel *et al.*, 1992).

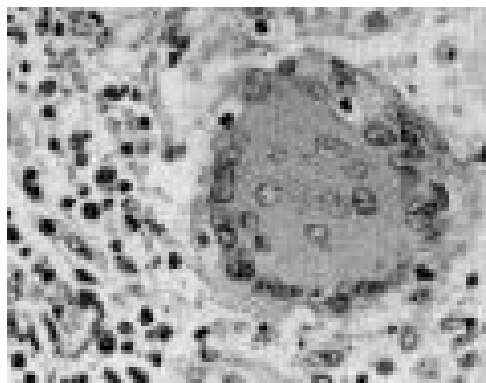


Figure 12 □ Granulome dans un tissu pulmonaire vu en microscopie photonique. La cellule géante multi-nucléée résulte de la fusion de macrophages qui renferment des bactéries qui ne sont plus détruites.

Comme illustrée par les CGD, une perte de l'activité oxydase des neutrophiles est dramatique et très vite fatale pour l'organisme. Une dérégulation de cette activité provoque également des troubles importants comme des inflammations de type arthrite. Pour pouvoir agir sur ces défauts de régulation, il est important de comprendre au niveau moléculaire les mécanismes d'activation et de régulation du complexe de la NADPH Oxydase.

Au cours de ma thèse, je me suis ainsi intéressée aux mécanismes d'activation du complexe de la NADPH Oxydase des neutrophiles humains.

IV Présentation du complexe de la NADPH Oxydase

Le complexe de la NADPH Oxydase des neutrophiles humains est constitué du flavocytochrome b_{558} , de trois facteurs cytosoliques et d'une petite protéine G.

Le flavocytochrome b_{558} , composé des protéines $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$, $phox$ pour phagocyte oxidase, est situé dans la membrane des neutrophiles. 558 correspond à la longueur d'onde (en nm) à laquelle l'hème réduit absorbe au maximum dans le visible (Vignais, 2002). Les facteurs cytosoliques $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p40^{phox}$ qui sont des protéines modulaires, ainsi que la petite protéine G Rac, sont localisés dans le cytoplasme du neutrophile au repos.

1-Le flavocytochrome b_{558}

Le flavocytochrome b_{558} est un hétérodimère composé des protéines membranaires $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$ avec une stoechiométrie 1:1 (Huang *et al.*, 1995).

1-a) la protéine membranaire $gp91^{phox}$

La protéine $gp91^{phox}$, codée par le gène *CYBB*, est composée de 570 acides aminés. Elle est fortement glycosylée, d'où son nom (gp pour glycosylated protein). Sa masse moléculaire est d'environ 91kDa mais lorsque ses liaisons aux carbohydrates sont clivées par une N-glycosylase, sa masse apparente sur gel SDS-PAGE est alors de 50-55kDa. Ses glycosylations correspondent donc au moins au tiers de sa masse totale (Vignais, 2002).

Son profil d'hydrophobicité, déduit à partir de sa séquence en acides aminés, est compatible avec une structure comportant 6 hélices α transmembranaires (Davis *et al.*, 1998) (Figure 13). Dernièrement il a été montré, par un anticorps anti-N-terminal de $gp91^{phox}$, que

cette région est localisée du côté cytoplasmique de la membrane plasmique. Ceci confirme la topologie de gp91^{phox} présenté ci-dessous (Paclet *et al.*, 2004).

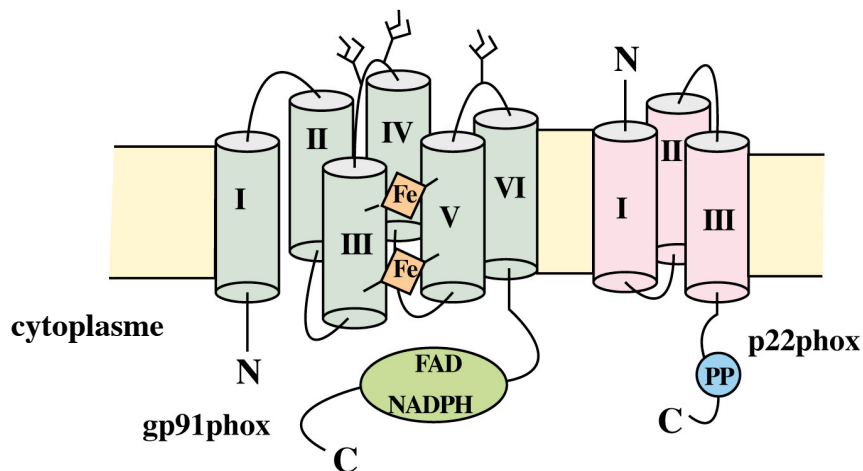


Figure 13 Topologie des composants membranaires du flavocytochrome b₅₅₈ de la NADPH Oxydase. D'après les prédictions de structures, gp91^{phox} est composé de 6 hélices α transmembranaires et p22^{phox} de 3 hélices α transmembranaires. gp91^{phox} possède un site de liaison au NADPH, un site de liaison au FAD et deux hèmes (Fe). p22^{phox} possède dans sa région C-terminale cytosolique une séquence riche en proline.

La protéine gp91^{phox} est la sous-unité du flavocytochrome b₅₅₈ qui possède les acteurs rédox du transfert d'électrons. Ainsi, il possède un site de liaison au substrat, le NADPH, un site de liaison au cofacteur FAD et deux hèmes (Nisimoto *et al.*, 1995). Une fois le complexe activé, le transfert d'électrons se réalise en deux étapes du NADPH jusqu'à l'oxygène moléculaire pour former les ions superoxydes O₂⁻ (Bokoch and Diebold, 2002)

étape 1 NADPH \rightarrow FAD : transfert d'électrons par paire

étape 2 FAD \rightarrow hèmes \rightarrow O₂ : transfert d'électrons un à un

Les mécanismes du trajet du flux d'électron du NADPH jusqu'à l'oxygène doivent encore être détaillés.

La sous-unité gp91^{phox} est le seul composant de la NADPH Oxydase impliqué dans la forme récessive liée au chromosome X de Granulomatose Septique Chronique (CGD). Cette forme correspond à environ 65% des cas de CGD. Les mutations du gène codant pour gp91^{phox} sont hétérogènes sans génotype prédominant (Jurkowska *et al.*, 2004). En effet, dans 90% des cas, les mutations sont uniques au sein d'une famille (Goldblatt and Thrasher, 2000) et peuvent être, par exemple, des mutations de type faux-sens, non-sens ou encore des défauts d'épissage (Babior, 2004) qui n'aboutissent pas à la production d'une protéine fonctionnelle.

1-b) la protéine membranaire p22^{phox}

La protéine p22^{phox}, codée par le gène *CYBA*, est composée de 195 acides aminés.

D'après le profil d'hydrophobicité, déduit de sa séquence nucléotidique, p22^{phox} possède deux voire trois hélices \square transmembranaires (Davis *et al.*, 1998). Elle possède également une queue C-terminale dans le cytosol avec une séquence riche en proline (résidus 155-160) qui représente un site de liaison à des domaines SH3 (Vignais, 2002) (Figure 13).

C'est la sous-unité du flavocytochrome b₅₅₈ qui va interagir avec p47^{phox} phosphorylé, facilitant ainsi l'ancrage du complexe cytosolique à la membrane.

Les CGD dues à des mutations dans le gène *CYBA* sont de type autosomal récessif et correspondent à 5% des cas. Ces mutations, comme celles dans *CYBB*, sont très hétérogènes.

2-Les facteurs cytosoliques et la petite protéine G Rac

Les facteurs cytosoliques, p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} sont des protéines modulaires capables d'interagir entre elles et avec le flavocytochrome b₅₅₈ lors de l'activation de la NADPH Oxydase. Chacune de ces protéines, ainsi que Rac, possède un rôle au sein du complexe. Le détail des interactions expliquant chacune de leur fonction sera présenté plus loin, dans la partie activation (VI).

2-a) la petite protéine G Rac

Les premières protéines G qui ont été mises en évidence sont les protéines G hétérotrimériques $\square\square\square$. La sous-unité \square peut lier soit du GTP, soit du GDP, d'où le nom de ces protéines qui possèdent une activité GTPasique. Il existe une autre famille de protéines G monomériques avec une masse moléculaire d'environ 20kDa qui leur vaut le nom de petites protéines G. Il existe plus de 60 petites protéines G regroupées en cinq familles. La petite protéine G Rac appartient à la famille Rho. Il existe deux petites protéines G Rac capables d'activer la NADPH Oxydase, Rac1 et Rac2. Dans les neutrophiles humains, Rac2 est majoritairement présente (pour revue, thèse de Sylvestre Grizot, 2001).

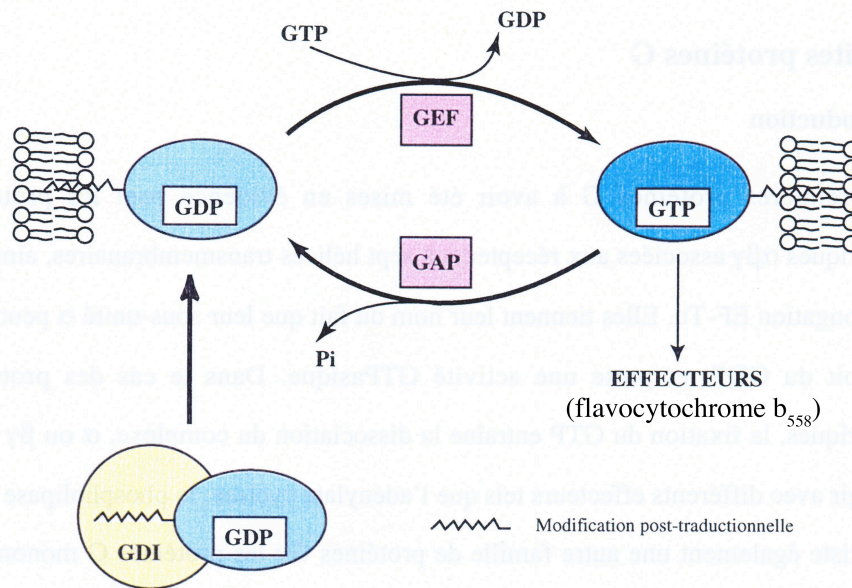


Figure 14: Schéma général du cycle des petites protéines G. La petite protéine G est représentée en bleu et la protéine GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) en jaune. GEF = Guanine nucleotide Exchange Factor, GAP = GTPase Activating Protein, Pi = phosphate inorganique.

Les petites protéines G passent d'un état inactif lorsqu'elles lient le GDP à un état actif lorsqu'elles lient le GTP. L'interaction avec un facteur d'échange GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) déstabilise le GDP qui se dissocie. Le GTP étant 10 fois plus concentré dans la cellule que le GDP, il vient s'associer préférentiellement avec la petite protéine G et provoque la dissociation du complexe GEF/protéine G. La petite protéine G se trouve alors dans son état actif. Une protéine GAP (GTPase-activating protein) permet d'augmenter l'activité GTPasique de la petite protéine G (Figure 14).

La majorité des petites protéines G possède une chaîne hydrophobe qui induit une localisation membranaire. Cette chaîne hydrophobe peut être masquée par une protéine appelée GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) qui permet ainsi la solubilisation de la protéine G et l'inhibition de la réaction d'échange GDP/GTP. Dans le cas de la famille Rho, la protéine de type GDI est appelée RhoGDI. Ainsi, dans la cellule au repos, Rac est essentiellement localisé dans le cytoplasme, associé à RhoGDI. Suite à l'activation, Rac se dissocie de RhoGDI. Il rejoint alors la membrane où il participera à l'activation du flavocytochrome b_{558} .

Un seul patient CGD provenant d'une mutation hétérozygote dans le gène codant pour Rac2 a été identifié. Cette mutation ponctuelle au nucléotide 169 (G169A) provoque le

remplacement de l'aspartate 57 en asparagine au niveau du site de liaison pour le nucléotide (GTP/GDP). Rac2 n'est alors plus capable de lier le GTP c'est un dominant négatif. Un neutrophile qui exprime ce mutant a une diminution de la mobilité cellulaire et de la production d'ions superoxydes (Williams *et al.*, 2000).

2-b) la protéine cytosolique p47^{phox}

La protéine p47^{phox} est codée par un gène localisé sur le chromosome 7. Elle est composée de 390 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 47kDa.

Elle se compose de trois types de module différents un domaine PX (PhoX), deux domaines SH3 (Src Homology 3) et un motif poly-proline (PP) (Figure 15). Elle possède également une région polybasique autrement appelée AIR pour auto inhibitory region. Ce domaine (résidus 286-340, Ago *et al.*, 1999) est impliqué dans la conformation fermée de p47^{phox} au repos.

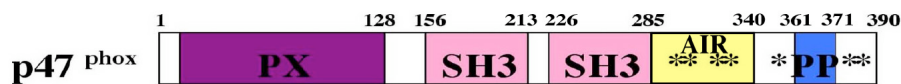


Figure 15: composition du facteur cytosolique p47^{phox}. C'est une protéine modulaire comportant un domaine PX, deux domaines SH3, un motif poly-proline (PP) et une région d'auto-inhibition (AIR) les * correspondent à des sites de phosphorylation.

Le facteur cytosolique p47^{phox} possède plusieurs fonctions au sein du complexe de la NADPH Oxydase. C'est lui qui va «sentir» l'activation en subissant de nombreuses phosphorylations. Il transloque alors les facteurs cytosoliques à la membrane et aide à leur assemblage. p47^{phox} est donc la protéine charpente responsable de l'assemblage du complexe. Il joue un rôle central dans le processus d'activation. Ainsi, les personnes chez lesquelles p47^{phox} est défectueux ou absent sont atteintes de CGD.

Les mutations dans le gène codant pour p47^{phox} sont responsables de la majorité des cas de CGD autosomales récessives, soit environ 30%. Contrairement aux autres formes de la maladie, il n'existe pas de forte hétérogénéité dans les mutations. 94% des cas de CGD avec une déficience en p47^{phox} sont dues à une seule mutation qui correspond à une délétion GT qui résulte en un codon STOP prématuré (Heyworth *et al.*, 2003).

2-c) la protéine cytosolique p67^{phox}

La protéine p67^{phox} est codée par un gène localisé sur le chromosome 1. Elle est composée de 526 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 67kDa.

Elle est constituée de 4 types de modules différents □ une répétition de 4 domaines TPR (Tetratricopeptide Repeat), deux domaines SH3 (Src Homology 3), un motif poly-proline (PP) et un domaine PB1 (Phox Bem1p) (Figure 16).

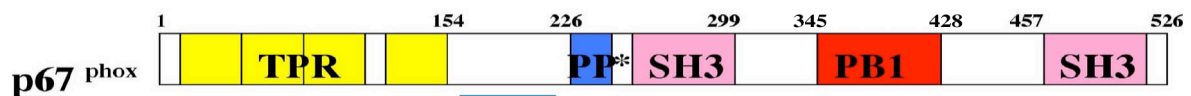


Figure 16: composition du facteur cytosolique p67^{phox}. C'est une protéine modulaire comportant une répétition de domaine TPR, deux domaines SH3, un motif poly-proline (PP) et un domaine PB1; les * correspondent à des sites de phosphorylation et la zone soulignée en bleu au domaine d'activation (199-210).

La région N-terminale de p67^{phox} a un rôle direct dans l'activation de l'Oxydase. Elle possède un domaine d'activation, entre les domaines TPR et le motif poly-proline (résidus 199-210) (Figure 16), nécessaire au transfert d'électrons. p67^{phox} est le facteur d'activation moléculaire du flavocytochrome b₅₅₈ qui fonctionne conjointement à la petite protéine G Rac.

Les CGD dues à des mutations dans le gène codant pour p67^{phox} sont de type autosomal récessif et correspondent, comme les CGD liées à p22^{phox}, à 5% des cas. Ces mutations sont également très hétérogènes, avec des mutations faux-sens, non-sens, des délétions ou encore des défauts d'épissage. Elles entraînent toutes une perte complète de l'activité oxydase (Patiño *et al.*, 1999). La fonction centrale de la partie N-terminale de p67^{phox} dans l'activation du complexe de la NADPH Oxydase est soulignée par le fait que les mutations faux-sens responsables de CGD sont majoritairement localisées dans cette région (Noack *et al.*, 1999).

2-d) la protéine cytosolique p40^{phox}

La protéine p40^{phox} est codée par un gène localisé sur le chromosome 22. Elle est composée de 336 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 40kDa.

Elle est constituée de 3 types de modules différents □ un domaine PX (PhoX), un domaine SH3 (Src Homology 3) et un domaine PB1 (Phox Bem1p) (Figure 17).

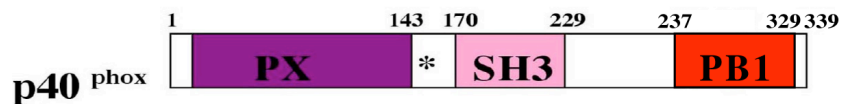


Figure 17: composition du facteur cytosolique p40^{phox}. C'est une protéine modulaire comportant un domaine PX, un domaine SH3 et un domaine PB1. Les * correspondent à des sites de phosphorylation.

Le rôle de p40^{phox} dans l'activation de l'oxydase reste incertain. Paradoxalement, il existe presque autant de publications qui proposent pour p40^{phox} un rôle d'inhibiteur de l'oxydase (Sathyamoorthy *et al.*, 1997; Vergnaud *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2004) que de publications qui proposent un rôle d'activateur (Tsunawaki *et al.*, 1996; Cross, 2000; Kuribayashi *et al.*, 2002). De plus, des résultats opposés ont été trouvés en utilisant le même matériel biologique (les cellules K562) (Sathyamoorthy *et al.*, 1997; Kuribayashi *et al.*, 2002).

A ce jour, il n'existe pas de CGD liées à des mutations du gène codant pour p40^{phox}. Cette protéine a toutefois été associée au complexe de la NADPH Oxydase. D'une part, parce qu'elle est co-purifiée avec le facteur cytosolique p67^{phox} et d'autre part, parce que sa présence induit des effets sur l'activité oxydase. De plus, les patients atteints de CGD liée à une perte de p67^{phox}, perdent également p40^{phox} (Tsunawaki *et al.*, 1994). Il existe donc un lien étroit entre ces deux facteurs cytosoliques.

V Présentation des modules structuraux

Les facteurs cytosoliques qui composent le complexe de la NADPH Oxydase sont des protéines modulaires. Parmi l'ensemble des facteurs cytosoliques, il existe 5 types de domaines différents: le domaine TPR (Tetratricopeptide Repeat), le motif PP (PolyProline), le domaine PX (PhoX), le domaine SH3 (Src Homology 3) et le domaine PB1 (Phox Bem1p) (Figure 18). Ces modules confèrent aux protéines des propriétés d'interaction de type protéine/protéine ou protéine/lipide qui permettent la formation du complexe actif de la NADPH Oxydase à la membrane.

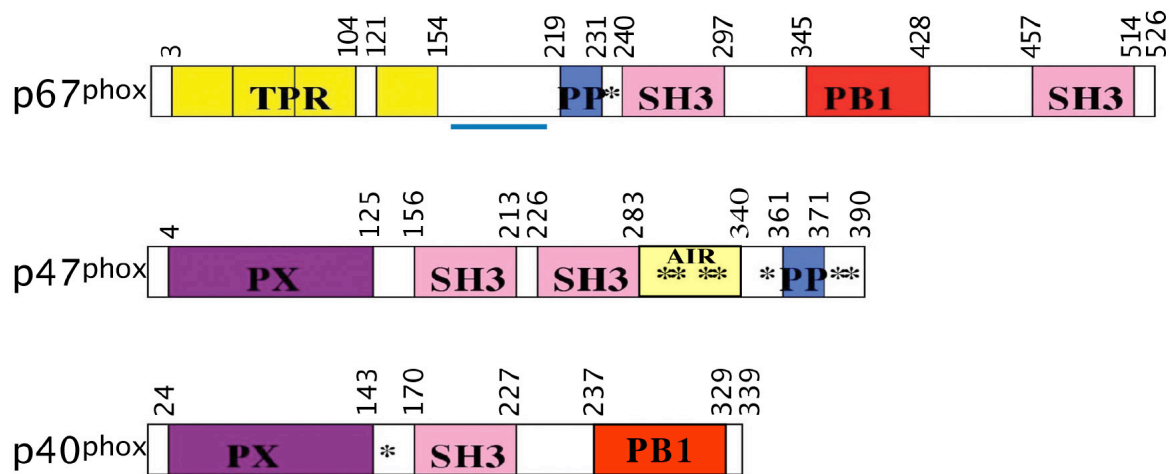


Figure 18: Les facteurs cytosoliques des protéines modulaires. Il existe au sein de l'ensemble des facteurs cytosoliques 5 types de modules différents le motif TPR (TetratricoPeptide Repeat), le motif PP (Poly-Proline), le domaine PX (PhoX), le domaine SH3 (Src Homology 3) et le domaine PB1 (Phox Bem1p). La région de p67^{phox} soulignée en bleu correspond au domaine d'activation (199-210).

1- Le domaine TPR

Un motif TPR (TetratricoPeptide Repeat) est un motif de 34 acides aminés.

Au sein du complexe de la NADPH Oxydase, p67^{phox} est le seul facteur à posséder ce type de motif dans sa séquence. Sa région N-terminale est composée d'une répétition de quatre motifs TPR qui forme le domaine TPR de p67^{phox}. Les trois premiers motifs (résidus 3-36, 37-70, 71-104) sont contigus, alors que le quatrième (résidus 121-154) est séparé du troisième par 16 résidus. La structure cristallographique haute résolution (1,8 Å) de la région N-terminale de p67^{phox} (résidus 1-213), comprenant les quatre motifs TPR, a été résolue au laboratoire (Grizot *et al.*, 2001) (Figure 19).

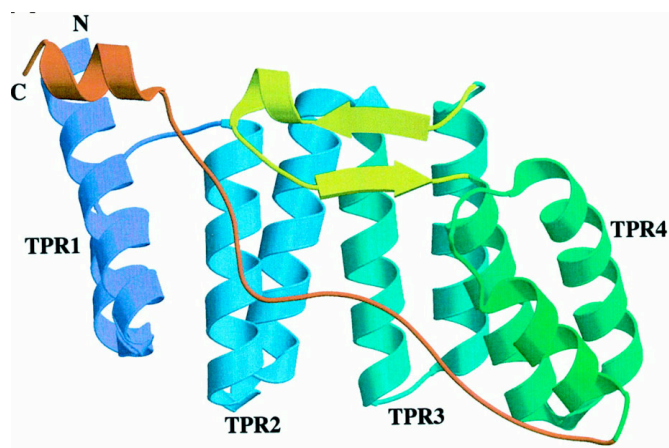


Figure 19: Représentation en ruban de la structure cristallographique de la région N-terminale de p67^{phox} (résidus 1-213). Les quatre motifs TPR (TPR1, TPR2, TPR3 et TPR4) sont représentés du bleu au vert. La région entre TPR3 et TPR4 forme deux brins antiparallèles (en vert clair). La partie C-terminale est représentée en rouge (Grizot *et al.*, 2001, code PDB 1HH8).

Chaque motif TPR est constitué de deux hélices \square antiparallèles. L'ensemble des quatre motifs TPR de p67^{phox} se structurent en super-hélice et forment un sillon hydrophobe. L'insert de 16 résidus entre TPR3 et TPR4 n'affecte pas l'organisation relative de TPR4 par rapport aux trois autres motifs. Il forme un petit feuillet \square qui sert de plateau pour l'interaction avec Rac. La région C-terminale du domaine TPR de p67^{phox} est bloquée dans le sillon hydrophobe. Ceci permet de positionner le domaine d'activation qui se structure en courte hélice \square (Figure 19).

2- Le domaine SH3 (pour revue, Mayer, 2001)

Le domaine SH3 (Src Homology 3) est un petit domaine structural de 60 à 70 acides aminés présent de façon ubiquitaire dans les cellules eucaryotes. Dans le génome humain, plus de 500 domaines SH3 ont été identifiés. Ces domaines vont permettre des interactions de type protéine/protéine dans une variété de processus biologiques. De nombreuses structures de domaine SH3 ont été résolues par cristallographie ou par Résonance Magnétique Nucléaire. L'une de ces structures est celle du domaine SH3 de la protéine Sem-5 (sex muscle abnormal), du nématode *Caenorhabditis elegans*. Cette protéine est impliquée dans la signalisation cellulaire, en particulier lors de la migration des cellules musculaires sexuelles. La structure cristallographique à haute résolution (2Å) du domaine SH3 C-terminal de Sem-5 est représentative des domaines SH3 en général (Figure 20) (Lim *et al.*, 1994). Ces domaines sont composés des mêmes éléments structuraux. Ce sont des structures compactes, formées de cinq brins \square (\square a à \square e) organisés en deux feuillets \square perpendiculaires de trois brins chacun, le brin \square b étant à cheval sur les deux feuillets. Les extrémités N- et C- terminales sont proches l'une de l'autre et localisées à l'opposé de la surface de liaison avec le ligand. Un domaine SH3 peut donc être inséré dans une protéine et avoir son site d'interaction accessible. Trois boucles connectent les brins \square entre eux. La plus grande est la boucle RT située entre les brins \square a et \square b. Cette boucle est importante pour la spécificité de reconnaissance du motif PxxP partenaire (Lim *et al.*, 1994 \square Feng *et al.*, 1994). Deux autres boucles plus courtes, la boucle n-Src et la boucle distale, connectent les brins \square b/ \square c et \square c/ \square d respectivement. Enfin, une courte hélice 3_{10} sépare les deux derniers brins \square d et \square e (Figure 20A).

Les domaines SH3 reconnaissent des séquences riches en proline, appelées polyproline, détaillées dans la partie suivante. La surface d'interaction avec les motifs

polyproline correspond à une surface concave hydrophobe peu profonde définie par des résidus aromatiques conservés (Mayer, 2001) (Figure 20B).

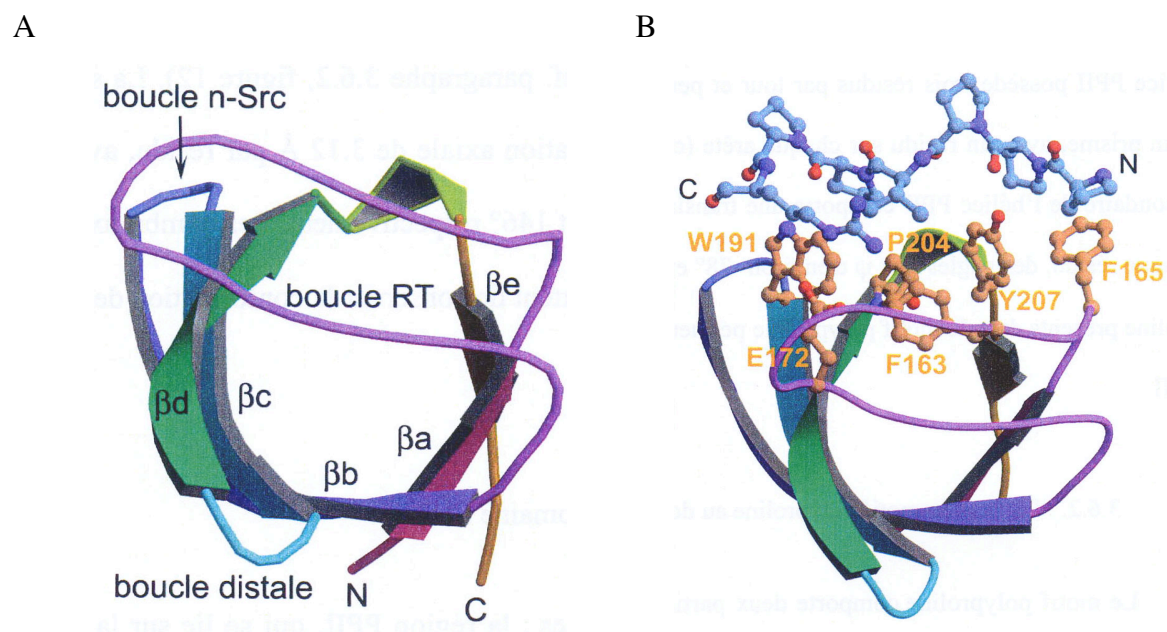


Figure 20: Représentation en ruban de la structure cristallographique du domaine SH3 C-terminal, de la protéine Sem-5, seul (A) et complexé (B) avec le peptide polyproline PPPVPPRRR dérivé de la protéine mSos. (A) Les éléments de structure secondaire (brins β a à β e), les boucles ainsi que les extrémités N- et C-terminales sont indiqués. (B) Le polyproline est représenté en bleu et les résidus du domaine SH3 en interaction avec le PP en jaune (Lim *et al.*, 1994, code PDB 1SEM).

Au sein du complexe de la NADPH oxydase, l'ensemble des facteurs cytosoliques possède au moins un domaine SH3 (Figure 18). La structure des domaines SH3 en tandem de p47^{phox} a été résolue par RMN et par diffraction des rayons X en complexe avec différents ligands (Yuzawa *et al.*, 2004 Groemping *et al.*, 2003). La structure du domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} a été résolue en solution en complexe avec le polyproline de p47^{phox} (Kami *et al.*, 2002). Enfin, la structure cristallographique du domaine SH3 de p40^{phox} seul et en complexe avec le polyproline de p47^{phox} a été résolue au laboratoire par Claire Massenet. L'analyse de cette structure et des interactions SH3^{p40}/polyproline à différents stades de phosphorylation feront l'objet d'un chapitre de cette thèse.

3- Le motif polyproline

Les domaines SH3 se lient avec une constante de dissociation de l'ordre de la dizaine de μ M à des séquences protéiques riches en proline (ou polyproline). Ces séquences contiennent très souvent un motif consensus PxxP où x est un acide aminé quelconque (Ren *et*

al., 1993). La liaison SH3/polyproline est donc impliquée dans des interactions de type protéine/protéine. Leur affinité modérée permet une dynamique d'interactions entre les partenaires. C'est pourquoi, ce type d'interaction est fréquemment rencontré dans les voies de transduction du signal.

Le motif polyproline forme une hélice de type II (PP_{II}) dont l'orientation dépend des résidus basiques qui encadrent ce motif. Il s'agit d'un polyproline de classe I lorsqu'ils sont placés en N-terminal du motif PxxP (R/KxxPxxP) et de classe II lorsqu'ils sont placés du côté C-terminal (PxxPxR/K) (Lim *et al.*, 1994). La structure de l'hélice PP_{II} est particulière avec trois acides aminés par tour. Elle peut être visualisée comme s'enroulant autour d'un prisme avec un résidu sur chaque arête. L'une des faces de cette hélice interagit avec les résidus hydrophobes présents à la surface du domaine SH3 (Figure 20B) alors que l'autre arête permet de stabiliser l'hélice PP_{II} (Pawson, 1995). La spécificité d'interaction SH3/Polyproline peut être déterminée par un résidu du motif polyproline ou du domaine SH3 ou encore, par une séquence peptidique d'interaction additionnelle qui est attenante au polyproline (Mayer, 2001).

Les facteurs cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} de la NADPH Oxydase possèdent chacun un motif polyproline \square^{361} PQPAVPPRPSA³⁷¹ et ²¹⁹PLQPQAAEPPPRP²³¹ respectivement. Il existe également des motifs polyproline inclus dans les domaines PX de p47^{phox} et p40^{phox}.

4- Le domaine PX

Le domaine PX (PhoX) est un domaine de 120 acides aminés présent dans plus de 50 protéines humaines. Il reconnaît la tête polaire de lipides membranaires de type phosphoinositides (PtdIns). Les PtdIns diffèrent selon l'état de phosphorylation de leur tête polaire. Les domaines PX reconnaissent spécifiquement un type de PtdIns mais au sein de ces domaines, il existe une grande diversité de PtdIns reconnu. L'architecture globale des domaines PX est composée d'un feuillet \square formé de 3 brins antiparallèles avec un sous-domaine composé de 4 hélices \square (Figure 21 et Figure 22A). La majorité de ces domaines contiennent dans leur séquence un motif polyproline. Ils peuvent donc interagir avec des domaines SH3. Ceci suggère un mode de régulation dans lequel le domaine PX serait inaccessible aux lipides membranaires par une interaction avec un domaine SH3. Ce type de régulation est d'ailleurs proposé pour p47^{phox} (Karathanassis *et al.*, 2002).

Au sein du complexe de la NADPH Oxydase, un domaine PX est présent dans la région N-terminale de p40^{phox} (résidus 24-143) et de p47^{phox} (résidus 4-125). Chacune de ces protéines possède une spécificité pour des phosphoinositides différents.

4-a) Domaine PX de p40^{phox}

Le domaine PX de p40^{phox} lie spécifiquement le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P). Sa structure cristallographique à haute résolution (1.7Å) lié au PtdIns(3)P, représentée en surface, montre une poche chargée positivement dans laquelle le lipide membranaire vient se loger (Bravo *et al.*, 2001) (Figure 21B). Le domaine PX de p40^{phox} possède un motif polyproline de classe II dont la séquence est ⁸⁸PTLPAK⁹³. Le facteur cytosolique p40^{phox} possède donc la séquence consensus de liaison à un domaine SH3 au niveau de son domaine PX.

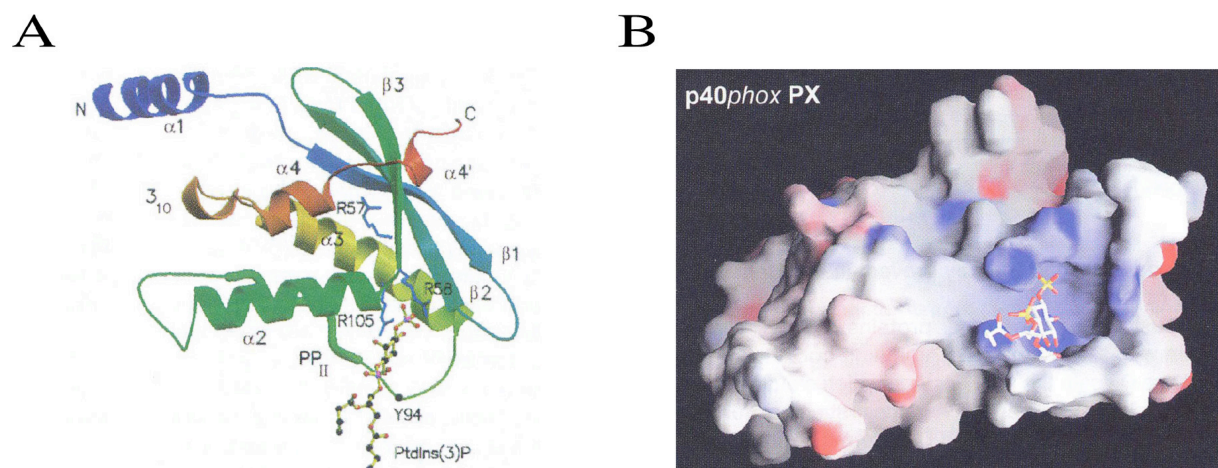


Figure 21 Structure cristallographique du domaine PX de p40^{phox} co-cristallisé avec du Phosphatidylinositol 3-Phosphate. (A) Représentation en ruban de la structure cristallographique du domaine PX de p40^{phox} lié au Phosphatidylinositol 3-Phosphate. La protéine est colorée du bleu (région N-terminale) au rouge (région C-terminale). Les éléments de structure secondaire sont indiqués dont l'hélice polyproline (PP_{II}). Les arginines conservées dans les domaines PX (R57, R58, et R105) sont représentées en bâtonnets cyans et le Phosphatidylinositol 3-Phosphate (PtdIns(3)P) est représenté en bâtonnets jaunes (Bravo *et al.*, 2001, code PDB 1H6H). (B) Surface moléculaire du domaine PX de p40^{phox} lié au Phosphatidylinositol 3-Phosphate. La surface moléculaire est colorée selon le potentiel électrostatique. Les résidus basiques (en bleu) forment la poche qui interagit avec le lipide, représenté en bâtonnets (Yaffe, 2002).

4-b) Domaine PX de p47^{phox}

Le facteur cytosolique p47^{phox} a la particularité de posséder deux sites de liaison aux lipides. Il peut ainsi interagir avec le phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P₂) et

l'acide phosphatidique ou la phosphatidyl-serine (Stahelin *et al.*, 2002). Ces deux sites de liaison fonctionnent indépendamment mais de façon coopérative. Les phosphoinositides étant phosphorylés différemment, ceci suggère que le domaine PX de p47^{phox} est capable d'intégrer des signaux provenant de chemins différents de la phosphorylation des lipides (Yaffe, 2002). La structure cristallographique à haute résolution (2Å) du domaine PX de p47^{phox}, représentée en surface, montre deux ions sulfate qui ont été co-cristallisés et qui représentent les deux sites de liaison aux phospholipides (Karathanassis *et al.*, 2002) (Figure 22B). Ces anions sont situés dans des poches basiques séparées par une boucle qui pourrait permettre l'insertion du domaine PX dans la membrane (Stahelin *et al.*, 2002). Entre ces deux poches, le domaine PX possède également un motif polyproline de classe I dont la séquence est ⁷⁰RIPHLP⁷⁶. Le facteur cytosolique p47^{phox} possède donc la séquence consensus de liaison à un domaine SH3 au niveau de son domaine PX.

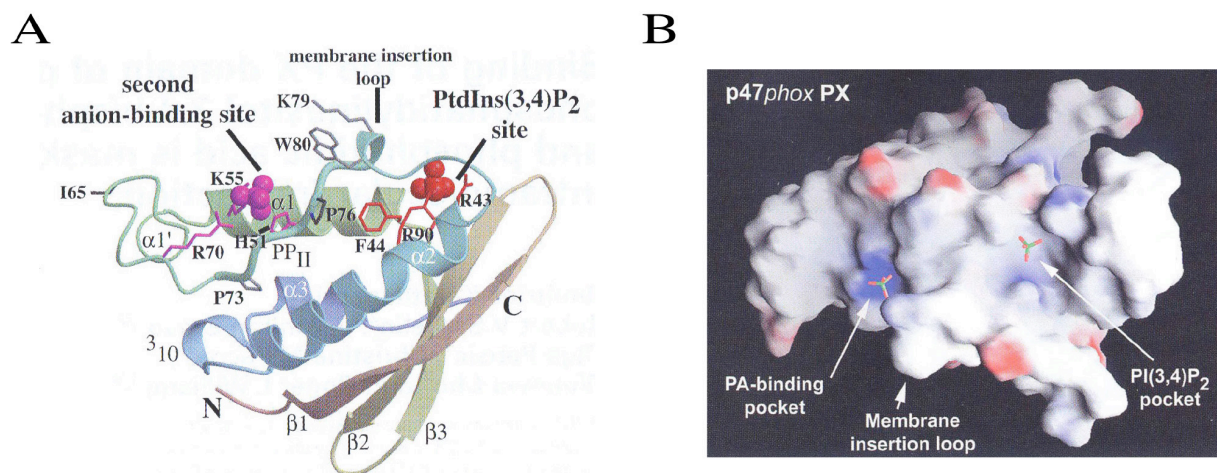


Figure 22: Structure cristallographique du domaine PX de p47^{phox}. Ce domaine a été co-cristallisé avec deux ions sulfates provenant de la solution de cristallisation et qui représentent deux sites potentiels de liaison à des phospholipides. (A) Représentation en ruban de la structure cristallographique du domaine PX de p40^{phox} avec les deux ions sulfates. La protéine est colorée du marron (région N-terminale) au bleu (région C-terminale). Les éléments de structure secondaire sont indiqués dont l'hélice polyproline (PP_{II}). Les résidus situés dans la poche à phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P₂) sont indiqués en rouge et les résidus situés dans la poche d'interaction avec le second anion sont colorés en magenta. Les deux anions placés dans les poches basiques sont représentés en bâtonnets en CPK (Karathanassis *et al.*, 2002, code PDB 107K). (B) Surface moléculaire du domaine PX de p47^{phox} lié aux ions sulfate. La surface moléculaire est colorée selon le potentiel électrostatique. Les résidus basiques (en bleu) forment deux poches qui interagissent avec les anions (représentés en bâtonnets) qui correspondent pour l'un au phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI(3,4)P₂) et pour l'autre à l'acide phosphatidique (PA). Les deux poches sont séparées par une protubérance qui peut être la zone d'insertion dans la membrane (Yaffe, 2002).

5- Le domaine PB1

Ce domaine permet des interactions de type protéine/protéine dans de nombreux systèmes biologiques. Cette famille grandissante de domaines structuraux n'était pas encore clairement définie au début de mon travail de thèse. Lorsque je suis intéressée à l'interaction entre la région C-terminale de p40^{phox} et p67^{phox}, nous savions seulement que la région inter-SH3 de p67^{phox} interagissait avec la région contenant le motif PC (PC pour Phox/Cdc24p) de p40^{phox}. Puis, ces régions se sont précisées avec la découverte des domaines PB1. Une partie de ce manuscrit sera consacrée à la présentation de ces domaines.

Au début de mon travail de thèse, les domaines qui composent les facteurs cytosoliques de la NADPH Oxydase sont donc bien définis, exceptés les domaines PB1 de p40^{phox} et p67^{phox}. Chacun de ces modules structuraux possède des propriétés d'interaction étroitement liées avec leur rôle au sein de la NADPH Oxydase et du processus d'activation.

VI Activation du complexe de la NADPH Oxydase

Nous avons vu que les facteurs cytosoliques sont des protéines modulaires, dont les modules structuraux permettent le plus souvent des interactions de type protéine/protéine. Plusieurs interactions entre les modules des facteurs cytosoliques ont été décrites *in vitro*. Ces interactions, étroitement liées au rôle de chaque facteur cytosolique dans le fonctionnement de l'oxydase, vont être présentées ici. Nous verrons ensuite les voies de signalisation qui conduisent à l'activation de la NADPH Oxydase, comment se traduit cette activation et quels sont les mécanismes moléculaires mis en évidence à ce jour.

1- Interactions possibles entre les facteurs cytosoliques et identification du rôle des composants de l'oxydase

Dans le neutrophile au repos, les facteurs cytosoliques peuvent interagir entre eux par le biais de leurs domaines structuraux. A l'heure actuelle, il est encore difficile de donner avec certitude l'organisation exacte des protéines entre elles. Cependant, de nombreuses interactions possibles entre les modules sont décrites, et certaines permettent d'identifier le rôle des facteurs cytosoliques dans l'activité oxydase.

Il existe deux types d'interaction entre les facteurs cytosoliques : des interactions de type SH3/PP entre p47^{phox} et p40^{phox} et entre p47^{phox} et p67^{phox} et une interaction de type PB1/PB1 entre p40^{phox} et p67^{phox} (Figure 23). Les interactions présentées ci-dessous ont été mises en évidence par des techniques *in vitro*.

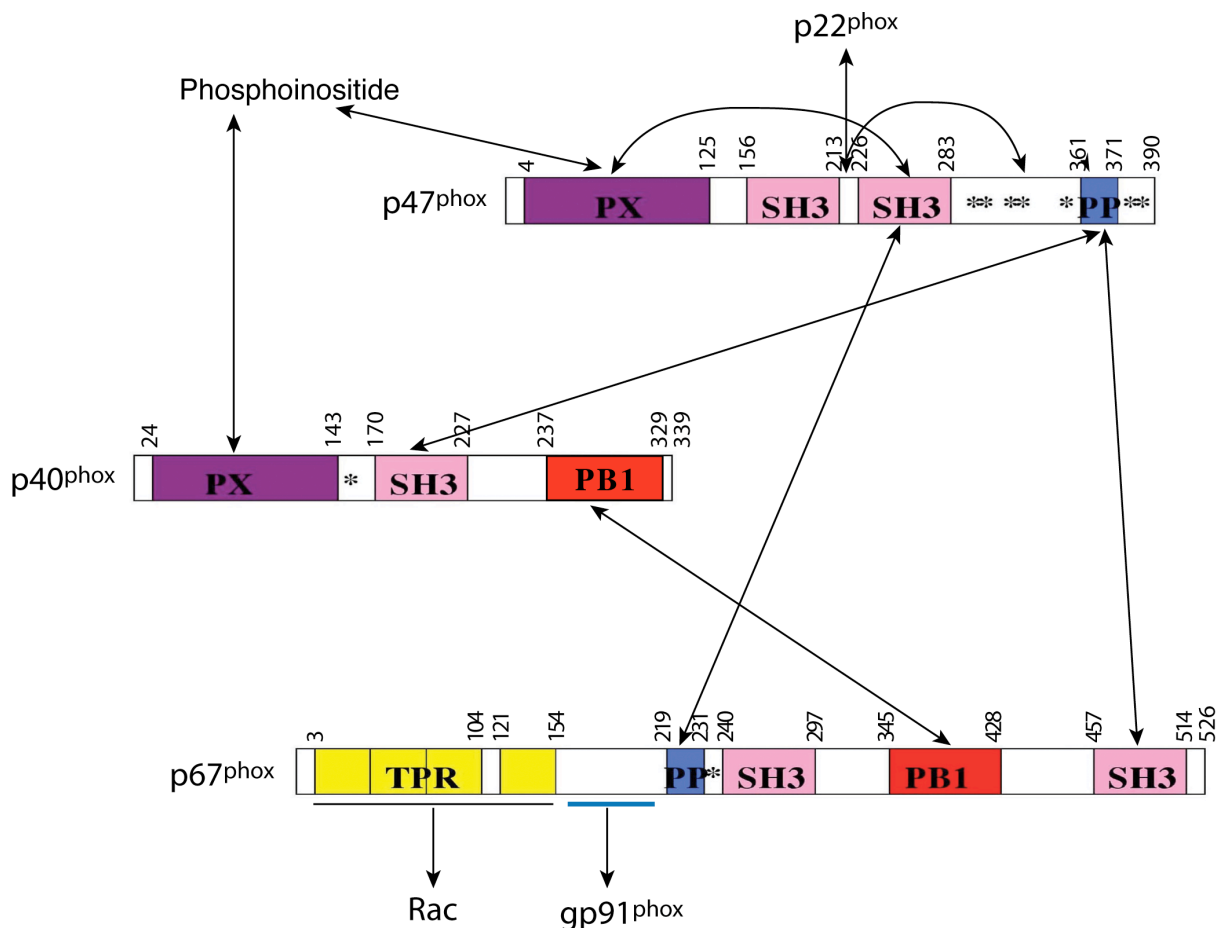


Figure 23: Interactions au sein du complexe de la NADPH Oxydase. La séquence des modules PX (PhoX), SH3 (Src Homology 3), PP (PolyProline), PB1 (Phox Bem1p) et TPR (Tetratricopeptide Repeat) des différents facteurs cytosoliques est délimitée. Les * correspondent aux sites de phosphorylation, la zone soulignée en bleu au domaine d'activation (199-210) et les interactions sont schématisées par des flèches.

1-a) Interactions et rôle du facteur cytosolique p47^{phox}

Le facteur cytosolique p47^{phox} possède plusieurs sites d'interaction au sein du complexe de la NADPH Oxydase. Au repos, il est capable d'interagir avec le domaine SH3 de p67^{phox} par son motif polyproline (Leto *et al.*, 1994 ; Finan *et al.*, 1994 ; Dorseuil *et al.*, 1996). Une fois activé, il possède un site d'interaction pour le flavocytochrome b₅₅₈, plus précisément pour la sous-unité p22^{phox} (Leto *et al.*, 1994). Cette interaction met en jeu le

tandem de domaines SH3 de p47^{phox} et une séquence cytoplasmique riche en proline (polyproline) de p22^{phox} (Groemping *et al.*, 2003).

La protéine p47^{phox} est capable d'aller seule à la membrane pour interagir avec p22^{phox}, indépendamment des autres facteurs cytosoliques (Okamura *et al.*, 1990 □ Uhlinger *et al.*, 1993). De plus, *in vitro* comme *in vivo*, p47^{phox} est nécessaire à p67^{phox} pour être transloquée à la membrane (Uhlinger *et al.*, 1993 □ Heyworth *et al.*, 1990). Ceci suggère que p47^{phox} est la sous-unité cytosolique principalement **responsable du transport des facteurs cytosoliques au flavocytochrome b₅₅₈**.

Le facteur p47^{phox} a également deux sites d'interaction pour des lipides membranaires par le biais de son domaine PX. L'un des sites est spécifique du phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P2) et le second de l'acide phosphatidique ou de la phosphatidylsérine (Stahelin *et al.*, 2002). Ces sites seraient accessibles aux phosphoinositides uniquement après l'activation de l'oxydase. Ces interactions pourraient participer à la translocation de p47^{phox} à la membrane et ainsi jouer un **rôle crucial dans l'assemblage d'une oxydase fonctionnelle** (Ago *et al.*, 2002).

De plus, *in vitro*, l'activité oxydase peut-être reconstituée en absence de p47^{phox} mais à haute concentration de p67^{phox} et de Rac. Le facteur cytosolique p47^{phox} n'est donc pas absolument nécessaire à l'activité oxydase (Freeman and Lambeth, 1996). Néanmoins, p47^{phox} augmente l'affinité de p67^{phox} et de Rac pour le cytochrome b₅₅₈. Ceci renforce l'idée que **p47^{phox} a un rôle dans l'assemblage du complexe et qu'il semble servir d'adaptateur pour permettre aux facteurs cytosoliques d'interagir avec la membrane.**

1-b) Interactions et rôle du facteur cytosolique p67^{phox}

La protéine p67^{phox} est le seul facteur cytosolique qui interagit simultanément avec les deux autres facteurs au repos. Sa région C-terminale permet en effet des interactions de type SH3/PP et PB1/PB1 respectivement avec p47^{phox} et p40^{phox}.

La région N-terminale de p67^{phox} possède un domaine d'activation (résidus 199-210) nécessaire pour stimuler la production de ROS en système acellulaire (Han *et al.*, 1998). Ce domaine semble interagir directement avec le flavocytochrome b₅₅₈ pour intervenir dans la **régulation du transfert d'électrons du NADPH au FAD** (Nisimoto *et al.*, 1999). Cette région contient également un site de liaison à Rac, situé entre les motifs TPR3 et TPR4. Cette interaction Rac/p67^{phox} serait **cruciale pour la formation du complexe actif** (Lapouge *et al.*, 2000).

1-c) Interactions et rôle du facteur cytosolique p40^{phox}

Le facteur cytosolique p40^{phox} est capable d'interagir avec p67^{phox} par son domaine PB1 (Ito *et al.*, 2001) et avec p47^{phox} par son domaine SH3 (Fuchs *et al.*, 1995). Cependant, sa fonction au sein du complexe de la NADPH Oxydase reste sujette à discussion. Certaines équipes proposent pour p40^{phox} un rôle d'activateur de l'oxydase et d'autres suggèrent plutôt un rôle d'inhibiteur.

Plusieurs publications suggèrent que p40^{phox} est un **activateur de l'oxydase**.

Il a tout d'abord été montré qu'un anticorps anti-C-terminal de p40^{phox} (correspondant aux résidus 325-339) inhibait l'interaction p40^{phox}/p67^{phox} et diminuait jusqu'à 55% la production d'ions O₂⁻ en système acellulaire. p40^{phox} serait donc impliqué dans l'activation de la NADPH Oxydase en interagissant avec p67^{phox} par sa région C-terminale (Tsunawaki *et al.*, 1996).

De plus, un effet significatif de p40^{phox} a été observé dans l'activation de l'oxydase en système acellulaire et sous certaines conditions. Ce facteur augmente l'activité oxydase et ce, probablement en accroissant l'affinité de p47^{phox} pour le flavocytochrome b₅₅₈ (Cross, 2000).

Enfin, il a été montré que p40^{phox} augmente la translocation à la membrane de p67^{phox} et de p47^{phox} dans des cellules K562 stimulées, sauf lorsque l'interaction p40^{phox}/p67^{phox} est interrompue (Kuribayashi *et al.*, 2002). p40^{phox} potentialiserait donc le recrutement à la membrane, orchestré par p67^{phox}. En effet, p40^{phox} n'est pas nécessaire à l'activité oxydase (Abo *et al.*, 1992) et p47^{phox} est responsable du transport à la membrane de p67^{phox}.

Inversement, plusieurs publications proposent pour p40^{phox} un rôle d'**inhibiteur de l'activité oxydase**.

Tout d'abord, Sathyamoorthy *et al.*, en travaillant avec le même système que Kuribayashi *et al.*, suggèrent des résultats opposés. En effet, ces auteurs montrent que des cellules K562 exprimant les facteurs cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} produisent moins d'ions superoxydes (diminution de 35%) qu'en absence de p40^{phox}. De plus, lorsque p40^{phox} est réduit à son domaine SH3, cette diminution atteint 60%. Le domaine SH3 de p40^{phox} exercerait donc une régulation négative de l'activité oxydase. Or, le domaine SH3 de p40^{phox} interagit avec le motif polyproline de p47^{phox}, tout comme le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}. Les auteurs appuient donc l'hypothèse d'une compétition entre le domaine SH3 de p40^{phox} et celui de p67^{phox} pour le polyproline de p47^{phox} afin de moduler l'activité oxydase (Sathyamoorthy *et al.*, 1997).

L'activité oxydase a ensuite été testée en système acellulaire, composé de cytochrome b_{558} purifié et de cytosol provenant soit de patients sains, soit atteints de CGD liée à une déficience en $p67^{\text{phox}}$ et donc en $p40^{\text{phox}}$. L'ajout au système de $p67^{\text{phox}}$ recombinant permet de reconstituer l'activité oxydase. Par contre, l'ajout consécutif de $p40^{\text{phox}}$ recombinant diminue l'activité oxydase de façon dose-dépendante (Vergnaud *et al.*, 2000).

Enfin, un effet inhibiteur de l'activité oxydase a été montré pour $p40^{\text{phox}}$ lorsqu'il est phosphorylé (Lopes *et al.*, 2004).

Malgré une grande confusion quant au mode de régulation de la NADPH Oxydase, l'ensemble des auteurs s'accordent pour attribuer à $p40^{\text{phox}}$ un rôle de régulateur du complexe.

1-d) Interactions et rôle de la petite protéine G Rac

Pour mémoire, Rac est cytosolique uniquement lorsque la cellule est au repos. La petite protéine G se trouve dans sa conformation active lorsqu'elle lie une molécule de GTP et inversement, elle est sous sa forme inactive lorsqu'elle contient du GDP. Ainsi, *in vitro*, l'activité oxydase augmente en présence de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ et diminue lorsque du $\text{GDP}\gamma\text{S}$ est ajouté, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ et $\text{GDP}\gamma\text{S}$ étant respectivement des analogues non-hydrolysables du GTP et du GDP (Ligeti *et al.*, 1988).

De plus, l'interaction de Rac-GTP avec les motifs TPR de $p67^{\text{phox}}$ semble cruciale pour former le complexe actif de l'oxydase (Koda *et al.*, 1999; Lapouge *et al.*, 2000).

Ces éléments montrent que la petite protéine G Rac est impliquée dans l'activation de la NADPH Oxydase et ce de façon concomitante avec le facteur cytosolique $p67^{\text{phox}}$.

2- Voie de signalisation conduisant à l'activation de la NADPH Oxydase

(pour revues Bokoch, 1995; Boulay, 1997)

Les voies de transmission du signal d'activation de la NADPH Oxydase sont nombreuses et complexes mais il est possible de dégager quelques voies de signalisation.

Sur le site d'un foyer d'infection ou d'inflammation, des molécules activatrices, appelées chimioattractants, sont produites. Ces molécules vont se lier à des récepteurs à 7 hélices transmembranaires présents à la surface des neutrophiles (Figure 24). Des mécanismes complexes sont alors déclenchés. Ils conduisent au recrutement des neutrophiles sur le lieu de l'infection, à la phagocytose, la dégranulation et l'activation du complexe de la NADPH

Oxydase. Une fois le chimioattractant lié sur son récepteur, la protéine G hétérotrimérique associée au récepteur, est activée. A ce niveau, deux principales voies d'activation se dégagent.

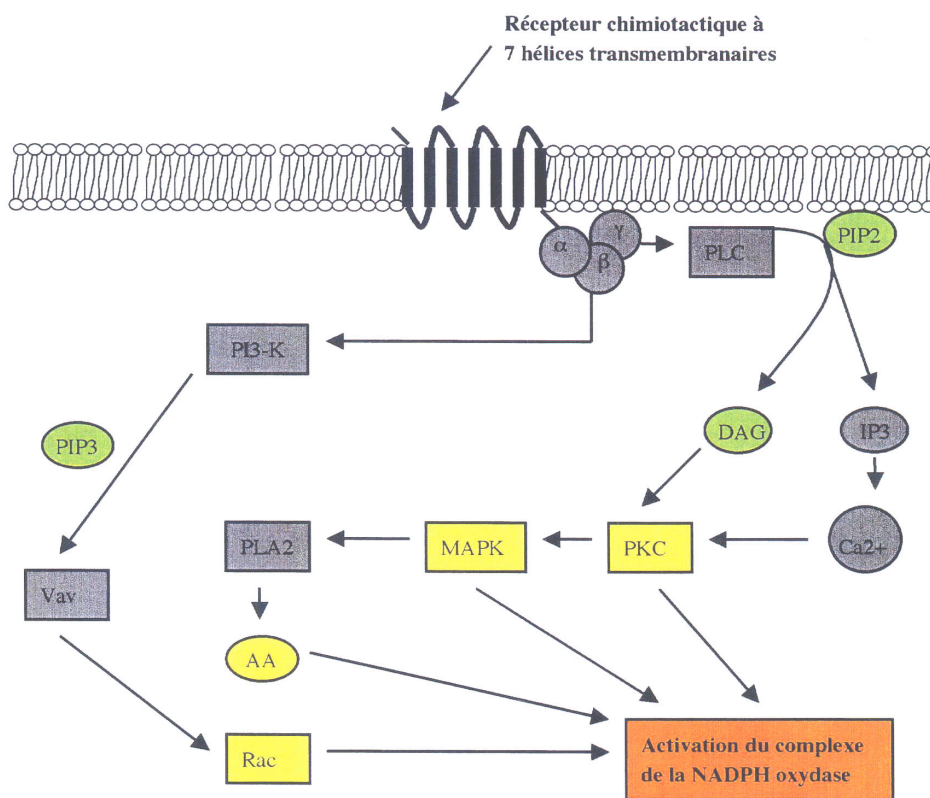


Figure 24: Voies de signalisation conduisant à l'activation de la NADPH Oxydase. Abréviations □ PLC, phospholipase C ; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate ; DAG, diacylglycérol ; IP₃, inositol trisphosphate, PKC, protéine kinase C ; MAPK, Mitogen-Activated Protein kinase, PLA₂, phospholipase A₂ ; AA, acide arachidonique ; PI3-K , phosphatidylinositol 3-kinase ; PIP₃, phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate.

La première est dite la voie «classique». La protéine G se dissocie en sous-unité α , liée au GTP, et en dimère $\beta\gamma$. Ce dimère va activer la phospholipase C (PLC) qui transforme le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Ces molécules sont des messagers secondaires importants □ l'IP₃ permet la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire et le DAG agit avec le Ca²⁺ pour activer les différentes isoformes de la protéine kinase C (PKC) (Figure 24). L'activation des PKCs et des protéines sensibles au Ca²⁺ catalyse la phosphorylation des protéines impliquées dans l'activation du neutrophile, notamment des composants du complexe de la NADPH Oxydase (Dewas *et al.*, 2000 □ Dang *et al.*, 2001 □ Dewas *et al.*, 2003). L'activation des PKCs permet également l'activation d'autres kinases comme les MAPKs (Mitogen-Activated Protein

kinase) qui sont aussi impliquées dans des phosphorylations au sein de la NADPH Oxydase (Dewas *et al.*, 2000). Ces MAPKs vont activer la phospholipase A2 (PLA2) qui permet la production d'acide arachidonique (AA), un amphiphile capable d'activer la formation d'ions superoxyde par la NADPH Oxydase (Figure 24). En effet, la présence d'inhibiteurs de la PLA2 supprime simultanément la production d'AA et l'activation de la NADPH Oxydase (Dana *et al.*, 1994).

Une autre voie de signalisation passe par l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) (Figure 24). La PI3-K catalyse la phosphorylation du lipide phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) pour former le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃). Le PIP₃ formé active les facteurs d'échange (Vav et Sos-1, pour revue Scita *et al.*, 2000) de la petite protéine G Rac, impliquée dans l'activation de la NADPH Oxydase.

3- Activation du complexe de la NADPH Oxydase – assemblage à la membrane

Une fois le neutrophile recruté sur le lieu de l'infection par l'une des voies présentées ci-dessus, le complexe de la NADPH Oxydase est activé.

Dans la cellule au repos, les composants solubles p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} et la petite protéine G Rac sont dans le cytoplasme. Il est généralement admis qu'*in vitro*, les facteurs cytosoliques recombinants forment un complexe de stoechiométrie 1:1:1 (Lapouge *et al.*, 2002). La petite protéine G, quant à elle, se trouve à l'état soluble par son interaction avec le GDP Dissociation Inhibitor (GDI) (Figure 25).

L'activation du complexe de la NADPH Oxydase se traduit par plusieurs événements (Figure 25). Le premier correspond à la phosphorylation de p47^{phox}, même si p67^{phox} et p40^{phox} sont également phosphorylés (Grandvaux *et al.*, 2001). p47^{phox} subit des phosphorylations au niveau de sérines situées dans sa région C-terminale. Les kinases qui réalisent ces phosphorylations sont essentiellement de type PKC (Dewas *et al.*, 2000; Dang *et al.*, 2001; Dewas *et al.*, 2003; Quinn MT and Gauss KA, 2004). La protéine p47^{phox} est donc le facteur cytosolique qui va «sentir» l'activation grâce à ses nombreuses phosphorylations.

Puis, suite à des changements conformationnels, les facteurs cytosoliques sont transloqués à la membrane pour interagir avec le flavocytochrome b₅₅₈ et permettre ainsi le flux d'électrons du NADPH jusqu'à l'oxygène du phagosome.

Simultanément mais indépendamment du transport des facteurs cytosoliques, la petite protéine G Rac se dissocie du GDI. Sous sa forme active liée au GTP, elle va interagir avec la membrane grâce à sa chaîne hydrophobe (Abo *et al.*, 1994).

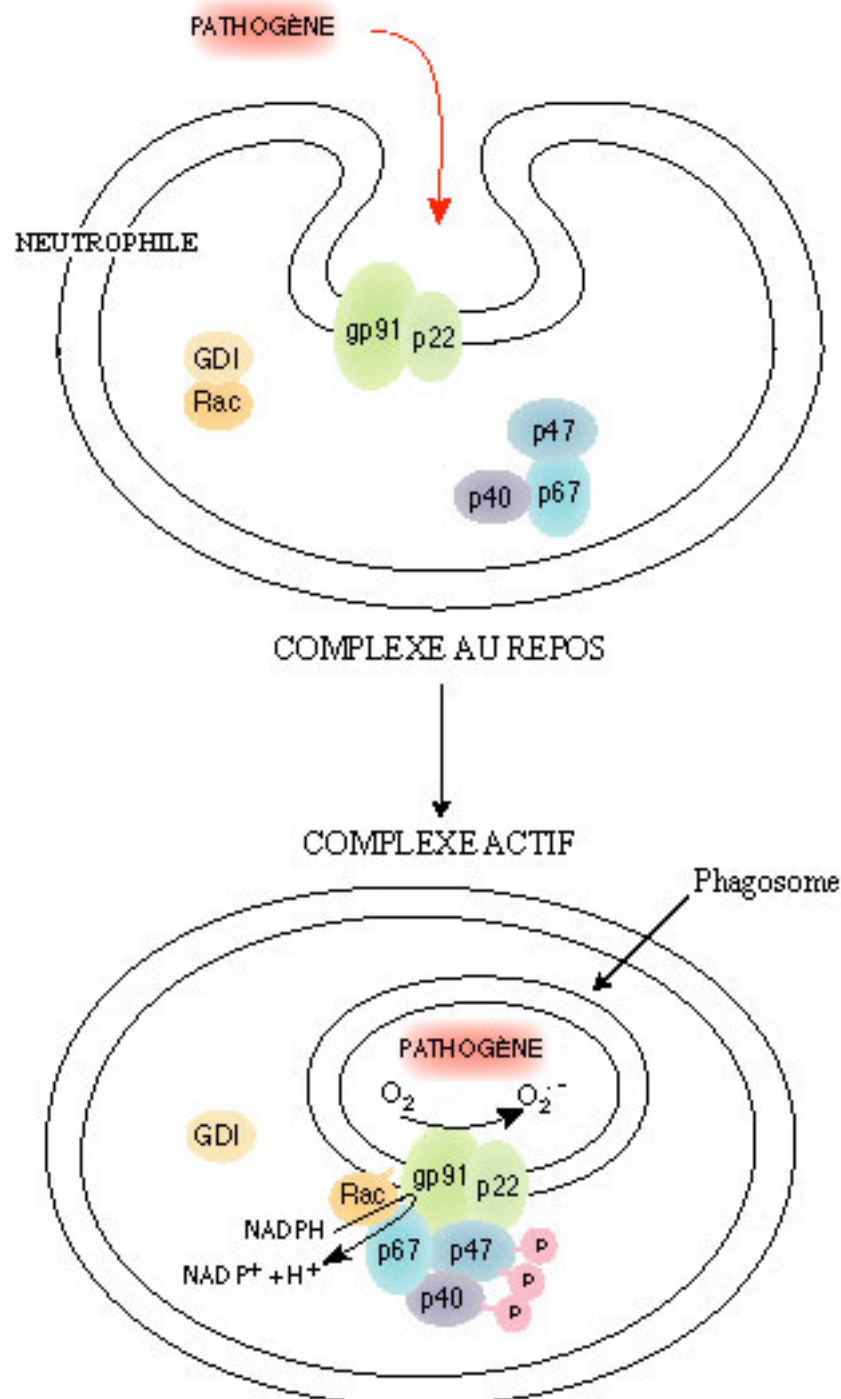


Figure 25: Représentation schématique de l'activation du complexe de la NADPH Oxydase. Au repos, le complexe est composé d'une partie membranaire, le flavocytochrome b_{558} , de facteurs cytosoliques et d'une petite protéine G Rac soluble. Lorsque le complexe est activé, certains facteurs cytosoliques, essentiellement $p47^{phox}$, sont phosphorylés, les facteurs cytosoliques sont transloqués au flavocytochrome b_{558} et Rac interagit avec la membrane.

4- Mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'activation

Au repos, le facteur cytosolique p67^{phox} est le seul capable d'interagir simultanément avec les deux autres facteurs cytosoliques. D'une part, p67^{phox} interagit avec p40^{phox} via leurs domaines PB1 respectifs (Figure 26). Cette interaction est supposée constitutive lors de l'activation. D'autre part, p67^{phox} interagit avec le motif polyproline C-terminale de p47^{phox} via son domaine SH3 C-terminal (Figure 26). Cette interaction est, quant à elle, nécessaire à la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane. Le facteur cytosolique p47^{phox} se trouve au repos dans une conformation fermée dite d'auto-inhibition (Figure 26).

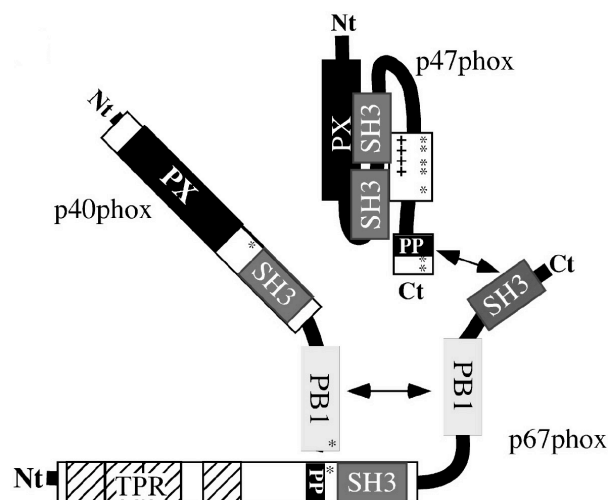


Figure 26 ☐ Interactions au sein du complexe ternaire de la NADPH Oxydase au repos. Ces interactions ont été observées *in vitro* (Ito *et al.*, 2001 ☐ Lapouge *et al.*, 2002).

Cette auto-inhibition est réalisée par l'interaction intramoléculaire entre les domaines SH3 de p47^{phox} et sa région polybasique ou AIR (pour Auto-Inhibitory Region, riche en résidus arginine et lysine) (résidus 292-340). La structure cristallographique de la partie de p47^{phox} (156-340) comprenant les deux domaines SH3 et la région AIR a été résolue (Groemping *et al.*, 2003 ☐ Yuzawa *et al.*, 2004). Les domaines SH3 en tandem forment un sillon dans lequel la séquence ²⁹⁷GAPPR³⁰² de la région d'auto-inhibition vient se loger en se structurant en hélice de type PP_{II} (Figure 27 A). Cette conformation auto-inhibée empêche les domaines SH3 de p47^{phox} d'interagir avec le motif polyproline de p22^{phox} et donc le transport des facteurs cytosoliques à la membrane.

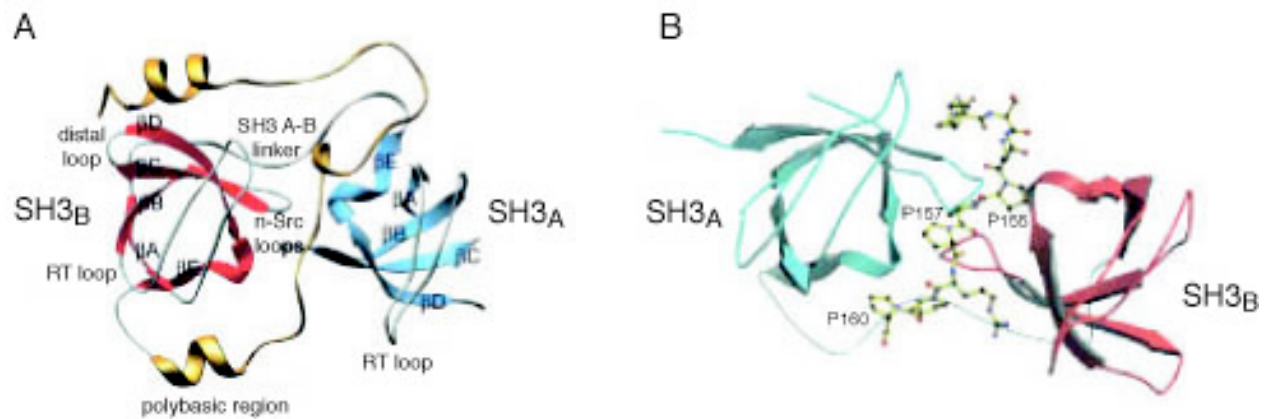


Figure 27: Structures cristallographiques des deux domaines SH3 de p47^{phox} en tandem. (A) structure de la région 156-340 de p47^{phox} qui comprend les deux SH3 avec le domaine polybasique (292-340) (code PDB 1NG2). Cette structure correspond à la conformation auto-inhibée de p47^{phox}. Les domaines SH3 N- et C- terminaux sont respectivement en bleu (SH3_A) et rouge (SH3_B) et la région polybasique en jaune. (B) structure des deux domaines SH3 de p47^{phox} en complexe avec un peptide correspondant à la région cytoplasmique (149-166) de p22^{phox} (code PDB 1OV3). Cette structure représente la conformation «active» de p47^{phox} en interaction avec p22^{phox} membranaire. Les domaines SH3 N- et C- terminaux sont respectivement en vert (SH3_A) et rouge (SH3_B) et la région polybasique en jaune. (Groemping *et al.*, 2002).

Lors de l'activation de la NADPH Oxydase, p47^{phox} subit de nombreuses phosphorylations dans sa région C-terminale qui comprend la région polybasique et le motif polyproline (Fontayne *et al.*, 2002). Les phosphorylations de la région polybasique, sur les sérines 303, 304 et 328, entraîneraient un changement conformationnel de p47^{phox} et, par un effet de charge, cette région se dissocierait des domaines SH3. Les SH3 seraient alors libres pour interagir avec le motif polyproline de la sous-unité membranaire p22^{phox}. La structure cristallographique de la région 156-285 de p47^{phox} comprenant les deux domaines SH3, a été résolue en complexe avec un peptide qui correspond à la région cytoplasmique de p22^{phox} (149-166) contenant le site d'interaction à p47^{phox} (Groemping *et al.*, 2003). Cette structure révèle que le motif ¹⁵⁴NPPPRP¹⁵⁹ de p22^{phox} se positionne de la même façon que la région polybasique (²⁹⁷GAPRR³⁰²) de p47^{phox}. Il se place dans le sillon formé à l'interface des deux SH3, en adoptant également une structuration en hélice PP_{II} (Figure 27 B).

Une fois activé, p47^{phox} est capable d'interagir avec p22^{phox} par ses domaines SH3 mais aussi avec des lipides membranaires par son domaine PX. De la même façon que les domaines SH3 sont masqués par la conformation fermée de p47^{phox}, pour éviter l'interaction avec p22^{phox}, le domaine PX doit également être masqué. Il a été montré, par une étude en biochimie et en RMN, que le domaine PX de p47^{phox} (qui contient un motif polyproline) est

capable d'interagir avec le domaine SH3 C-terminal de p47^{phox}. Cette interaction se réalise par des régions de contact classique entre un domaine SH3 et son motif polyproline ligand (Hiroaki *et al.*, 2001). Une régulation de la capacité du domaine PX à interagir avec les membranes peut être envisagée par une interaction intra-moléculaire avec le domaine C-SH3^{p47} à même de masquer le site d'interaction avec les lipides (Figure 28).

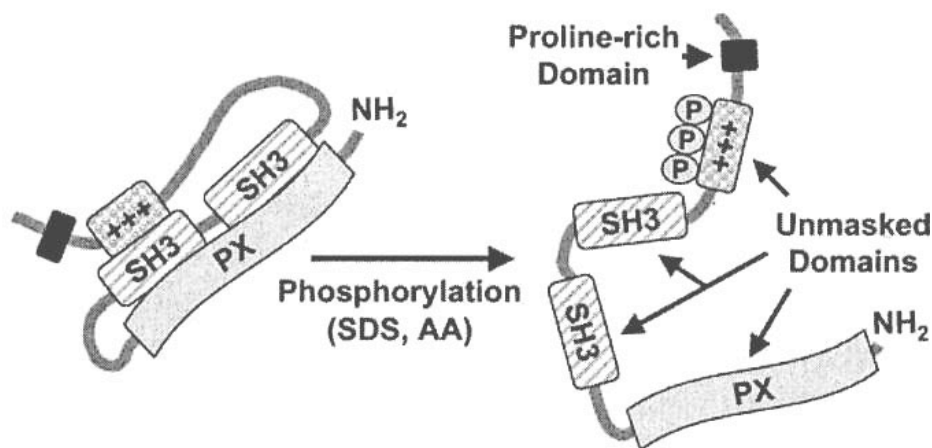


Figure 28: Changements conformationnels du facteur cytosolique p47^{phox} induits par les phosphorylations réalisées lors de l'activation du complexe de la NADPH Oxydase. Les phosphorylations (P) (ou la neutralisation des charges par les amphiphiles de type SDS ou acide arachidonique (AA)) se situent au niveau de la région polybasique de p47^{phox} (+++). Elles permettent de démasquer des sites de liaison laissant p47^{phox} interagir avec la membrane par son motif PX et avec p22^{phox} par ses domaines SH3 (Quinn and Gauss, 2004).

Lors de l'activation de la NADPH Oxydase, p47^{phox} passe donc d'une conformation fermée à ouverte. A ce jour, aucun élément ne permet de dire si les facteurs cytosoliques p67^{phox} et p40^{phox} subissent également des réarrangements structuraux et/ou si une réorganisation du complexe ternaire a lieu au cours de l'activation.

VII Objectifs

La dynamique des interactions entre les composants cytosoliques, conduisant à l'activation de la NADPH Oxydase, est principalement régie par des interactions de type SH3/polyproline et PB1/PB1.

Au début de mon travail de thèse, il n'existait aucune information structurale sur l'interaction p67^{phox}/p40^{phox}. Seules les régions d'interaction étaient identifiées pour chaque protéine. Rien ne laissait penser qu'il s'agissait de modules structuraux plus génériques. Je me

suis donc intéressée à l'aspect structural de l'interaction p67^{phox}/p40^{phox}, l'objectif étant d'obtenir des informations sur le mode d'interaction de ces deux protéines.

Un autre aspect de mon travail est consacré à l'étude de la dynamique d'interaction au sein du complexe ternaire de la NADPH Oxydase. De nombreuses interactions entre les modules des facteurs cytosoliques ont été décrites *in vitro*. Cependant, au repos, seules certaines de ces interactions sont effectives entre les protéines solubles. Cette différence entre les interactions possibles et celles présentes au repos, suggère des réorganisations au sein du complexe ternaire lors de l'activation, comme cela a été observé pour p47^{phox}. Ainsi, le motif polyproline C-terminal de p47^{phox} est capable d'interagir soit avec le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}, soit avec le domaine SH3 de p40^{phox}. Lors de l'activation, p47^{phox} subit de nombreuses phosphorylations, notamment au niveau de ce motif polyproline. Nous avons donc étudié la dynamique d'interaction entre les trois facteurs cytosoliques, à travers l'interaction SH3/polyproline, lors de l'activation de l'oxydase. Pour cela, nous avons conjugué l'analyse des structures des domaines SH3 de p67^{phox} et p40^{phox} en complexe avec le polyproline de p47^{phox}, avec des mesures d'affinité entre ce motif polyproline et ses domaines SH3 partenaires. Ce travail a été réalisé à différents degrés de phosphorylation des sérines de la région C-terminale de p47^{phox}, c'est-à-dire en mimant les premières étapes du processus d'activation.

**Etude structurale des domaines PB1
de p67^{phox} et p40^{phox}**

Etude structurale des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}

Dans la cellule au repos, il est généralement admis que les facteurs cytosoliques p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox} forment un complexe ternaire (1[1][1]) dans lequel p47^{phox} est dans une conformation fermée (Figure 1).

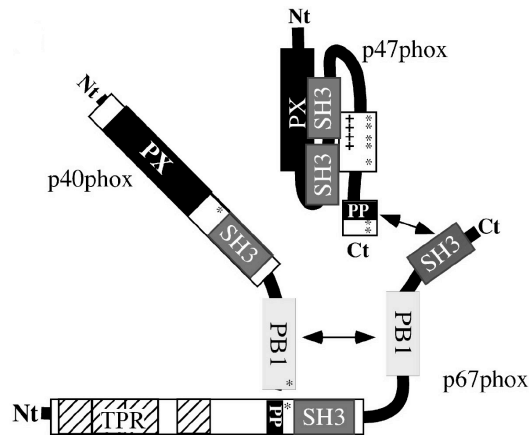


Figure 1[1] Modèle des interactions entre les facteurs cytosoliques au repos, décrites *in vitro* (Ito *et al.*, 2001[1]Lapouge *et al.*, 2002).

Au sein de ce complexe, les protéines interagissent par le biais de leurs modules. Deux sortes d'interaction existent entre les facteurs cytosoliques[1] d'une part, des interactions de type SH3/polyproline, et d'autre part, une interaction de type PB1/PB1. Au cours de ma thèse, nous avons étudié ces deux types d'interaction. D'une part, nous nous sommes intéressés à la liaison entre le motif polyproline de p47^{phox} et ses deux partenaires[1] le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} et le domaine SH3 de p40^{phox}. Ce travail a été centré sur des aspects fonctionnels des interactions SH3/polyproline. D'autre part, nous avons étudié l'interaction entre les domaines PB1. Cette interaction est présente qu'une seule fois au sein du complexe ternaire. Elle permet l'interaction entre les facteurs cytosoliques p67^{phox} et p40^{phox}, essentielle à l'activité oxydase. Cette étude revêt, quant à elle, un aspect plus structural.

I Importance de l'interaction p67^{phox}/p40^{phox} au sein du complexe de la NADPH Oxydase

Dans le complexe de la NADPH Oxydase, il existe une seule interaction impliquant les modules PB1. Il s'agit de l'interaction entre le domaine PB1 de p67^{phox} (résidus 345-428) et le domaine PB1 C-terminal de p40^{phox} (résidus 237-329). L'interaction entre p67^{phox} et

p40^{phox} est forte (environ 10¹¹M) (Lapouge *et al.*, 2002) et se réalise uniquement via les domaines PB1^{p67} et PB1^{p40}.

Outre l'affinité très élevée entre ces deux protéines, plusieurs observations tendent à montrer que cette interaction p67^{phox}/p40^{phox} est constitutive. Tout d'abord, p40^{phox} est co-purifié avec p67^{phox} à partir du cytoplasme de neutrophiles (Wientjes *et al.*, 1993). De plus, les patients atteints de CGD due à une perte de p67^{phox} perdent également p40^{phox} (Tsunawaki *et al.*, 1994). Ces deux protéines semblent donc étroitement liées dans la cellule au repos. Ces deux facteurs cytosoliques, réduits à la région C-terminale de p40^{phox} et à la région inter-SH3 de p67^{phox}, complexés et incubés avec une forte dose d'acide arachidonique, double de celle nécessaire pour l'activation de la NADPH Oxydase, restent associés. Ceci suggère que l'interaction est maintenue lors du processus d'activation, au moins *in vitro* (Nakamura *et al.*, 1998).

L'importance de l'interaction p67^{phox}/p40^{phox} pour l'activité oxydase a été soulignée par trois résultats majeurs. Premièrement, un anticorps dirigé contre la région C-terminale de p40^{phox} (résidus 325-339) dissocie l'interaction p67^{phox}/p40^{phox}. Cela conduit à une forte diminution de la production d'ions superoxydes (Tsunawaki *et al.*, 1996). Deuxièmement, p40^{phox} augmente l'activité de la NADPH Oxydase en facilitant le recrutement à la membrane de p67^{phox} et p47^{phox} via l'interaction PB1^{p40}/PB1^{p67} (Kuribayashi *et al.*, 2002). Troisièmement, un cas de CGD associée à une mutation dans le gène codant pour p67^{phox} dans la région correspondant au domaine PB1 de p67^{phox} a été identifié. Cette mutation entraîne la séparation des facteurs cytosoliques p67^{phox} et p40^{phox}. Une forte diminution de l'activité oxydase a été observée pour ce mutant en système acellulaire (Noack *et al.*, 1999; Patiño *et al.*, 1999). Ces données biochimiques et génétiques soulignent l'importance de l'interaction entre p67^{phox} et p40^{phox} pour l'activité oxydase et ce, malgré l'absence de mutation CGD identifiée à ce jour dans p40^{phox}.

II Identification des domaines PB1

En 2001, au début de mon travail de thèse, il était bien établi que dans la cellule au repos, p40^{phox} est associé à p67^{phox} (Someya *et al.*, 1993; Wientjes *et al.*, 1993; Tsunawaki *et al.*, 1994). Cette interaction impliquait la région C-terminale de p40^{phox} (Fuchs *et al.*, 1996; Wientjes *et al.*, 1996; Tsunawaki *et al.*, 1996), notamment les résidus 260 à 339 (Fuchs *et al.*,

1996 [Nakamura *et al.*, 1998) et la région située entre les deux domaines SH3 de p67^{phox} (appelée inter-SH3) (Fuchs *et al.*, 1996 [Nakamura *et al.*, 1998) (Figure 2).

Par des expériences de mutagenèse dirigée sur ces deux régions et en utilisant le système du double hybride, Nakamura *et al.* (1998) ont montré que la région C-terminale de p40^{phox} est importante pour une interaction forte et stable avec la région inter-SH3 de p67^{phox} (résidus 301-460).

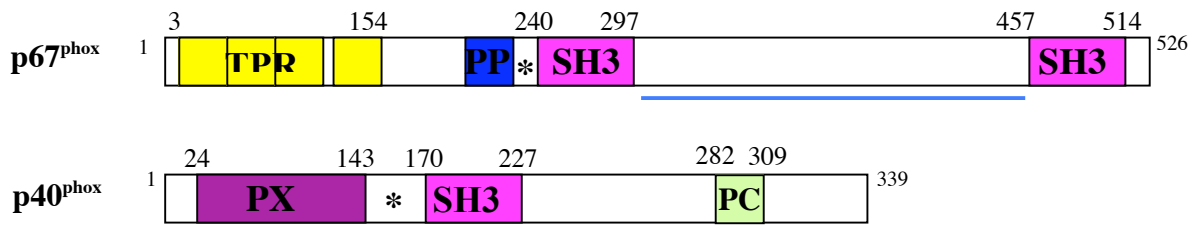


Figure 2 [Représentation des facteurs cytosoliques p67^{phox} et p40^{phox}. Les régions soulignées en bleu correspondent aux zones d'interaction p67^{phox}/p40^{phox}.

Des recherches de séquences analogues à la région C-terminale de p40^{phox} ont abouti à la mise en évidence d'un motif d'une vingtaine d'acides aminés, riches en résidus acides, conservé au sein de protéines de signalisation comme Cdc24p (Nakamura *et al.*, 1998) (Figure 3). Cette séquence consensus fut appelée motif PC à cause de sa présence au sein des protéines Phox (p40^{phox}) et Cdc24p.

p40 ^{phox} (humain)	282	D	I	A	L	N	Y	R	D	A	E	G	D	L	V	R	L	L	S	D	E	D	V	A	L	M	V	R	Q	309
Cdc24p (levure)	813	I	T	K	I	K	Y	Q	D	E	D	G	D	F	V	V	L	G	S	D	E	D	W	N	V	A	K	E	M	840
Scd1 (levure)	782	R	V	R	L	K	Y	V	D	E	D	G	D	F	I	T	I	T	S	D	E	D	V	L	M	A	F	E	T	809
MEK5 (humain)	57	T	T	A	F	E	Y	E	D	E	D	G	D	R	I	T	V	R	S	D	E	E	M	K	A	M	L	S	Y	84
p62 (humain)	62	G	F	Q	A	H	Y	R	D	E	D	G	D	L	V	A	F	S	S	D	E	E	L	T	M	A	M	S	Y	89

Figure 3 [Alignement de séquences de motifs PC. Les résidus encadrés et grisés sont conservés.

Afin d'examiner le rôle du motif PC de p40^{phox}, les résidus conservés (Y287, D289, E291, G292, D293, S299, D300, E301, D302) ont été mutés. Ces mutations inhibent fortement voire complètement l'interaction de la région C-terminale de p40^{phox} avec la région inter-SH3 de p67^{phox}. Le motif PC a donc été directement impliqué dans l'interaction avec p67^{phox} (Nakamura *et al.*, 1998).

La protéine Cdc24p de la levure possède également un motif PC dans sa région C-terminale. Elle a pour partenaire d'interaction la protéine Bem1p. Un travail de

caractérisation de l'interaction entre la région qui contient le motif PC (PCCR pour PC Containing Region) et sa protéine partenaire met en parallèle les couples Cdc24p/Bem1p et p40^{phox}/p67^{phox}. Un domaine commun à Bem1p et p67^{phox}, a été identifié. Ce domaine correspond à la région minimale essentielle pour l'interaction avec le PCCR partenaire. Il est appelé PB1 pour Phox/Bem1p.

Par des analyses de séquences, le domaine PB1 a été recherché au sein de protéines capables d'interagir avec une protéine possédant un PCCR (Ito *et al.*, 2001). Ce travail n'a révélé qu'une modeste homologie de séquences entre ces protéines. Il ne met en lumière qu'une seule lysine strictement conservée et de courtes portions avec quelques acides aminés conservés (Figure 4).

```
p67phox 345 KLSVMPYTLKLVHYKYTVVMKTQPG-LPYSQVRDMVSKKLELRLEHTKLSYRPRDSNELVPLSEDSMKDAWGQVKNYCLTLWCEN428
Bem1p 477 STSGLKTKIKFYKDDIFALMLKGDTTYKELRSKIAPRIDT--DNFKLQTKLFDGSGEE-IKTDSQVSNI IQAKLKISVHDI551
scd2 453 PTTAGSTCKVIVRLGDETFALRVPSDISFEDFCERLTNKLG---ECEHLSYRDTNANKVLPNNVDDLKACSQESGVLLFAERR534
PKC_ 9 MEGSGGRVRLIAHYGGDIFITSVDAATTFEELCEEVRDMCRLH-QQHPLTLKWVDSEGD-PCTVSSQMELEEAFLRLARQCRDEVL91
```

Figure 4 Alignement de séquences de domaines PB1 (Ito *et al.*, 2001). Les séquences indiquées proviennent de protéines humaines (p67^{phox} et PKC_) et de levure (Bem1p et Sdc2). Les résidus surlignés en gris sont conservés et la lysine strictement conservée est encadrée. Les résidus dont la fonction est conservée sont en gras.

La pertinence de cet alignement de séquence a été vérifiée en mutant la lysine strictement conservée dans Bem1p (K482A) et dans p67^{phox} (K355A). Leur interaction avec le PCCR correspondant a été testée. Ces mutations abolissent complètement les interactions entre les partenaires (Ito *et al.*, 2001). De plus, l'interaction entre le domaine PB1 de Bem1p et le PCCR de Cdc24p a été caractérisée par RMN (Terasawa *et al.*, 2001). La lysine strictement conservée au sein du domaine PB1 de Bem1p se situe dans la zone d'interaction avec le PCCR de Cdc24p (Figure 5). La délimitation des régions en interaction avec un PCCR, réalisée précédemment, semblait donc avoir un sens.

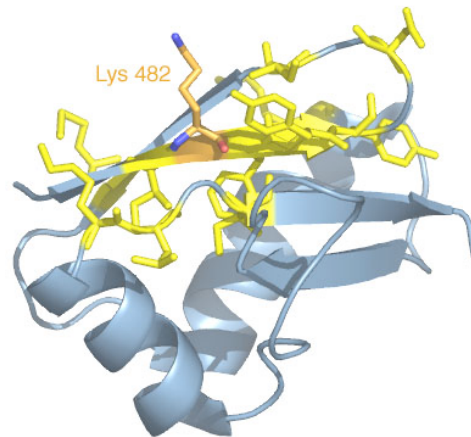


Figure 5 Structure RMN moyenne du domaine PB1 de Bem1p. Les résidus qui sont fortement affectés par l'interaction avec le PCCR de Cdc24p (y compris la lysine 482) sont en bâtonnets jaunes et la lysine 482 en bâtonnets oranges (Ito *et al.*, 2001, code PDB 1IPG).

Au début de mon travail de thèse, le domaine PB1 est donc défini comme la région capable d'interagir avec le PCCR de la protéine partenaire. Ainsi, la région d'interaction de p67^{phox} avec le PCCR de p40^{phox} est désormais délimitée au domaine PB1 situé entre les deux domaines SH3. Lors du déroulement de cette thèse, il s'est avéré que les régions contenant un motif PC (PCCR) pouvaient aussi être classées au sein des domaines PB1. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, j'utiliserai le vocable PB1 pour la région d'interaction des deux facteurs cytosoliques p67^{phox} et p40^{phox}.

III Objectifs

Au cours de ces trois dernières années, le nombre de protéines possédant un domaine PB1 a augmenté considérablement. Or, au début de mon travail, aucune information à l'échelle moléculaire était connue sur ces domaines. Il nous a donc semblé important de commencer l'étude structurale de cette famille émergente de modules structuraux afin de mieux comprendre leur mode d'interaction et leur spécificité d'interaction. Le complexe de la NADPH Oxydase a été l'un des premiers systèmes biologiques à révéler la présence de domaine PB1 au sein des ses composants. De plus, l'interaction entre les facteurs cytosoliques p40^{phox} et p67^{phox}, via leur domaine PB1, est essentielle au bon fonctionnement de l'oxydase. Au début de ce travail, seul le domaine PB1 de p67^{phox} était délimité et identifié comme le domaine d'interaction de la région de p40^{phox} comprenant le motif PC (PCCR). Nous avons

donc entrepris l'étude structurale de ces régions de p67^{phox} et p40^{phox} seuls et en complexe. Notre but était d'obtenir des informations structurales, d'identifier leur mode d'interaction, les résidus importants pour que cette interaction soit stable lors de l'activation, ainsi que les résidus permettant la spécificité d'interaction.

IV Cristallogénèse des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}

Nous avons entrepris l'étude structurale de ces régions seules ou en complexe. Le facteur cytosolique p67^{phox} étant le seul capable d'interagir simultanément avec les deux autres facteurs cytosoliques, il possède un rôle pivot au sein de la NADPH Oxydase. J'ai donc commencé mon travail par l'étude structurale de la région C-terminale de p67^{phox} impliquée dans l'interaction avec p40^{phox}. La technique envisagée pour cette étude structurale fut la cristallographie par diffraction des rayons X, couramment utilisée au laboratoire. Les premières étapes du travail ont donc consisté au clonage des gènes codant pour les régions C-terminales de p67^{phox} et p40^{phox}, à la surproduction des protéines dans *E. coli* puis à leur purification.

1- Cristallogénèse de la région C-terminale de p67^{phox}

1-a) Région C-terminale de p67^{phox}

Au tout début de ce travail, avant que les domaines PB1 soient identifiés, nous savions que p67^{phox} interagissait avec p40^{phox} par sa région située entre ses deux domaines SH3 (Figure 6). La structure de la région N-terminale de p67^{phox} (résidus 1 à 213), comprenant le domaine d'activation, avait été résolue au laboratoire par cristallographie aux rayons X (Grizot *et al.*, 2001). Nous avons donc tout d'abord entrepris l'étude structurale de la région C-terminale entière de p67^{phox} (résidus 238-526) comprenant la région d'interaction avec p40^{phox}.

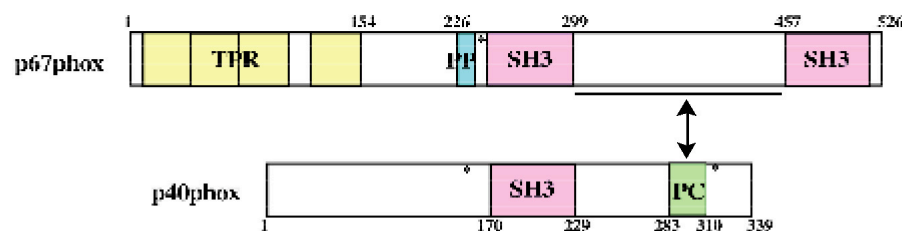


Figure 6 Interaction p67^{phox}/p40^{phox} au début de mon travail (2000).

J'ai donc réalisé le clonage de la région 2SH3 qui comprend les deux domaines SH3 et la région inter-SH3 (résidus 238-526, 34985,500a) (Figure 7).

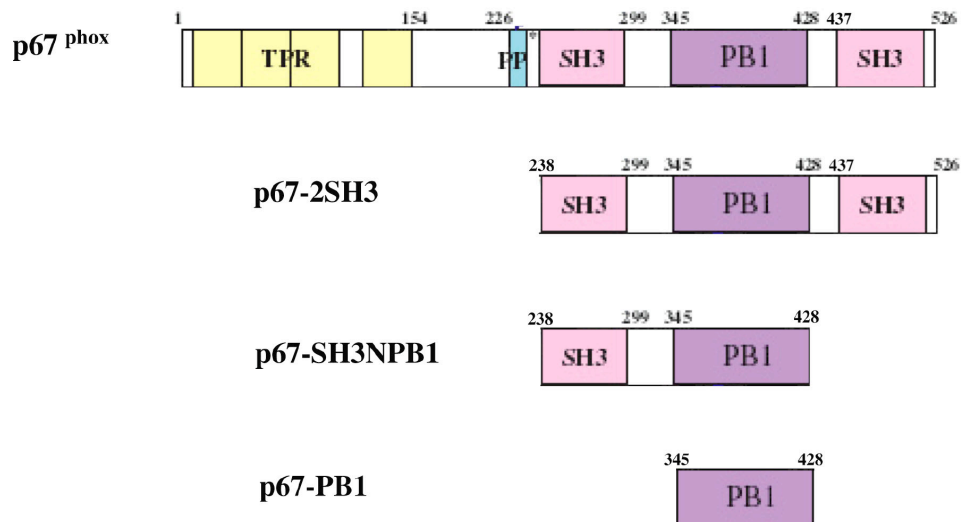


Figure 7: Constructions réalisées pour l'étude structurale de la région de p67^{phox} en interaction avec p40^{phox}.

La séquence codant pour cette région a été amplifiée par PCR et insérée dans le vecteur pET15b (Novagen) entre les sites NdeI et BamHI. La protéine recombinante qui possède une étiquette poly-histidine en position N-terminale (His-p67-2SH3), est exprimée dans la souche d'*Escherichia coli* JM109 (Figure 8). La protéine His-p67-2SH3 (34985,5Da) a une masse moléculaire apparente plus élevée, autour des 40kDa. Après centrifugation, les cellules sont reprises par un tampon supplémenté en anti-protéases (cocktail sans EDTA et du PMSF). Elles sont ensuite lysées par sonication et ultracentrifugées. La protéine recombinante étant soluble, le surnageant est récupéré.

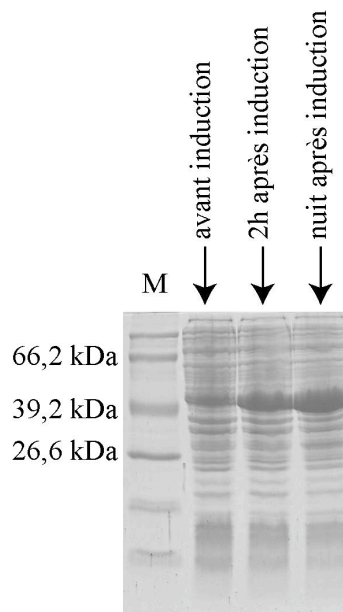


Figure 8 Suivi de production de la protéine recombinante His-p67-2SH3 dans la souche JM109 d'*Escherichia coli*. Gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide.

La première étape de purification de His-p67-2SH3, grâce à l'étiquette poly-histidine, est réalisée sur colonne de Ni²⁺ (Ni-NTA, Qiagen). Une première difficulté apparaît à ce stade. La protéine est co-éluee au cours du gradient d'imidazole (de 60 à 500 mM) avec une protéine plus petite, faisant penser à une forme tronquée dans sa région C-terminale (Figure 9).

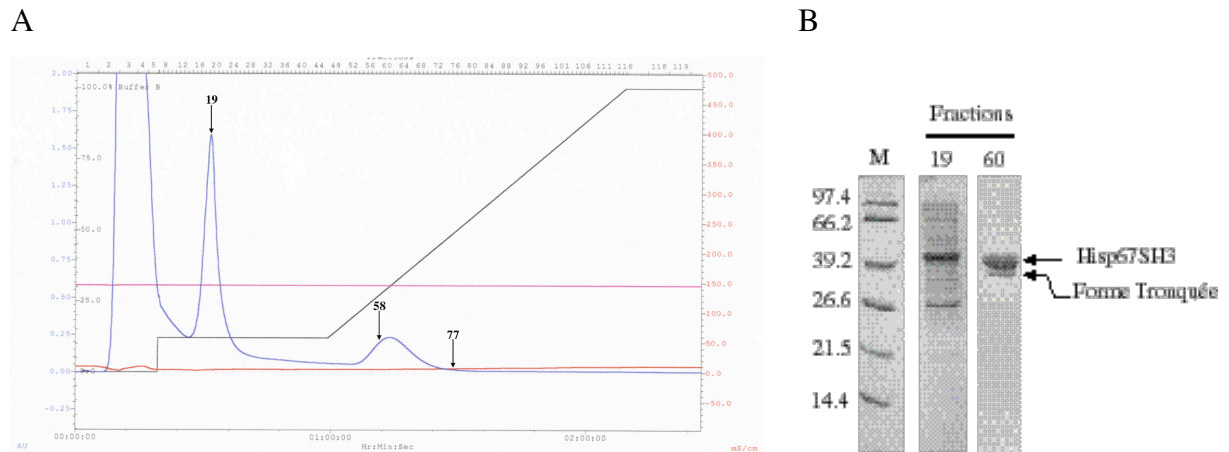


Figure 9 Purification de la protéine recombinante His-p67-2SH3 sur colonne d'affinité Ni²⁺. (A) chromatogramme de la purification sur colonne Ni²⁺. Certaines fractions sont indiquées par une flèche et un numéro. L'absorbance à 280 nm est suivie par la courbe bleue et la conductivité par la courbe rouge. (B) Dépôt sur gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide. Les fractions analysées sont indiquées par leur numéro.

Une seconde étape de purification est ensuite réalisée sur colonne échangeuse d'anions (UNOQ1, BioRad), permettant la séparation des protéines en fonction de leur charge. Le pH du tampon est choisi en fonction du point isolélectrique de la protéine d'intérêt. Les deux formes de His-p67-2SH3 sont séparées au cours d'un gradient de sel (de 30 à 200 mM NaCl). Il a néanmoins été difficile d'optimiser cette étape de purification qui souvent ne permet pas une bonne séparation des deux formes (Figure 10). De plus, la proportion d'une forme par rapport à l'autre est variable selon les préparations.

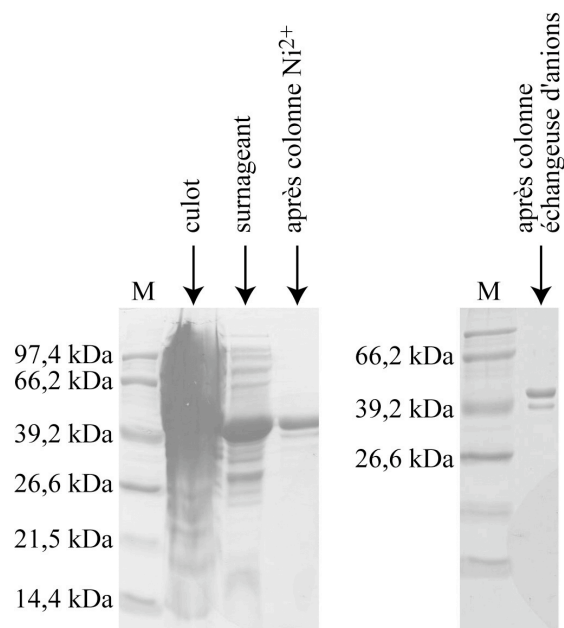


Figure 10 Suivi de purification de la protéine recombinante His-p67-2SH3. Gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide.

Par spectrométrie de masse MALDI et par séquençage N-terminale, nous avons identifié le ou plutôt les sites de coupure de His-p67-2SH3. Il s'agit de deux sites de coupure situés au niveau du brin β du domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (coupure avant la lysine 273 et la leucine 271). De façon surprenante, ces deux techniques révèlent les deux fragments C-terminaux de His-p67-2SH3 (de 4543 et 4343 Da). Ceci signifie que ces petits fragments n'ont pas été éliminés au cours des deux étapes de purification et qu'ils restent accrochés au reste de la protéine. Ceci doit être dû à des interactions structurales fortes au sein du domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}.

Nous avons tenté de cristalliser chacune des deux formes purifiées. Avec la forme entière de His-p67-2SH3, par manque de protéines pure, nous avons testé que 27 conditions. Aucune de ces conditions n'a abouti à une piste pour l'obtention de cristaux. Par contre, parmi les 98 conditions testées avec la forme clivée de His-p67-2SH3 à 2,8 mg/mL (kit Hampton I et II), la condition 2,0 M d'Ammonium Phosphate, 0,1 M Tris HCl pH 8,5 a donné, dans les premières heures après la formation de la goutte, les objets très petits présentés sur la Figure 11.

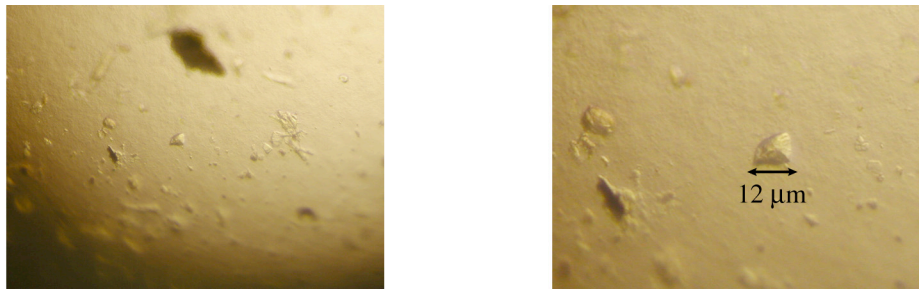


Figure 11 Photographies de la goutte contenant des objets obtenus à partir de la protéine His-p67-2SH3 tronquée et de 2,0mM d'Ammonium Phosphate, 0,1mM Tris HCl pH 8,5. L'un des objets est montré par la photographie de droite.

La goutte a été refaite dans les mêmes conditions mais sans protéine. Après deux semaines, rien n'est apparu dans la goutte contrôle. Bien que ces objets ne soient pas des cristaux, ils correspondent à un début d'organisation des protéines. Malheureusement, trop peu de protéine pure et homogène a été obtenue par la suite pour pouvoir approfondir les essais de cristallogénèse. Le problème majeur venant des sites de coupure protéolytique dans le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}, j'ai réalisé le clonage d'une forme plus courte, p67-SH3NPB1, ne contenant pas le domaine SH3 C-terminal.

1-b) Suppression du domaine SH3 C-terminal

cristallogénèse de p67^{phox} seul et en complexe avec p40^{phox}

Au cours de cette première partie de travail, le domaine PB1 de p67^{phox} a été délimité comme la région d'interaction avec le PCCR de p40^{phox}. Nous avons donc pu tenir compte de cette délimitation pour la nouvelle construction de p67^{phox} p67-SH3NPB1 (résidus 238 à 428). Cette région comprend le domaine SH3 N-terminal et le domaine PB1 de p67^{phox} (Figure 7).

Le fragment d'ADN codant pour cette région de p67^{phox} a été amplifiée par PCR et inséré entre les sites NdeI et BamHI du vecteur pET15b (Novagen). La protéine recombinante qui possède une étiquette poly-histidine en position N-terminale (His-p67-SH3NPB1, 23538,9Da) est surproduite dans la souche JM109 d'*Escherichia coli*. La masse moléculaire apparente de la protéine est d'environ 27kDa (Figure 12). Les cellules sont centrifugées puis lysées par «French press». Après ultracentrifugation, le surnageant contenant la protéine soluble est récupéré.

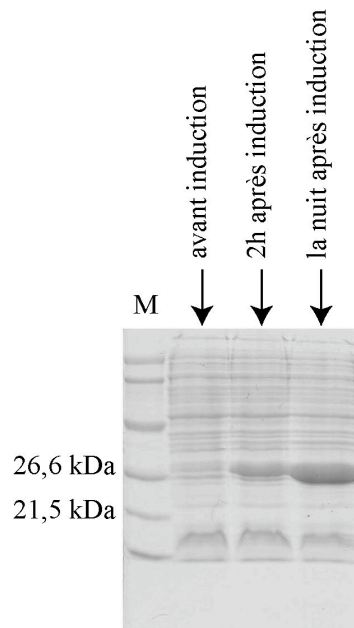


Figure 12 Suivi de production de la protéine recombinante His-p67-SH3NPB1 dans la souche JM109 d'*Escherichia coli*. Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.

La première étape de purification de la protéine His-p67-SH3NPB1 est une chromatographie d'affinité sur colonne Ni^{2+} (Ni-NTA, Qiagen). La seconde étape est une filtration sur gel (colonne Superdex 200, Pharmacia) qui permet d'une part, de supprimer d'éventuels contaminants et d'autre part, de changer de tampon afin d'éliminer l'imidazole de l'étape précédente. Le suivi de purification est présenté sur la Figure 13.

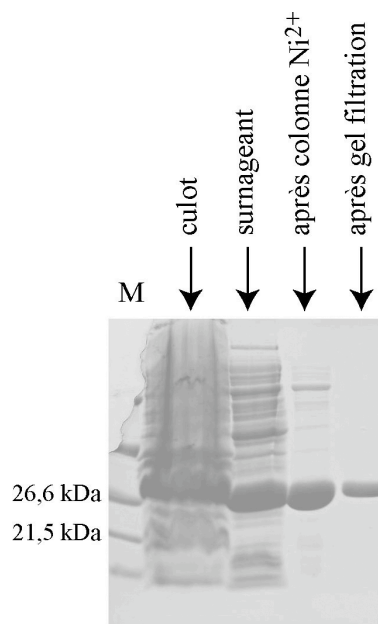


Figure 13 Suivi de purification de la protéine recombinante His-p67-SH3NPB1. Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.

Nous avons ensuite réalisé des tests de cristallogénèse de His-p67-SH3NPB1 en utilisant les kits commerciaux screen I, PEG/ION et sulfate d'ammonium (Hampton). Au vu des précipités obtenus, celui obtenu avec le sulfate d'ammonium à 1,6M, pH 7 et la protéine concentrée à 6,3 mg/mL semblait le plus prometteur. De nombreux tests autour de cette condition ont donc été réalisés en faisant varier la température (8°C et 20°C), le pH et les concentrations en protéine et sulfate d'ammonium. Cependant, aucun cristal n'a été obtenu avec cette construction.

Nous avons alors tenté de cristalliser cette protéine en complexe avec la région C-terminale de p40^{phox} (résidus 230-339) contenant la région PCCR. Le clonage de cette protéine a été réalisé dans le vecteur pIVEX2.4 (Roche). La protéine recombinante possède une étiquette poly-histidine en position N-terminal (His-p40Cter, 15861,8 Da). Elle est surproduite dans la souche C41(DE3) d'*Escherichia coli* (Figure 14).

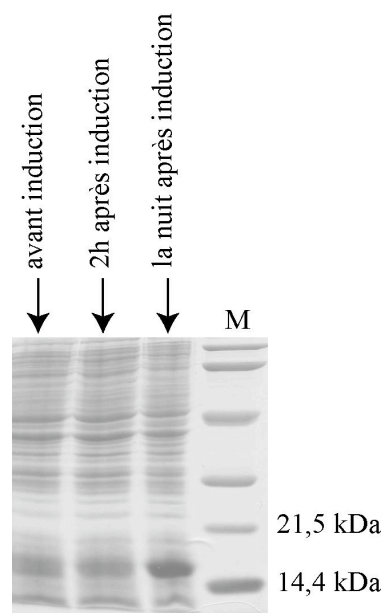


Figure 14 Suivi de production de la protéine recombinante His-p40Cter. Gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide.

Les cellules sont lysées par «French press» et le surnageant est injecté sur colonne de Ni²⁺ (Ni-NTA, Qiagen). L'étiquette poly-histidine est ensuite clivée par le facteur Xa (Novagen) et la protéine p40-Cter (14076 Da) résultante est purifiée par chromatographie d'exclusion (Superdex 75, Pharmacia) (Figure 15). Cette étape permet, en plus de changer le tampon, de supprimer d'éventuels contaminants, l'étiquette poly-histidine et le facteur Xa.

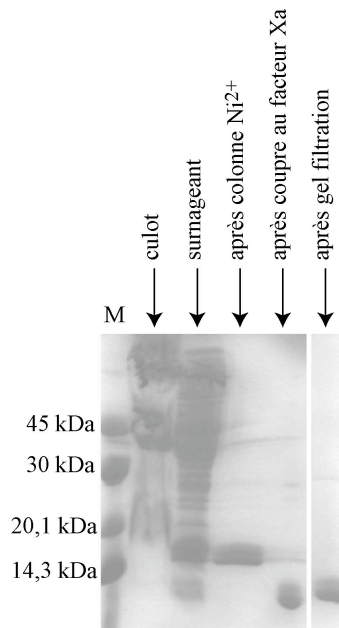


Figure 15 \square Suivi de purification de la protéine recombinante p40-Cter. Gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide.

Le mélange His-p67-SH3NPB1/p40-Cter formé dans les proportions 1 \square 1 est purifié par filtration sur gel (Superdex 200, Pharmacia) (Figure 16).

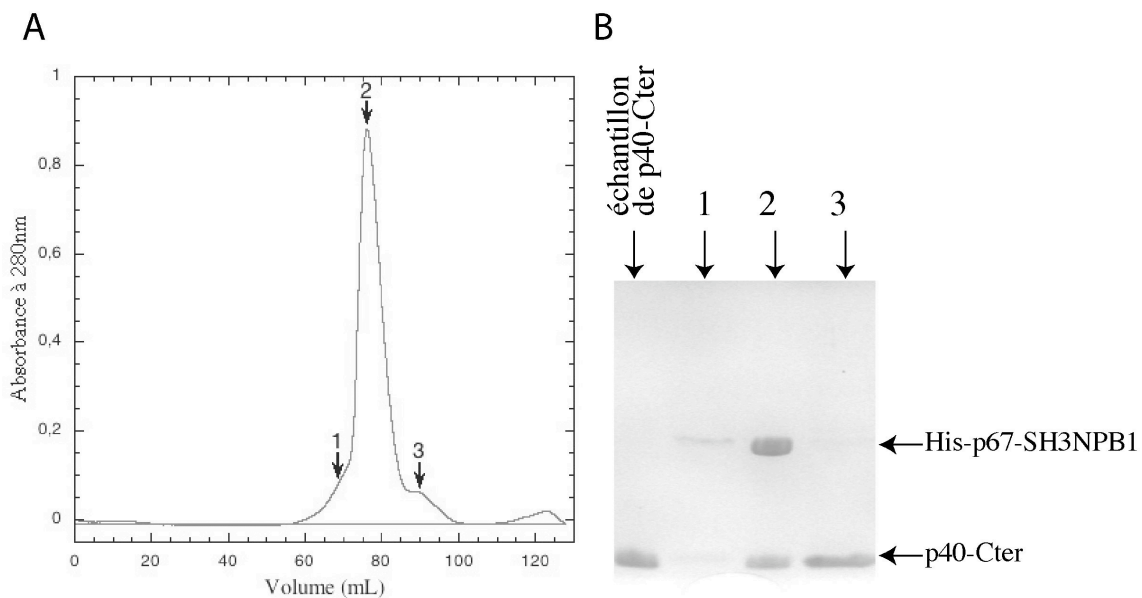


Figure 16 \square Purification du complexe His-p67-SH3NPB1/p40-Cter. (A) chromatogramme de la filtration sur gel filtration (Superdex 200, Pharmacia) du mélange His-p67-SH3NPB1 \square p40-Cter (1 \square 1). (B) gel SDS-PAGE (15% d'acrylamide) \square l'échantillon de p40-Cter sert de contrôle \square les numéros des puits correspondent aux numéros des échantillons prélevés au cours de la purification.

Le gel SDS-PAGE des échantillons prélevés au cours de la purification montre la présence concomitante des deux protéines His-p67-SH3NPB1 et p40-Cter. Le complexe s'est

donc bien formé. Le puits n° 3 correspond à l'excès de p40-Cter. Une analyse en acides aminés du complexe formé et purifié a montré que les protéines s'associent avec une stoechiométrie 1:1.

Des essais de cristallisation ont été réalisés avec le complexe His-p67-SH3NPB1/p40-Cter (1:1). La goutte composée de 200 µL de complexe à 7,2 µg/mL et 200 µL de solution contenant 0,2 M d'acétate de magnésium, 0,1 M de cacodylate de sodium pH 6,5 et 30% (v/v) de 2-méthyl-2,4-pentanediol (condition 21 du screen I Hampton) a donné un précipité avec un petit cristal. Une goutte contrôle a été réalisée sans protéine, avec seulement le tampon et la solution du réservoir. Aucun objet n'est apparu dans cette goutte. Le cristal étant tellement fin (quasiment en deux dimensions) qu'au moment de le pêcher pour le congeler, il s'est cassé. Le fragment de cristal a tout de même été testé au synchrotron mais à cause de sa trop petite taille (30 µm/35 µm), aucun signal n'a été enregistré. Nous avons ensuiteensemencé une goutte composée de 100 µL de complexe à 7,4 µg/mL et 100 µL de condition 21 avec des débris de cristal. Comme de petits objets sont alors apparus dans la goutteensemencée, nous avons testé d'autres conditions proches de la condition 21. Aucun cristal ou objet ne s'est formé.

Avec la construction His-p67-SH3NPB1, plus courte que la première, nous avons obtenu des résultats encourageants. Nous avons donc réduit encore la construction au domaine PB1 uniquement.

1-c) Domaine PB1 de p67^{phox}

Le fragment d'ADN codant pour le domaine PB1 de p67^{phox} (résidus 345-428) a été amplifiée par PCR et inséré entre les sites NdeI et BamHI du vecteur pET15b (Novagen). La protéine recombinante qui possède une étiquette poly-histidine en position N-terminale (His-PB1^{p67}, 122010Da) est surexprimée par la souche C41(DE3) d'*Escherichia coli* (Figure 17). Les cellules sont centrifugées, lysées par «French press» puis ultracentrifugées. Le surnageant contenant la protéine soluble est récupéré.

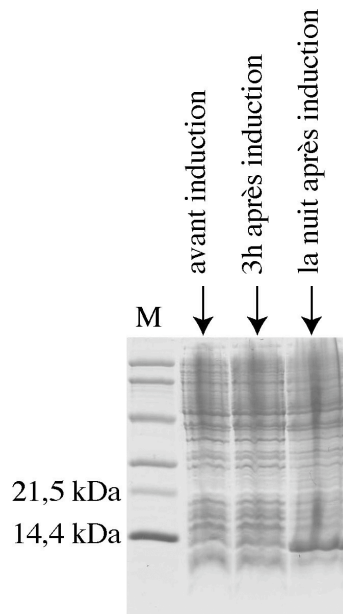
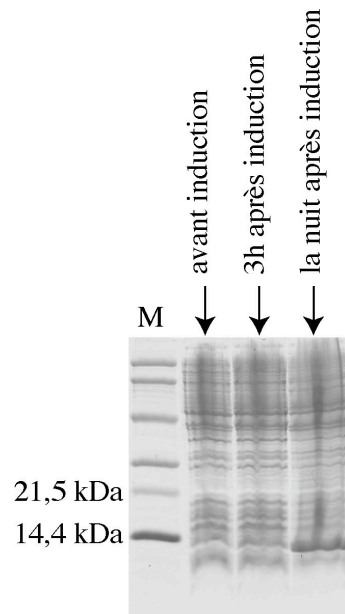
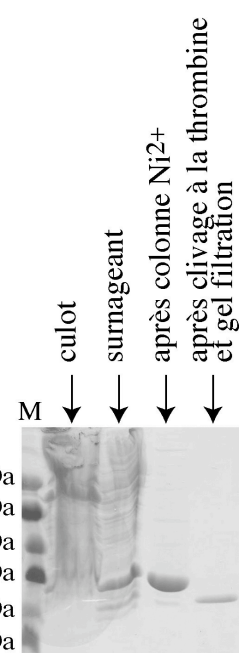


Figure 17  Suivi de production de la protéine recombinante His-PB1^{p67}. Gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide.

La protéine recombinante est d'abord purifiée sur colonne d'affinité Ni²⁺ (Ni-NTA, Qiagen). La protéine His-PB1^{p67} est ensuite purifiée par chromatographie d'exclusion (Superdex 75 Hiload, (Pharmacia) (Figure 18). En fin de purification, l'étiquette poly-histidine est clivée par la thrombine (Sigma) puis la protéine PB1^{p67} (10319 Da) est à nouveau purifiée par filtration sur gel (Superdex 200, Pharmacia).

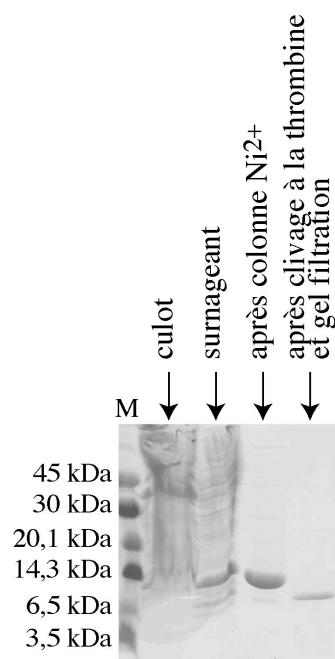
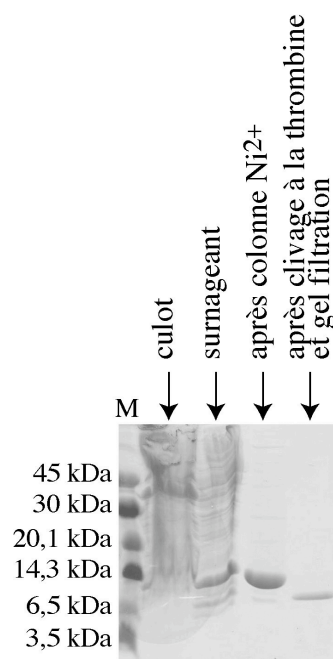


Figure 18  Suivi de purification de la protéine recombinante PB1^{p67}. Gel SDS-PAGE à 18% d'acrylamide.

La protéine PB1^{p67} purifiée a été obtenue dans des quantités suffisantes pour tester les kits commerciaux de cristallisation Hampton (crystal screen I et II, Lite, PEG-Ion, MembFac, Natrix, Ammonium sulfate, Quick screen, Malonate, Formate, PEG 6K, PEG Li-Cl, MPD et Mme 5000) par le robot de cristallogenèse disponible à l'institut (Tecan, gouttes de 200 µL). 960 conditions ont ainsi été testées avec deux concentrations de PB1^{p67} (4,8 µg/mL et 9,3 µg/mL) et à 20°C. Deux pistes de cristallisation se sont dégagées de ces essais : des granules ont été obtenues avec la protéine à 9,8 µg/mL et la solution contenant 20% de PEG 3350 et 0,2 M d'acétate de zinc, pH 6,3 ; des cristallites ont été observés avec PB1^{p67} à 9,8 µg/mL et 5 à 10% de PEG Mme 5000, 0,1 M Hepes, pH 7.

Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduits avec des gouttes réalisées manuellement bien que nous nous soyons servis des solutions utilisées par le robot. Les gouttes réalisées autour de ces conditions n'ont pas donné de cristaux.

Après environ 1 an et demi de tentatives de cristallisation des différentes constructions de p67^{phox}, et malgré quelques espoirs au cours de ces nombreux essais, aucun cristal de qualité n'a été obtenu. Nous nous sommes donc demandé si les domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} étaient des modules bien structurés et surtout, si leur délimitation était correcte.

2- Les domaines PB1 sont-ils des modules structurés ?

Pour vérifier ceci, nous avons réalisé une digestion ménagée à la trypsine du domaine PB1 de p67^{phox} (345-428, PB1^{p67}) et de la région C-terminale de p40^{phox} (230-339, p40-Cter). Cette digestion permet de voir si des régions de la protéine sont accessibles à la protéase qui clive après les résidus basiques. Il est ainsi possible d'identifier grossièrement le degré de structuration d'une protéine. Les digestions sont réalisées avec un rapport massique trypsine/protéine de 1/60 et à température ambiante. Un échantillon est prélevé à des temps donnés de la réaction. Les échantillons sont ensuite déposés sur gels SDS-PAGE puis transférés sur membrane PVDF. Les bandes numérotées sur la Figure 19 sont analysées par séquençage N-terminal.

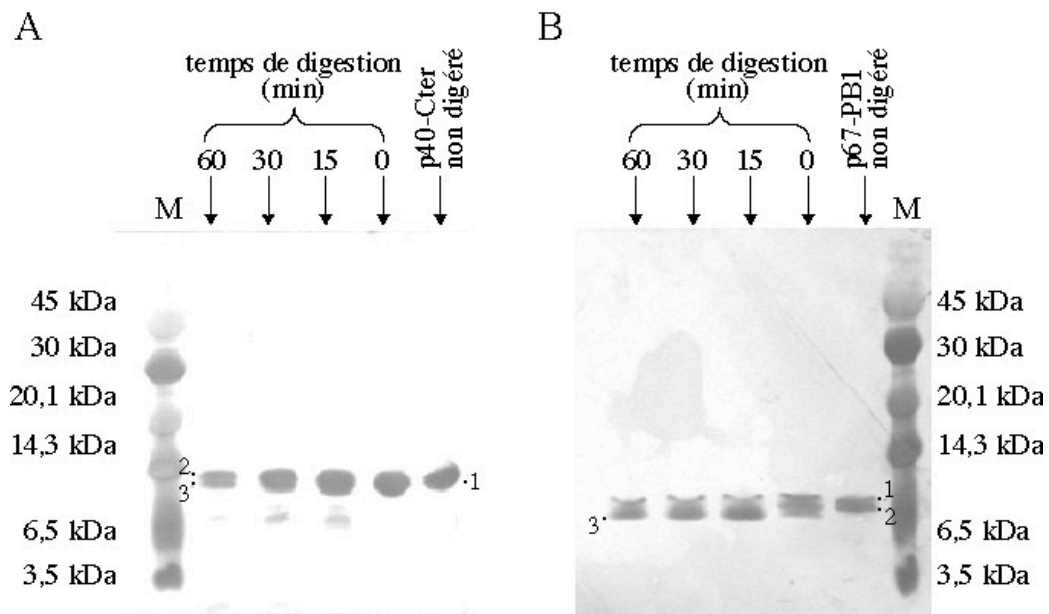


Figure 19 □ Digestion ménagée à la trypsine des domaines PB1 de p40^{phox} (A) et p67^{phox} (B). Les bandes numérotées sur les membranes PVDF ont été analysées par séquençage N-terminal.

L'analyse par séquençage N-terminal des bandes numérotées de la membrane PVDF de p40-Cter donne les résultats suivants (Figure 20) □

Numéro de bande	Séquences obtenues par séquençage N-terminal
1 (p40-Cter non digéré)	¹ GRLIKHMEFP ³ L IKHMEFP EE
2 (en fin de digestion)	⁶ HMEFP EEDDP
3 (en fin de digestion)	⁶ HMEFP EEDDP

Figure 20 □ Résultats du séquençage N-terminal des échantillons prélevés lors de la digestion ménagée par la trypsine de p40-Cter.

Deux espèces de p40-Cter sont présentes avant digestion. Ceci est dû à l'existence de deux sites de coupure au facteur Xa dans la séquence de p40-Cter, séparés de deux résidus. Après une heure de digestion, deux bandes se distinguent sur la membrane. Le séquençage N-terminal de ces bandes révèle pourtant la même séquence. La trypsine clive donc les trois premiers résidus de p40-Cter et certainement quelques résidus du côté C-terminal. Or, il existe 16 sites de coupure potentiels à la trypsine (10 arginines et 6 lysines) dans la séquence de p40-Cter (Figure 21). Le domaine PB1 de p40^{phox} semble donc être un domaine bien structuré. De plus, les dix acides aminés C-terminaux de p40-Cter n'appartiennent pas au

domaine PB1 tel qu'il est défini actuellement dans la banque de données SMART (résidus 16 à 108, Figure 21). Il est donc très probable que la trypsine coupe dans cette région C-terminale, ce qui confirme la délimitation du domaine structural.

```

      1           11           21           31           41           51
      |           |           |           |           |           |
1  GRLIKHMEFP EEDDPTNWLR CYYYEDTIST IKDIAVEEDL SSTPLLKDLL ELTRREFORE
61 DIALNYRDAE GDLVRLLSDE DVALMVRQAR GLPSQKRLFP WKLHITQKDN YRVYNTMP

```

Figure 21 Séquence en acides aminés de p40-Cter après coupure de l'étiquette poly-histidine au facteur Xa. Les sites de coupure à la thrombine (lysine et arginine) sont indiqués en gras et le domaine PB1 tel qu'il est défini par SMART est surligné en gris.

L'analyse par séquençage N-terminal des bandes numérotées de la membrane PVDF de PB1^{p67} donne les résultats suivants (Figure 22)

Numéro de bande	Séquences obtenues par séquençage N-terminal
1 (p67-PB1 non digéré)	¹ GSHMKLSVPM
2 (p67-PB1 non digéré)	¹ GSHMKLSVPM
3 (en fin de digestion)	⁶ LSVP

Figure 22 Résultats du séquençage N-terminal des échantillons prélevés lors de la digestion ménagée de PB1^{p67}.

Avant digestion, deux bandes sont visibles sur membrane PVDF (Figure 19). Ces bandes analysées par séquençage N-terminal ne révèlent qu'une seule séquence. Avant même le début de la réaction, il existe donc deux formes de PB1^{p67} dans la solution, l'une étant coupée en C-terminal. Après une heure de digestion à la trypsine, une troisième bande apparaît correspondant à une protéine de masse moléculaire légèrement plus petite (Figure 19). Le séquençage N-terminale de cette bande montre que les cinq premiers résidus ont été clivés. Cette coupure peut expliquer la migration plus avancée de cette protéine sur gel SDS-PAGE. En effet, les gels SDS-PAGE réalisés pour ces expériences sont très résolutifs pour des protéines de petite masse moléculaire (entre 15 et 50 kDa) (voir matériel et méthode). Donc, si les onze résidus C-terminaux avaient également été clivés, le premier site de coupure C-terminal étant la lysine 78, on peut imaginer que la différence de migration sur ce type de gel aurait été plus importante. Finalement, il existe 13 sites de coupures potentiels dans la séquence de PB1^{p67} (9 lysines et 4 arginines) (Figure 23). Or, le gel SDS-PAGE montre qu'en fin de digestion, la protéine n'a pas subi de multiples coupures (Figure 19). De plus, les cinq

résidus clivés en C-terminal n'appartiennent pas au domaine PB1. Le domaine PB1 de p67^{phox}, tel qu'il est défini par Ito *et al.* (2001), semble donc également bien structuré.

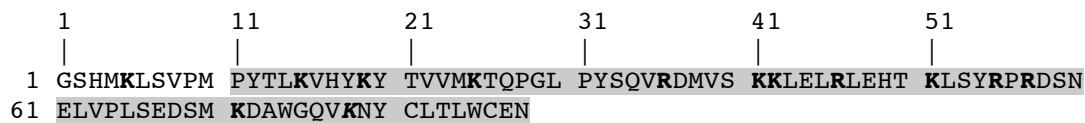


Figure 23 \square Séquence en acides aminés de PB1^{p67} après coupure de l'étiquette poly-histidine par la thrombine. Les sites de coupure à la thrombine (lysine et arginine) sont indiqués en gras et le domaine PB1 tel qu'il est défini par Ito *et al.* (2001) est surligné en gris.

De plus, un spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) deux dimensions (¹H/¹⁵N HSQC) a été réalisé pour PB1 de p67^{phox} (résidus 345-428) et p40-Cter (résidus 230-339) marqués ¹⁵N. Ces spectres permettent de dire si la protéine est structurée ou dénaturée, même partiellement. En effet, les spins nucléaires du proton et de l'azote d'une protéine dénaturée résonnent tous à la fréquence de résonance propre du proton et de l'azote. Les pics sont donc tous rassemblés dans une zone du spectre. A l'inverse, une protéine structurée donne un spectre où les pics sont étalés dans la gamme spectrale car l'environnement de chaque proton diffère et modifie sa fréquence de résonance.

Les spectres ¹H/¹⁵N HSQC du PB1 de p67^{phox} et de p40-Cter présentent une bonne répartition des pics dans la gamme spectrale (résultats préliminaires non montrés ici). Ceci indique une structuration de ces domaines et confirme donc les résultats de protéolyse ménagée.

3- Pourquoi la région C-terminale de p67^{phox} ne cristallise t'elle pas \square

Malgré les nombreux essais de cristallisation des régions 2SH3 et SH3NPB1 de p67^{phox}, aucun cristal de qualité n'a été obtenu. Ces régions sont composées de deux voire trois modules reliés par des séquences («linkers») relativement longues (Figure 24).

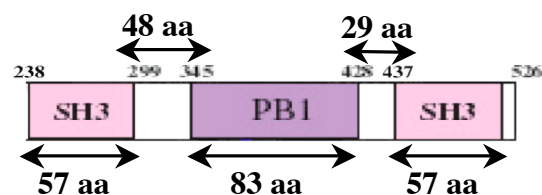


Figure 24 \square Représentation schématique de la région C-terminale de p67^{phox}. La taille des modules et des régions lien sont indiquées en acides aminés (aa).

Les régions qui séparent les modules peuvent entraîner une flexibilité de la protéine, ce qui n'est pas favorable à sa cristallisation. Ceci peut donc expliquer l'absence de cristaux pour ces deux constructions. C'est pourquoi, en réduisant cette région au domaine PB1, nous pensions nous affranchir de la flexibilité et donc augmenter les chances de cristallisation. Or aucun cristal de PB1^{p67} n'a été obtenu. Les résultats de protéolyse ménagée et de RMN 2D du domaine PB1 indiquent cependant qu'il s'agit d'un module structuré. Nous n'expliquons donc pas pourquoi les essais de cristallogénèse n'ont pas abouti pour le domaine PB1^{p67}.

Malgré les efforts de cristallogénèse réalisés pour les constructions 2SH3 et PB1 seules et pour SH3NPB1 seule et en complexe avec p40-Cter, aucun cristal exploitable n'a été obtenu. Pourtant, les résultats présentés précédemment suggèrent que les domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} sont structurés. Nous avons donc continué l'étude structurale de ces domaines par Résonance Magnétique Nucléaire.

V Etude des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} par Résonance Magnétique Nucléaire

Suite aux essais de cristallisation de la région C-terminale de p67^{phox}, nous avons réduit l'étude au domaine PB1^{p67} seul et en complexe avec la région C-terminale de p40^{phox}. Notre objectif étant l'étude structurale de l'interaction p67^{phox}/p40^{phox}, nous avons donc poursuivi ce travail par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), une technique adéquate pour l'étude structurale de petites protéines en solution.

1- Pourquoi la RMN ?

Tout d'abord et bien évidemment, nous avons utilisé cette technique parce que la cristallogénèse des différentes constructions de p67^{phox} n'a pas donné de résultat. Or, les résultats de protéolyse ménagée suggèrent que ces domaines sont structurés et bien délimités. De plus, à ce stade du travail, ces domaines semblaient adéquats pour une étude par RMN. En effet, les spectres RMN 2D préliminaires étaient de bonne qualité, avec des pics étalés dans la gamme spectrale. D'une part, ceci confirme que ces domaines sont structurés et d'autre part, cela montre que ces protéines se comportent bien en solution (à 25°C) pendant la durée des expériences préliminaires (environ 1 à 2 heures).

En plus de ces premières évaluations, une étude structurale des domaines PB1 des protéines Bem1p et Cdc24p de la levure venait d'être réalisée par RMN (Terasawa *et al.*, 2001). Ce travail a permis de déterminer la structure du domaine PB1 de Bem1, la topologie de la région comprenant le motif PC de Cdc24p et les résidus situés dans la zone d'interaction entre les deux partenaires. La RMN semble donc un bon moyen d'étudier la structure des domaines PB1 en solution. Cela nous a donc encouragés dans cette voie.

Enfin, il est relativement facile d'accéder à cette technique implantée au sein même de l'institut.

2- Objectifs de l'étude RMN

Nous souhaitons déterminer, bien sûr, la structure de la chaîne principale des domaines PB1 ou, à défaut, la topologie. L'objectif majeur de l'étude structurale de PB1^{p67} et de p40-Cter est toutefois la caractérisation en solution de l'interaction entre ces deux partenaires. Nous souhaitons également identifier les résidus importants pour cette interaction, importante pour l'activité oxydase.

3- Résultats de l'étude structurale des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}

3-a) Comportement des domaines PB1 en solution

Lors des expériences RMN, réalisées en solution à 25°C, des problèmes de stabilité des protéines ont été rencontrés.

Dans le tube RMN contenant PB1^{p67}, un précipité blanc se forme au cours du temps expérimental. Les spectres restent cependant de bonne qualité, bien que l'intensité des pics diminue d'environ 20% tous les jours. Ceci suggère que la protéine forme des agrégats ou des oligomères en solution, à 25°C.

Contrairement à PB1^{p67}, aucun précipité se forme dans le tube et les spectres RMN de p40-Cter changent au cours du temps. L'intensité des pics diminue considérablement, leur position change, de nouveaux pics apparaissent, certains disparaissent et d'autres encore semblent se dédoubler au cours du temps (Figure 25). Ceci est caractéristique d'hétérogénéité dynamique et structurale du squelette de la protéine. Ceci suggère que p40-Cter, bien que ce soit une protéine structurée en solution, elle est instable et elle doit subir des changements de conformations, une protéolyse ou une oligomérisation/agrégation. Cependant, l'intégrité de l'échantillon protéique au cours des expériences a été suivie par spectrométrie de masse électrospray. La masse moléculaire de la protéine n'évolue pas. Ce résultat permet donc d'éliminer l'hypothèse d'une protéolyse de p40-Cter.

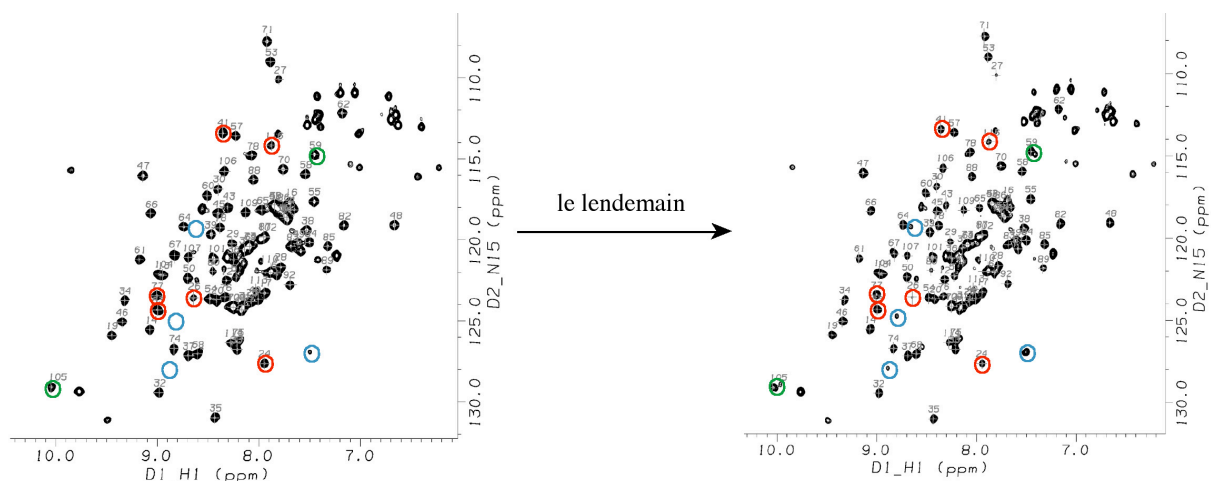


Figure 25 Evolution au cours du temps des spectres 2D-HSQC (^1H - ^{15}N) de p40-Cter seul, 800MHz, 25°C. Un numéro aléatoire est attribué à chaque pic. Le spectre évolue au cours du temps. Certains pics diminuent d'intensité voire disparaissent (encadrés en rouge), d'autres voient leur intensité augmenter ou apparaître (encadrés en bleu) et d'autres encore semblent se dédoubler (encadrés en vert).

Pour limiter ces processus, la protéine ne doit pas être concentrée à plus de 5 mg/mL soit environ 350 μ M. Après 48 heures d'expériences, un nouvel échantillon doit être préparé.

Malgré ces difficultés, nous avons poursuivi l'étude structurale des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} en solution.

3-b) Etude structurale de PB1^{p67} seul

La première expérience réalisée est un spectre 2D-HSQC (¹H-¹⁵N) du domaine PB1 de p67^{phox} (résidus 345-428) (Figure 26).

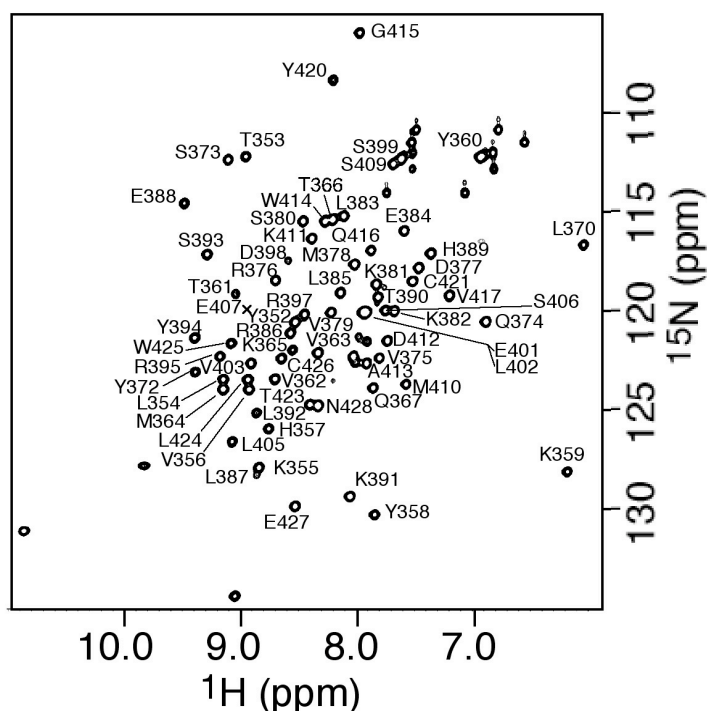


Figure 26: Spectre 2D-HSQC (¹H, ¹⁵N) du domaine PB1 de p67^{phox}, 600 MHz, 25°C. Pour chaque acide aminé attribué, le pic est annoté avec la nature de l'acide aminé (avec le code à une lettre) et son numéro de résidu dans la séquence protéique de p67^{phox}.

Les pics sont bien répartis dans la gamme spectrale, ce qui est représentatif d'une protéine bien structurée.

L'attribution quasi complète de la chaîne principale de la protéine (¹H^N, N, C^α, CO, H^β) et des C^β de la chaîne latérale a été obtenue pour les résidus P351 à N428. Au sein de cette séquence, seuls les résidus N400, D408, K418 et N419 n'ont pas été attribués. Cela correspond à 87% d'attribution du domaine PB1 de p67^{phox} (résidus 345-428) tel qu'il est défini par Ito *et al.*, 2001. Les expériences ont été réalisées avec la protéine possédant une

étiquette poly-histidine. Cette étiquette ne se voit pas en solution, ce qui indique des changements conformationnels de cette région de la protéine.

Nous avons ensuite délimité les structures secondaires du domaine PB1^{p67}. Pour cela, nous avons réalisé l'ensemble des expériences décrites en annexe. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 27.

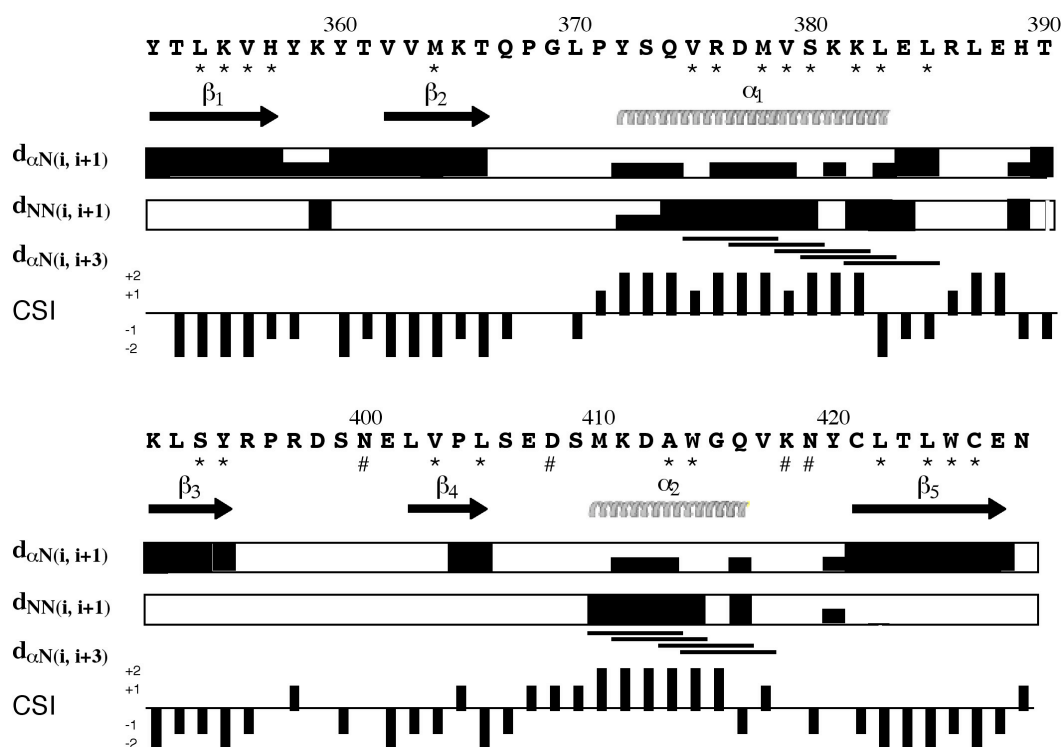


Figure 27 \square Structures secondaires du domaine PB1 de p67^{phox}. Les structures secondaires ont été délimitées à partir des mesures d'échange de H avec le D, l'index de déplacement chimique (CSI) et les distances inter-protons ($d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$). Les protons amides en échange lent avec le D, sont indiqués par * et les résidus non attribués sont indiqués par #.

Le domaine PB1^{p67} contient deux hélices α et cinq brins β : hélice α_1 (résidus 372-383), hélice α_2 (résidus 410-416), brin β_1 (résidus 352-357), brin β_2 (résidus 362-366), brin β_3 (résidus 391-394), brin β_4 (résidus 402-405), brin β_5 (résidus 421-427). La structuration en $\alpha_1/\beta_2/\beta_1/\beta_3/\beta_4/\alpha_2/\beta_5$ observée pour le domaine PB1^{p67} est de type ubiquitine.

L'organisation des brins β a été réalisée à partir des distances NOEs inter-protons (H^N-H^N et H^N-H^β) et des échanges H/D. La topologie du feuillet β est présentée sur la Figure 28.

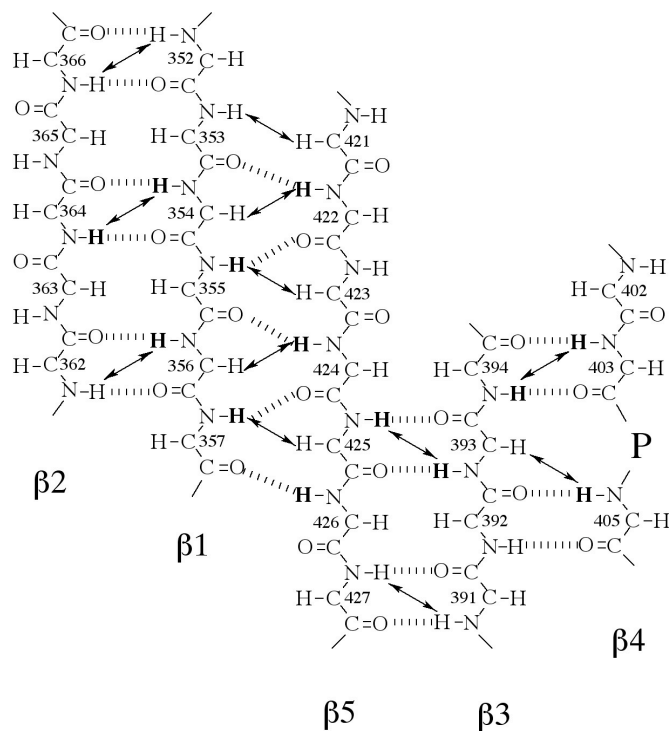


Figure 28 Organisation du feuillet β du domaine PB1 de p67^{phox}. Les protons amide en échange lent avec le D sont représentés en gras et les couplages dipolaires (NOEs) observés entre protons H^N-H^N et H^NH^D sont indiqués par une double flèche.

Les cinq brins β forment un feuillet avec l'organisation $\beta_2/\beta_1/\beta_5/\beta_3/\beta_4$. Les brins β_2/β_1 , β_5/β_3 , β_3/β_4 sont dans une conformation anti-parallèle et β_1/β_5 sont positionnés de façon parallèle.

Le calcul du modèle structural de PB1^{p67} a été réalisé à partir de la délimitation des structures secondaires, de 30 liaisons hydrogènes déterminées d'après les échanges lents proton/deutérium et de 52 distances inter-proton. Ces distances sont définies à partir de la mesure de NOEs méthyle-méthyle. Les groupements méthyles appartenant à des résidus hydrophobes qui sont généralement au cœur de la protéine, ces NOEs contraignent donc son repliement. Ces données ont ensuite été intégrées dans un calcul de dynamique moléculaire qui tient compte du champ de force. Un ensemble de 80 structures a été calculé par le programme Discover (Accelrys). Les 22 structures de plus basse énergie expérimentale ont été retenues et superposées à partir des structures secondaires de celle de plus basse énergie (Figure 29).

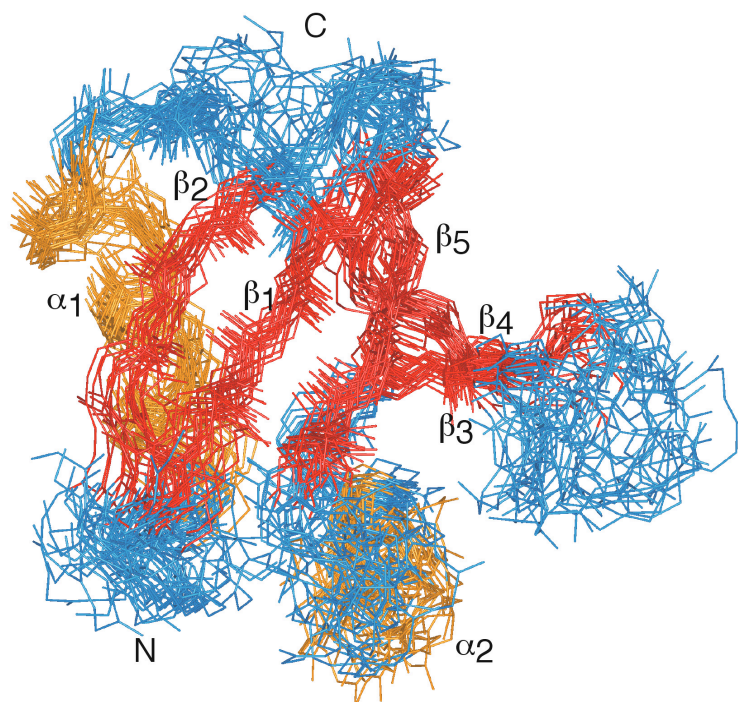


Figure 29 Ensemble des structures 3D du domaine PB1 de p67^{phox} (résidus 351-428). Les 22 structures de plus basse énergie sont superposées à partir des éléments de structures secondaires du conformère de plus basse énergie. Les extrémités amino (N) et carboxy (C) terminales ainsi que les éléments de structures secondaires sont indiqués. Les brins β sont représentés en rouge, les hélices α 1 et α 2 en jaune.

Le repliement de PB1^{p67} en solution est bien défini. Les structures de plus basse énergie expérimentale forment une ensemble homogène. Le r.m.s.d. moyen a été calculé à partir des atomes C α , N et CO des résidus 352 à 427 par rapport à la position de la structure moyenne. Il est de 1,35Å, ce qui est tout à fait correct. Cela dénote une bonne définition du repliement global. Les régions les moins bien définies sont principalement les boucles, notamment celle formée entre les brins β ₃ et β ₄ (résidus 395 à 402) (Figure 29).

Au cours de ce travail par RMN sur les domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}, une équipe anglaise a publié la structure cristallographique du complexe formé par ces deux domaines avec des séquences quasi identiques (PB1^{p67} résidus 352-429, PB1^{p40} résidus 237-339) (Wilson *et al.*, 2003). Nous avons donc comparé la structure cristallographique du domaine PB1 de p67^{phox} en complexe avec son partenaire, avec la structure moyenne de PB1^{p67} seul en solution, en les superposant (Figure 30).

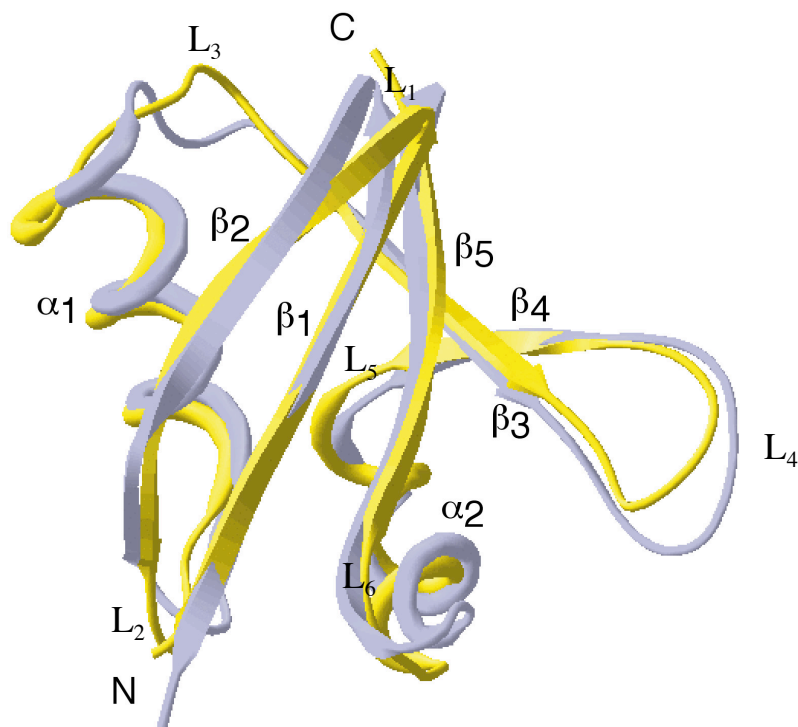


Figure 30 Superposition de la moyenne des structures RMN du domaine PB1^{p67} seul (jaune) et de la structure cristallographique du domaine PB1^{p67} en complexe avec PB1^{p40} (bleu clair) (Wilson *et al.*, 2003).

Globalement, le repliement de la chaîne principale du domaine PB1 de p67^{phox} obtenu en solution et par cristallographie est très proche. La délimitation des structures secondaires obtenues par RMN est quasi similaire à celle déterminée par cristallographie. L'orientation relative des structures secondaires est la même dans les deux types de structure. Sur la Figure 30, on remarque quelques différences dans le positionnement des boucles. Cependant, dans le modèle RMN (Figure 29), ces boucles sont plus ou moins bien définies.

3-c) Etude structurale de PB1^{p40} seul

Une analyse plus fine des séquences et la résolution des premières structures de PCCRs ont révélé que ces régions sont également des domaines PB1 (Ponting *et al.*, 2002; Yoshinaga *et al.*, 2003). p40^{phox} possède donc un domaine PB1 délimité par les résidus 237 à 329 inclus (banque de données SMART). Un spectre 2D-HSQC (¹H-¹⁵N) de la région C-terminale de p40^{phox} (résidus 231-339) correspondant au domaine PB1 plus une extension C-terminale de 10 résidus, a d'abord été réalisé (Figure 31).

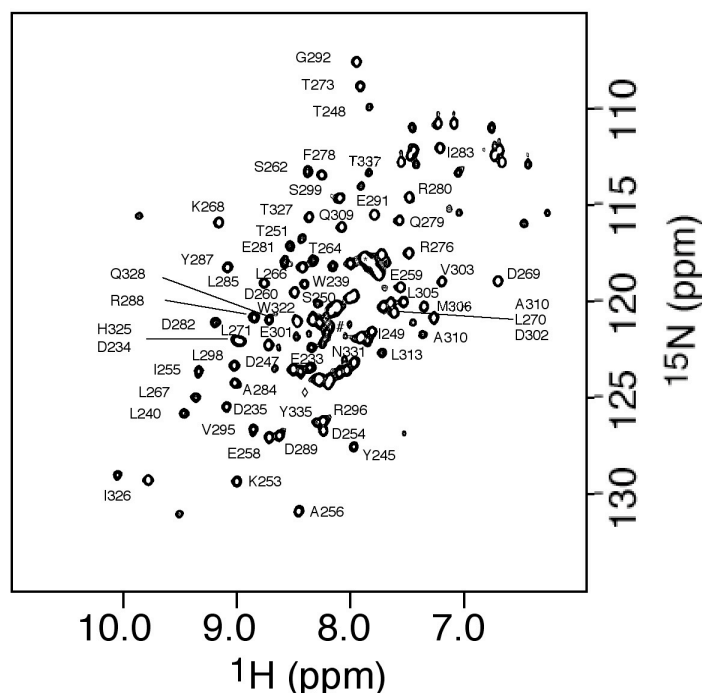


Figure 31 Spectre 2D-HSQC (^1H , ^{15}N) de p40-Cter, 800 MHz, 25°C. Les pics attribués sont annotés avec la nature de l'acide aminé et son numéro de résidu dans la séquence protéique de p40^{phox}. Pour plus de clarté, certains pics du spectre ne sont pas annotés.

Les pics sont à nouveau bien dispersés, ce qui montre que la région C-terminale de p40^{phox} est bien structurée.

L'attribution des atomes de la chaîne principale (H^{N} , N, C^{α} , CO, H^{β}) et des C^{β} de la chaîne latérale est quasi complète pour les résidus comprenant P231 à P339. Cependant la région S315 à F320 ainsi que les résidus C242, Y243, Y244, D300, G312, Y332, T333 et N336 n'ont pas pu être attribués. Ceci représente 88% d'attribution du domaine PB1 tel qu'il est défini par la banque de données SMART (résidus 237-329) ou 86% de la région C-terminal de p40^{phox}, comprenant les 10 acides aminés terminaux de p40^{phox}, identifiée par Nakamura *et al.* (1998).

Les éléments de structures secondaires ont également été délimités à partir des échanges H/D, du Chemical Shift Index (CSI) et des NOEs $^1\text{H}(i)$ - $^1\text{H}(i+1)$, comme résumé sur la Figure 32.

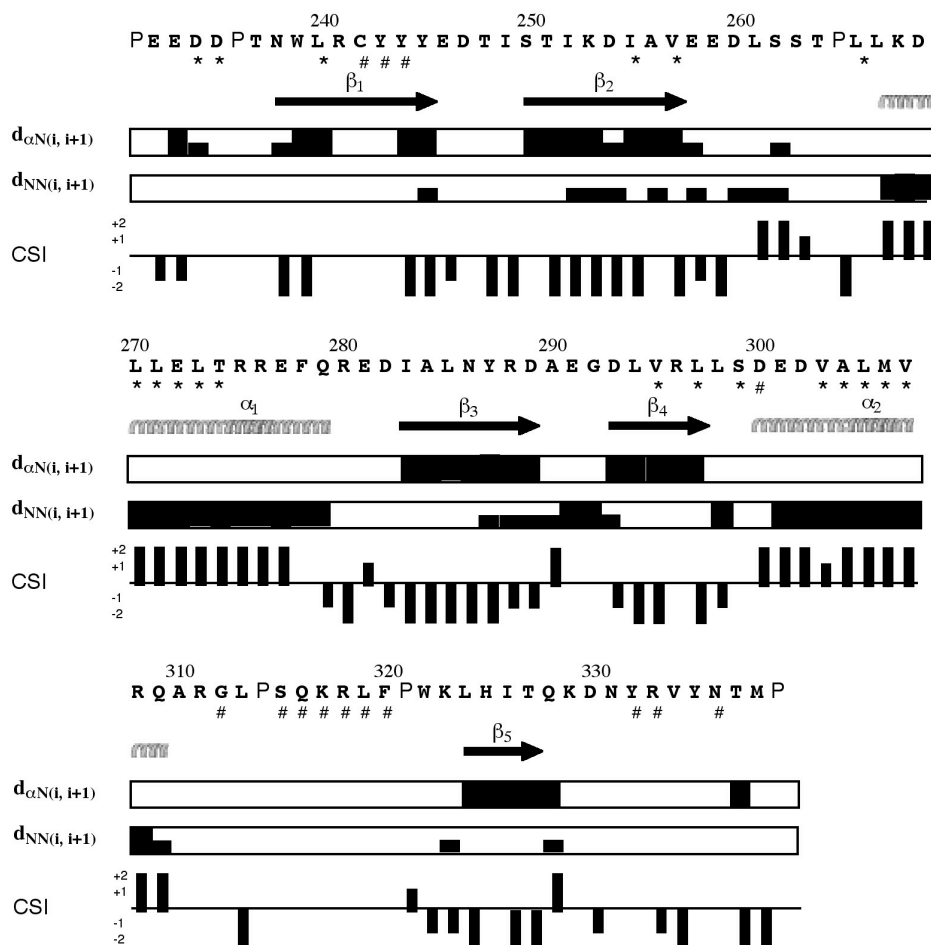


Figure 32 Structures secondaires de p40Cter. Les structures secondaires ont été délimitées à partir des mesures d'échange de H avec le D, le Chemical Shift Index (CSI) et les distances inter-protons ($d_{\alpha N(i,i+1)}$, $d_{NN(i,i+1)}$). Les protons en échange lent avec le D, sont indiqués par * et les résidus non attribués sont indiqués par #.

Le domaine PB1 de p40^{phox} comporte deux hélices α et cinq brins β [hélice α_1 (résidus 267-279), hélice α_2 (résidus 300-309), brin β_1 (résidus 238-245), brin β_2 (résidus 362-366), brin β_3 (résidus 283-289), brin β_4 (résidus 293-297), brin β_5 (résidus 324-327)]. Comme pour le domaine PB1^{p67}, PB1^{p40} possède une topologie en $\alpha_1/\beta_2/\beta_1/\beta_3/\beta_4/\alpha_2/\beta_5$ de type ubiquitine.

L'organisation des brins β a été réalisée à partir de quelques couplages dipolaires (H^N-H^N et H^N-H^β) détectés et des échanges H/D. La topologie du feuillet β est présentée sur la Figure 33.

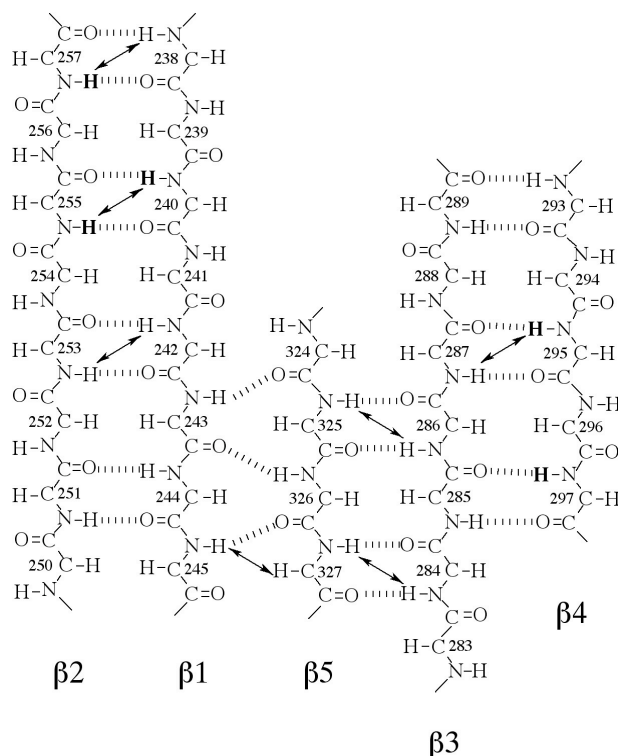


Figure 33 Organisation du feuillet β du domaine PB1 de $p40^{phox}$. Les protons amide en échange lent avec le D sont représentés en gras et les couplages dipolaires (NOEs) observés entre protons H^N-H^N et H^N-H^D sont indiqués par une double flèche.

L'organisation du feuillet β de $PB1^{p40}$ est identique à celle du $PB1^{p67}$: la topologie des cinq brins β est $\beta_2/\beta_1/\beta_5/\beta_3/\beta_4$, avec $\beta_2-\beta_1$, $\beta_5-\beta_3$, $\beta_3-\beta_4$ en anti-parallèle et $\beta_1-\beta_5$ parallèles. Cette observation va dans le sens que le PCCR de $p40^{phox}$ est bien un domaine PB1 et que la région C-terminale de $p40^{phox}$ correspond bien à ce domaine.

Nous n'avons pas pu continuer l'étude structurale de la région C-terminale de $p40^{phox}$ afin d'obtenir le repliement tri-dimensionnelle de cette région. Le manque de stabilité de la protéine en solution, notamment à des concentrations supérieures à $300\ \mu\text{M}$, a été limitant pour l'acquisition de données nécessaires à l'attribution des chaînes latérales et donc pour la détermination de distances inter-protons.

Cependant, d'après la détermination des structures secondaires de $p40\text{-Cter}$, la topologie du domaine $PB1^{p40}$ est très proche de celle révélée par la structure cristallographique du domaine $PB1^{p40}$ en complexe.

3-d) Étude des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} en complexe

Tout d'abord, la formation du complexe a été testée. Les protéines PB1^{p67} et p40C-ter seules et en complexe (1,5 μ l respectivement) ont été injectés sur colonne gel filtration Superdex 75 analytique (Pharmacia) préalablement calibrée. Un échantillon des fractions correspondant aux pics d'éluion est déposé sur gel SDS-PAGE. Les résultats sont présentés sur la Figure 34.

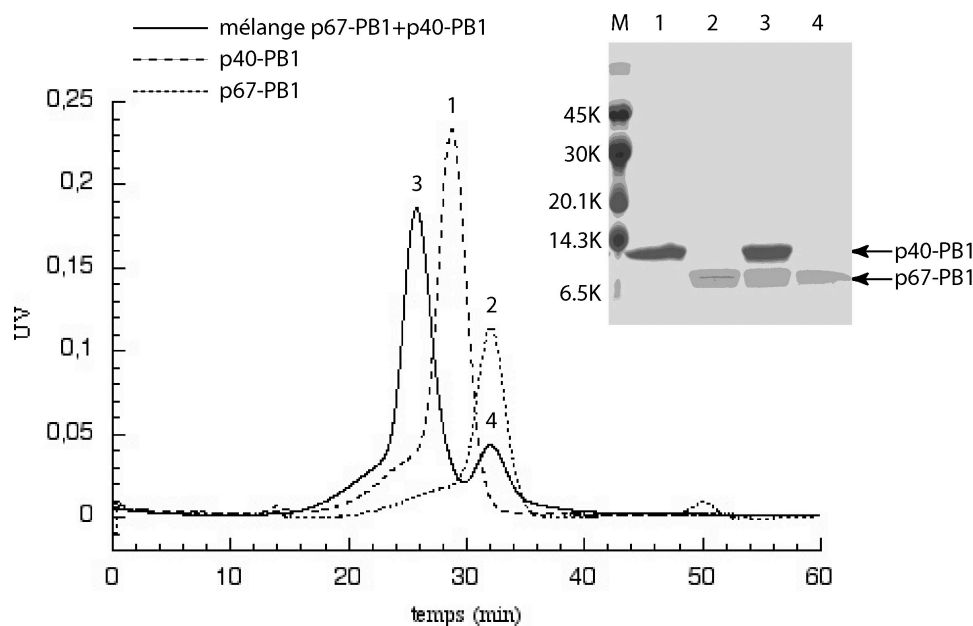


Figure 34 Formation du complexe PB1^{p67}/p40-Cter. Chromatogramme de la colonne gel filtration Superdex 75 analytique (Pharmacia) des protéines p67-PB1 et p40-Cter seules et en complexe (1,5 μ l respectivement). La DO_{280nm} (UV) est représentée en fonction du temps. Un échantillon protéique des fractions correspondant aux pics d'éluion a été déposé sur gel SDS-PAGE.

Le mélange injecté présente le pic correspondant au complexe formé (présence des deux protéines sur gel SDS-PAGE pour le pic n°3) et un pic dû à l'excès de p40-Cter (pic n°4). Le complexe entre les deux domaines PB1 s'est donc bien formé. De plus, d'après la calibration, les volumes d'éluion indiquent que le complexe est formé avec une stoechiométrie 1:1.

Puis les complexes entre l'un des domaines PB1 doublement marqué (¹⁵N/¹³C) et son partenaire non marqué sont formés (PB1^{p67}(¹⁵N-¹³C)/p40-Cter et PB1^{p67}/p40-Cter (¹⁵N-¹³C)). Le domaine non marqué, invisible sur les spectres RMN 2D-HSQC (¹H, ¹⁵N), modifie l'environnement des atomes des acides aminés de la protéine marquée situés à la surface d'interaction. De cette modification, résulte une variation de fréquence de résonance de ces

atomes comme le proton et l'azote. Il est donc possible de visualiser sur un spectre 2D-HSQC (^1H , ^{15}N) les groupements amide affectés par la complexation. La Figure 35 montre la variation de déplacement chimique (ΔCS) (Chemical Shift Mapping) du groupement amide (^1H et ^{15}N) entre le domaine PB1 seul et en complexe et cela pour PB1^{p67} et p40-Cter. Cette variation est considérée comme significative si $\Delta\text{CS} \geq [(\Delta\text{N}_{\text{ppm}})^2 + (\Delta\text{H}_{\text{ppm}}/\gamma)^2]^{1/2} \geq 2,0$ ppm. Quelques résidus de PB1^{p67} ont une variation de déplacement chimique particulièrement forte avec $\Delta\text{CS} \geq 5,0$ ppm.

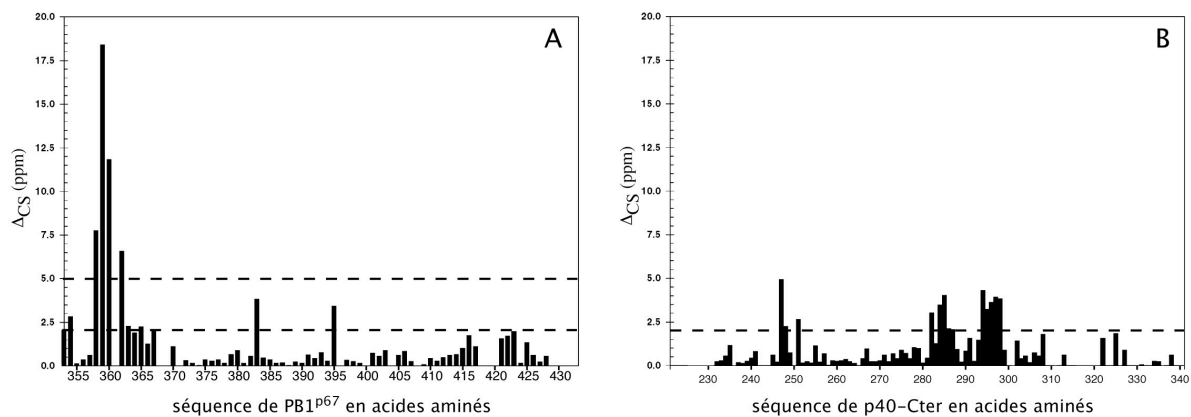


Figure 35 Variation de déplacement chimique ΔCS (en ppm) des groupements amides (^1H , ^{15}N) des acides aminés de PB1^{p67} (A), et de p40-Cter (B), due à la formation du complexe entre les deux partenaires. Les seuils significatifs de variation de déplacement chimique (2,0 ppm et 5,0 ppm pour PB1^{p67}) sont indiqués par des tirets.

Pour les deux domaines PB1, bien que la majorité des résidus ne semblent que peu affectés par la présence du domaine partenaire, un certain nombre de groupements amides montre une variation de déplacement chimique significative. Ceci confirme que le complexe entre les deux partenaires s'est bien formé.

Pour caractériser les acides aminés situés sur la surface d'interaction, il faut préalablement attribuer les atomes de la chaîne principale (H^α , $\text{C}^\alpha(i)$, $\text{C}^\alpha(i-1)$, $\text{C}^\beta(i-1)$ et $\text{CO}(i-1)$) de la protéine marquée dans le complexe. L'ensemble des atomes du squelette de PB1^{p67} attribués pour le domaine seul a été attribué dans le complexe, sauf pour les résidus G369 et Y420. Seulement 67% des atomes de la chaîne principale de p40-Cter, des résidus 234 à 339, ont été attribués. En effet, les données obtenues pour p40-Cter étaient de moins bonne qualité que celles obtenues pour PB1^{p67}. Cela provenait essentiellement du manque de stabilité de p40-Cter en solution et des faibles concentrations auxquelles nous étions obligés de travailler. En particulier, aucune attribution pour les 10 résidus C-terminaux de p40^{phox}, extérieurs au

domaine PB1, (représentés en rose sur la Figure 36) n'a été obtenue. Ceci est peut-être dû à une mobilité de cette région en solution. D'après la structure cristallographique (Wilson *et al.*, 2003), ces dix derniers résidus forment un bras qui se replie sur le domaine PB1 de p67^{phox}. (Figure 36A).

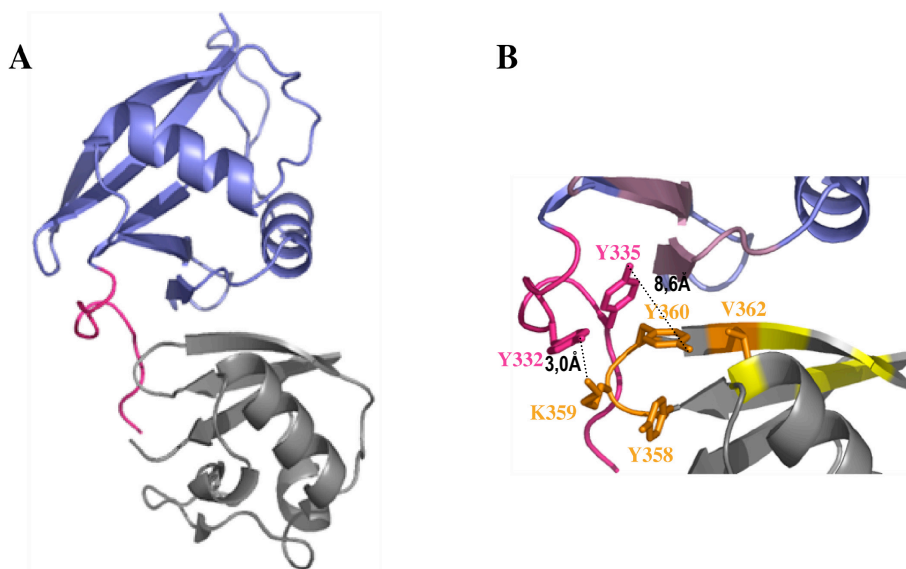


Figure 36: Structure cristallographique du complexe PB1^{p67}/p40-Cter. A) Le domaine PB1^{p67} est représenté en gris, p40-Cter en bleu et son bras C-terminal en rose. B) Les tyrosines 332 et 335 du bras C-terminal de p40^{phox} sont en bâtonnets roses les résidus de PB1^{p67} qui ont un $\Delta\text{CS} \geq 0$ ppm sont en bâtonnets oranges les zones de PB1^{p40} et PB1^{p67} affectées par l'interaction (résidus avec $\Delta\text{CS} \geq 0$ ppm) sont représentées en rose clair et en jaune. Les pointillées correspondent aux distances mesurées avec PyMol. (code PDB 1OEY figure réalisée avec PyMol).

Nous avons donc déterminé les acides aminés affectés par la complexation pour les deux domaines PB1. Il s'agit des résidus T353, L354, Y358, K359, Y360, V362, V363, K365, Q367, L383 et R395 de PB1^{p67} et des résidus D247, T248, T251, D282, A284, L285, N286, Y287, L294, V295, R296, L297, L298 de p40-Cter.

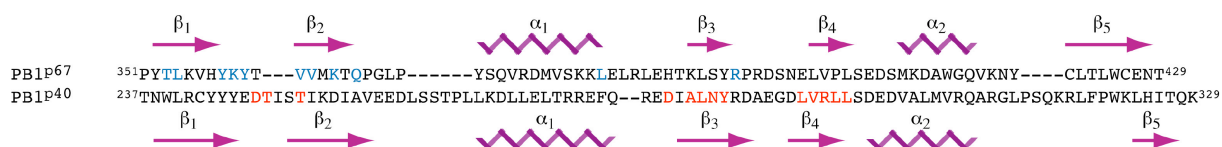


Figure 37) Alignement des séquences des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}. Les structures secondaires correspondant à PB1^{p67} et PB1^{p40} sont indiquées respectivement au-dessus et au-dessous des séquences. Les résidus qui ont une variation de déplacement chimique $\Delta\text{CS} \geq 0$ ppm sont indiqués en bleu pour PB1^{p67} et en rouge pour PB1^{p40}.

La variation de déplacement chimique de ces acides aminés ($\Delta\delta_{CS}$ 2-10 ppm) est visualisée sur les structures cristallographiques des domaines PB1 (Wilson *et al.*, 2003) (Figure 38). Ces résidus forment un cluster sur une face de chacun des deux domaines PB1 (Figure 38 A et B). Ces surfaces d'interaction caractérisées par RMN sont en accord avec l'interface obtenue par cristallographie pour les deux domaines PB1 (Figure 38 C et D). Certains résidus, comme L383 située à la fin de l'hélice α_1 de PB1^{p67} ou D247, T248, présents dans la boucle β_1/β_2 de PB1^{p40}, et T251, situé au début du brin β_2 de PB1^{p40}, présentent une variation de déplacement chimique $\Delta\delta_{CS}$ 5-10,0 ppm mais n'appartiennent pas à la surface d'interaction. Cette variation peut refléter des effets longues distances de la formation du complexe, comme des mouvements locaux.

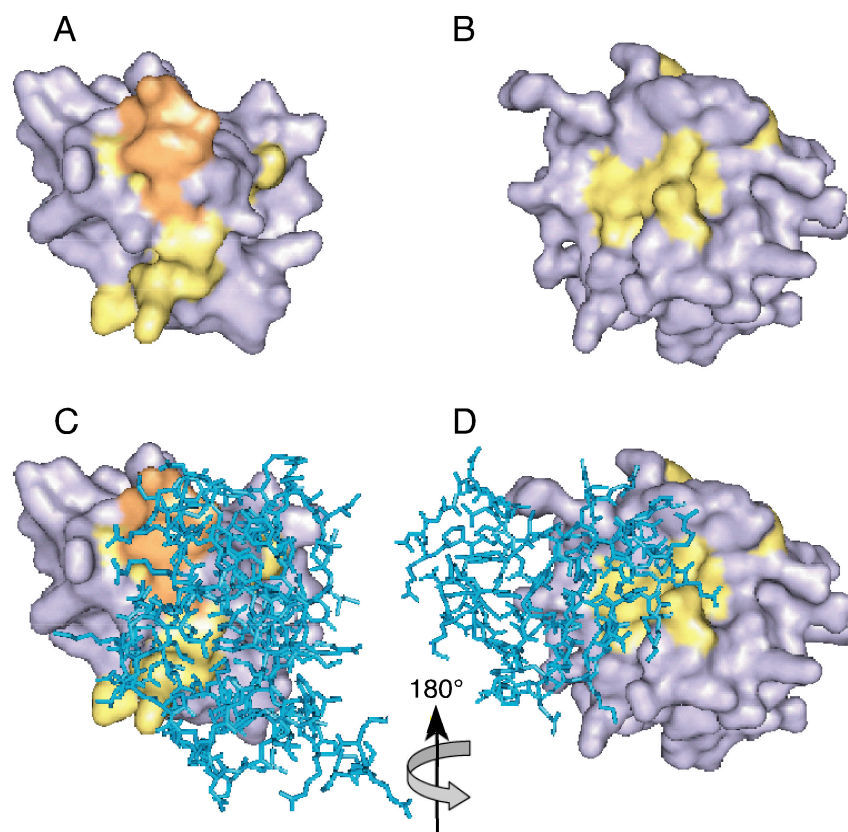


Figure 38 Représentation des variations de déplacement chimique ($\Delta\delta_{CS}$) (Chemical Shift Mapping) sur la surface des domaines PB1 obtenue à partir de la structure cristallographique du complexe (Wilson *et al.*, 2003). A et C surface du domaine PB1^{p67} B et D surface du domaine PB1^{p40}. Les résidus dont $\Delta\delta_{CS}$ 2-10 ppm sont représentés en orange et ceux dont 5-10 ppm sont représentés en jaune. Sur C et D, le domaine partenaire dans le complexe est représenté en bâtonnets bleus. (Figure réalisée avec PyMol).

La forte variation de déplacement chimique ($\Delta\delta_{CS}$ 5-10 ppm) des résidus Y358, K359, Y360 et V362 de PB1^{p67} (Figure 35) peut être expliquée par la structure cristallographique du complexe. Elle est due à la présence de résidus aromatiques (Y332 et Y335) situés dans le

bras C-terminal de p40^{phox} (Figure 36B). Les cycles aromatiques génèrent un changement important de l'environnement des résidus placés à proximité, en particulier lorsque ceux-ci sont perpendiculaires au plan formé par le cycle. De plus, la tyrosine 332 du bras de p40^{phox} forme une liaison hydrogène avec la lysine 359 de PB1^{p67} (distance de 3,02Å entre l'oxygène de Y332^{p40} et l'azote de K359^{p67}), ce qui explique la variation de déplacement chimique spectaculaire de K359^{p67} lors de la complexation.

3-e) Mobilité de la chaîne principale de PB1^{p67}

La structure du squelette de PB1^{p67} en solution est très proche de la structure cristallographique du domaine en complexe. La seule véritable différence observée se situe au niveau de la boucle entre β 3 et β 4. Or, peu de contraintes ont été imposées sur cette boucle pour le calcul de structures. Ce manque d'informations structurales sur cette région peut être dû, soit à un manque de qualité des données, soit à des changements conformationnels de cette région de la protéine. Dans les deux cas, il est difficile d'observer des distances entre protons (NOEs). Nous avons donc cherché à obtenir des informations sur la dynamique de la chaîne principale de PB1^{p67} seul et en complexe avec p40-Cter.

La mobilité du squelette est évaluée à partir de la relaxation du ¹⁵N. Les expériences sont donc réalisées avec le domaine PB1 marqué ¹⁵N, seul ou en complexe avec p40-Cter non marqué. Les NOEs hétéronucléaires {¹H}-¹⁵N ont été mesurés. Ils sont sensibles aux mouvements des vecteurs N-H. Ils donnent donc une idée sur l'amplitude du mouvement rotationnel du vecteur N-H à une échelle de temps rapide, de l'ordre de la pico à la nanoseconde. Cela revient à suivre le rapport des intensités des pics au cours du temps. Il n'a pas été tenu compte des pics superposés et ceux dont l'intensité est faible. Ces NOEs hétéronucléaires sont appelés \square sur la Figure 39.

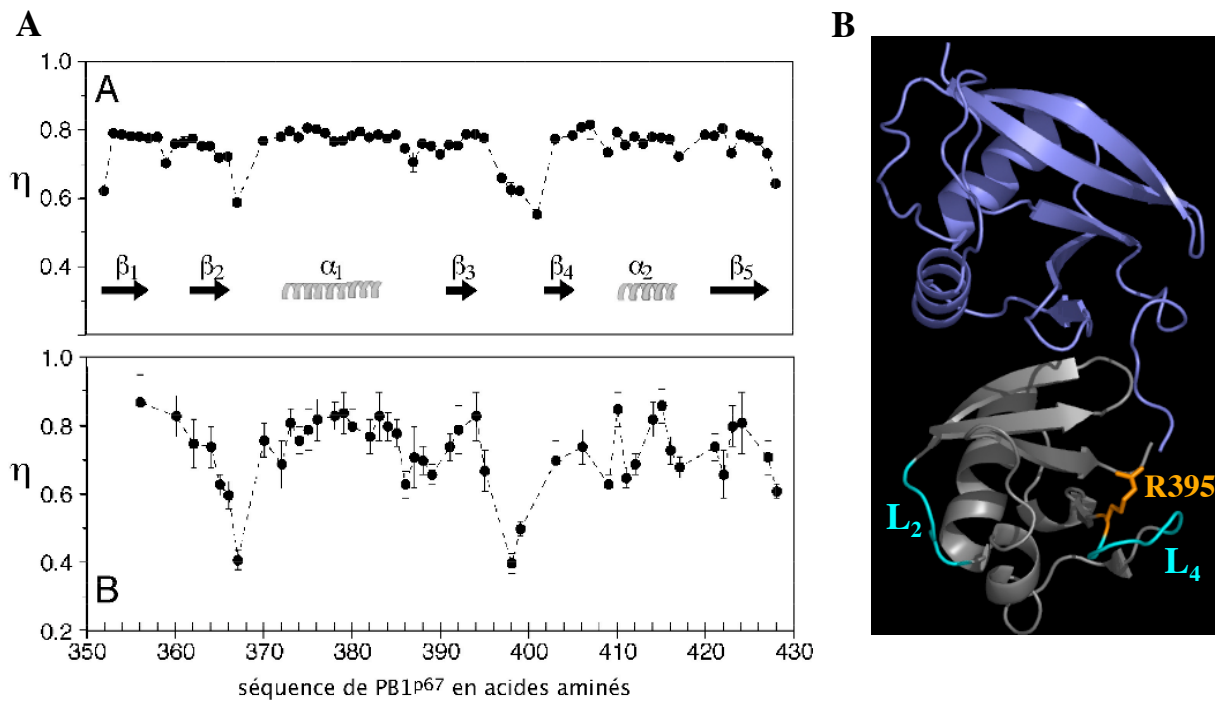


Figure 39 Mobilité de la chaîne principale de PB1^{p67}. **A** Le paramètre η (¹H-¹⁵N NOEs) a été mesuré pour PB1^{p67} seul (A) et en complexe avec p40-Cter (B). η est représenté en fonction de la séquence en acides aminés du domaine PB1. Les structures secondaires de PB1^{p67} sont indiquées. **B** structure cristallographique du complexe PB1^{p67}/p40-Cter. Les boucles L₂ et L₄ mobiles sont indiquées en cyan et l'arginine 395 est représentée en bâtonnets oranges.

La majorité des vecteurs N-H ont un η proche de 0,8 à température ambiante, ce qui est caractéristique d'une protéine globulaire rigide. Certaines régions du domaine PB1^{p67} seul ont un η inférieur à 0,7, ce qui indique une légère augmentation de la mobilité du squelette. C'est le cas pour les extrémités N- et C- terminales, ainsi que pour les boucles situées entre le brin β_2 et l'hélice α_1 (boucle L1) et les brins β_3 et β_4 (boucle L2) (Figure 39 A et B).

Le même profil dynamique est observé pour le domaine PB1^{p67} en complexe avec p40-Cter (Figure 39 B). La qualité des données est inférieure à celle obtenue pour PB1^{p67} seul (barres d'erreur plus importantes). Ceci est dû à une concentration de l'échantillon plus faible dans ce cas, pour une masse moléculaire quasiment deux fois plus importante. Les boucles L1 et L2 ont également une mobilité plus importante que le reste de la chaîne principale. De façon surprenante, la valeur de η au niveau de ces boucles est plus basse pour PB1^{p67} en complexe que libre. Ceci indique qu'il y a une augmentation d'entropie due à la complexation entre les deux domaines PB1.

4- Discussion

4-a) Structure et mobilité de PB1^{p67} seul et en complexe avec p40-Cter

Dans cette partie, je vais me focaliser sur certaines boucles du domaine PB1 de p67^{phox} qui me semble particulièrement intéressantes.

La boucle formée entre les brins α_1 et α_2 (boucle L1) est relativement bien définie d'après la superposition des structures de plus basse énergie (Figure 29). Les mesures de NOEs hétéronucléaires $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ montrent que cette boucle n'est pas mobile en solution. Or, la comparaison des structures RMN de PB1^{p67} avec la structure cristallographique du domaine en complexe avec p40-Cter montre une différence dans l'orientation de la boucle L1 (illustrée sur la Figure 30). Cela peut provenir du fait que l'une des structures de PB1^{p67} est obtenue en solution, l'autre dans un cristal où des interactions protéine/protéine peuvent contraindre la structure. Cette différence peut également s'expliquer par le fait que l'une des structures correspond à PB1^{p67} libre et l'autre à PB1^{p67} en complexe avec son partenaire. Or, la structure cristallographique satisfait l'ensemble des contraintes RMN au niveau des structures secondaires. De plus, ces brins α_1 et α_2 sont impliqués dans l'interaction (Figure 35 et Figure 45). La différence ne semble donc pas provenir de l'empilement cristallin mais plutôt de la complexation. Cependant, des contraintes structurales complémentaires pour la protéine en solution permettraient d'affiner l'orientation de cette région et de définir précisément l'effet de la complexation.

Les différentes structures RMN de PB1^{p67} proposent un large éventail de positions pour les boucles formées entre α_2/α_1 (L2) et α_3/α_4 (L4), limitées toutefois par l'ancrage au brin α_2 et à l'hélice α_1 pour la boucle L2 et aux brins α_3 et α_4 pour la boucle L4. Aucune contrainte structurale (liaison hydrogène et NOE) n'a été imposée pour définir l'orientation des boucles. Il n'est donc pas surprenant d'obtenir un tel panel de positions. Cependant, les mesures de NOEs hétéronucléaires $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ montrent une mobilité de ces régions qui augmentent lors de la complexation à p40-Cter.

La boucle L2, formée des résidus 367 à 371 dont deux prolines non attribuées, ne semble pas affectée par la complexation d'après la carte des variations chimiques (Figure 35 et Figure 45). L'augmentation de la mobilité de cette boucle peut donc provenir d'une réorientation suite à la formation du complexe.

Par contre, la boucle L4, composée des résidus 395 à 401 dont seul le résidu N400 n'est pas attribué dans le complexe, possède un résidu affecté par l'interaction (Figure 35 et Figure 45). Il s'agit de l'arginine 395 de PB1^{p67}, présente au tout début de la boucle. D'après la structure cristallographique du complexe entre les domaines PB1 (Wilson *et al.*, 2003) cette arginine forme une liaison hydrogène avec la proline 339 du bras C-terminal de p40^{phox} (Figure 40). Il est donc possible que la boucle L4 de PB1^{p67}, déjà mobile en solution, vienne interagir avec le bras de p40^{phox} lors de la formation du complexe, augmentant ainsi l'amplitude de son mouvement. D'après la structure cristallographique du complexe, une seconde liaison hydrogène est également formée entre le tryptophane 425 C-terminal de PB1^{p67} et la thréonine 337 du bras de p40^{phox} (Figure 40). Ces deux liaisons hydrogènes soulignent l'importance du bras C-terminal de p40^{phox} spécifique du système phox.

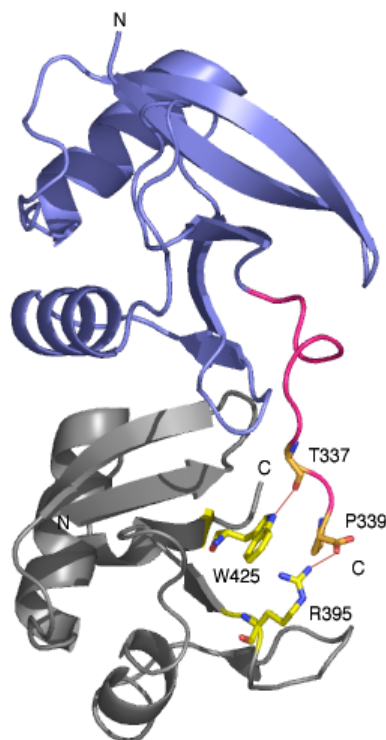


Figure 40 Structure cristallographique du complexe PB1^{p67}/p40-Cter. Le domaine PB1^{p67} est représenté en gris et p40-Cter en bleu. Les résidus T337 et P339 (bâtonnets oranges) du bras C-terminal de p40^{phox} (rose) forment des liaisons hydrogène (traits rouges) respectivement avec les résidus W425 et R395 (bâtonnets jaunes) du domaine PB1^{p67} (gris). (Wilson *et al.*, 2003 code PDB 1OEY figure réalisée avec PyMol).

Un autre fait souligne l'importance de l'interaction du bras C-terminal de p40^{phox} avec PB1^{p67}. Une mutation de cette arginine 395 en tryptophane (R395W) a été découverte dans le gène codant pour p67^{phox} chez des patients atteints de CGD. Ces patients présentent également une délétion des résidus 19 à 21 de p67^{phox}, dans le domaine TPR N-terminal, entraînant

l'absence du facteur cytosolique (Noack *et al.*, 1999 □ Patiño *et al.*, 1999). La reconstitution de la mutation R395W avec des protéines recombinantes conduit à une diminution d'environ 50% de l'efficacité de dimérisation entre PB1^{p67} (R395W) et p40C-ter (Wilson *et al.*, 2003). La liaison hydrogène formée entre l'arginine 395 de PB1^{p67} et la proline 339 du bras C-terminal de p40^{phox} semble donc importante pour la stabilisation du complexe entre les domaines PB1. Or, cette hétérodimérisation est déterminante pour l'interaction entre les facteurs cytosoliques p67^{phox}/p40^{phox} essentielle à l'activité oxydase. Ces données structurales, combinées aux données biochimiques, montrent donc l'importance d'une interaction forte et stable entre p67^{phox} et p40^{phox} pour l'activité oxydase, bien qu'actuellement, aucune mutation CGD n'ait été découverte pour le gène codant pour p40^{phox}.

4-b) Topologie des domaines PB1

L'analyse des séquences de protéines capables d'interagir avec une région PCCR a révélé l'existence de domaine PB1. Il existe donc au sein de divers systèmes biologiques des interactions PCCR/PB1. Puis, des données structurales de PCCRs a montré que ces régions sont également des domaines PB1 (Ponting *et al.*, 2002 □ Yoshinaga *et al.*, 2003). En effet, parallèlement à la structure cristallographique et RMN des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}, plusieurs groupes ont résolu la structure de domaines PB1. Or, l'ensemble de ces domaines possèdent un repliement compact de type ubiquitine avec une topologie $\beta_1/\beta_2/\alpha_1/\beta_3/\alpha_4/\beta_4/\beta_5$ (Figure 41).

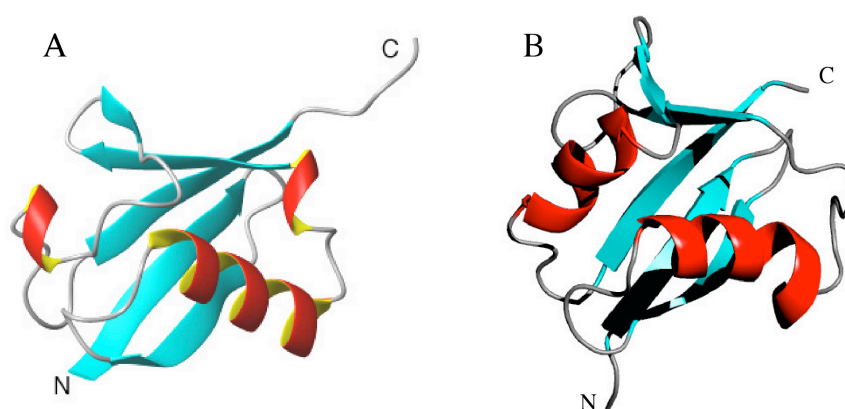


Figure 41 □ Topologie de type ubiquitine. A □ structure cristallographique de l'ubiquitine. Code PDB □ 1UBQ, Vijay-Kumar *et al.*, 1987. B □ structure RMN de plus basse énergie de PB1^{p67}.

Cette topologie est retrouvée pour la plus grande majorité des domaines PB1. Seule la structure RMN du domaine PB1 de la protéine Bem1p de la levure révèle la présence de quatre brins β au lieu de cinq (Terasawa *et al.*, 2001). Le brin correspondant généralement au β_4 n'est pas présent ou les données RMN n'ont pas permis de le délimiter (Figure 45).

Deux types de domaines PB1 ont alors été répertoriés. Les modules PB1 qui possèdent un motif PC, appelés PB1 de type I et ceux qui ne possèdent pas le motif PC mais une lysine strictement conservée, appelés PB1 de type II. Parmi les PB1 identifiés, certains possèdent l'ensemble de ces critères. Ces domaines peuvent potentiellement définir une troisième classe de modules, les PB1 de type I+II.

Cette nouvelle nomenclature est illustrée par le système phox. Le facteur cytosolique p40^{phox} possède donc un domaine PB1 de type I et p67^{phox}, un domaine de type II (Figure 42). Le motif PC possède un repliement compact en $\beta\beta\beta$ (Yoshinaga *et al.*, 2003).

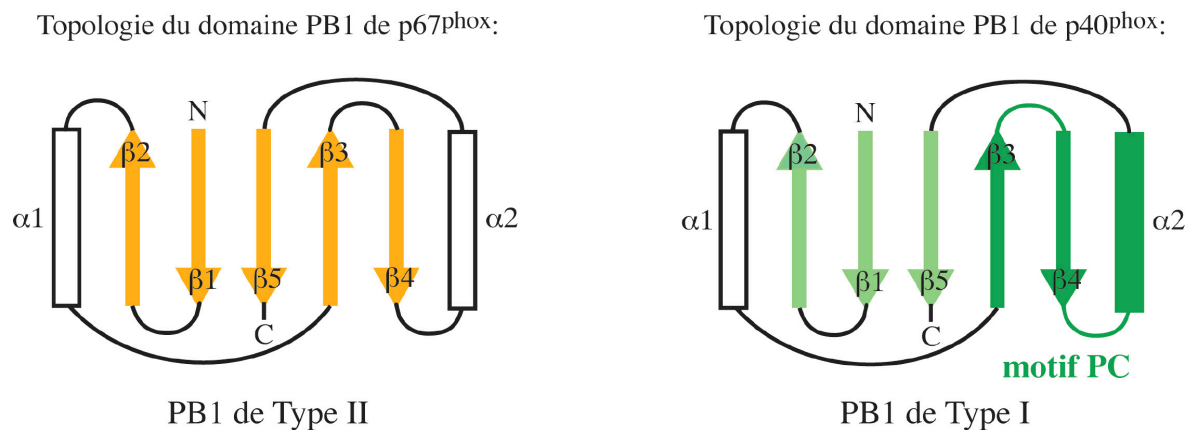


Figure 42 □ Topologie des domaines PB1 de p67^{phox} (domaine de type II) et de p40^{phox} (domaine de type I). Les brins β de PB1^{p67} sont représentés en orange, les brins β de PB1^{p40}, en vert et les hélices α en blanc. Le motif PC de PB1^{p40} correspondant à $\beta_3+\beta_4+\beta_2$, est représenté en vert plus foncé.

Pour p67^{phox} ou p40^{phox}, l'organisation du domaine PB1 ne change pas qu'il soit en solution ou dans la maille cristalline, isolé ou en complexe (Wilson *et al.*, 2003). Ces domaines PB1 possèdent toujours une organisation de type ubiquitine.

4-c) Interaction entre domaines PB1

4-c1) Base commune de l'interaction

La variation de déplacement chimique a permis d'identifier les acides aminés des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}, impliqués dans l'interaction avec le partenaire. La région de PB1^{p67} affectée par la formation du complexe avec p40-Cter se situe globalement au niveau des brins β_1 et β_2 et de la boucle formée par ces deux brins (Figure 43). Deux acides aminés sont également affectés par la présence du partenaire. Il s'agit de la leucine 383, à l'extrémité C-terminale de l'hélice β_1 , et de l'arginine 395, présente en N-terminale de la boucle $\beta_3\beta_4$. Pour p40-Cter, bien que la chaîne principale ne soit attribuée qu'à 67% dans le complexe, nous avons également identifié la région affectée par la complexation. Cette région correspond principalement aux brins β_3 et β_4 du motif PC (Figure 43). Les résidus D247, T248, présents dans la boucle β_1/β_2 , et T251, situé au début du brin β_2 , présentent aussi une variation de déplacement chimique significative (0,1-0,2 ppm). Etant donné que la région C-terminale de p40^{phox} (résidus 330-339) n'est attribuée dans le complexe, il n'est pas possible d'observer de variations de déplacement chimique. Nous ne pouvons donc pas dire si cette zone est impliquée dans l'interaction en solution.

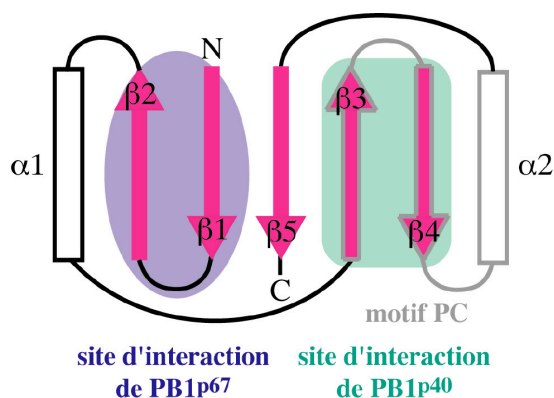


Figure 43 Zones d'interaction des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}. Les régions impliquées dans l'interaction avec le domaine partenaire sont visualisées la topologie des domaines PB1. Les zones en bleu et en vert correspondent respectivement aux régions de PB1^{p67} et de PB1^{p40} impliquées dans le complexe.

L'analyse plus précise des résidus impliqués dans l'interaction entre les domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} montre que cette interaction implique des résidus du motif PC de p40-Cter, correspondant au cluster acide de PB1^{p40}, et des résidus basiques de PB1^{p67}, proches de la lysine 355 strictement conservée (Figure 44). L'interaction PB1^{p67}/p40-Cter se réalise donc entre une surface chargée positivement d'un côté (sur PB1^{p67}) et négativement de l'autre (sur

PB1^{p40}). Il s'agit d'une interaction de type électrostatique entre ces domaines PB1. En général, les interactions de ce type sont assez fortes, environ 5 kcal/mol. L'affinité entre ces domaines PB1 est d'ailleurs de 4 nM (Wilson *et al.*, 2003). Ces modules permettent l'interaction entre les facteurs cytosoliques p67^{phox}/p40^{phox} qui forment un complexe p67^{phox}/p40^{phox} relativement fort en solution (10 nM, Lapouge *et al.*, 2002). De plus, l'interaction entre ces domaines PB1 doit être suffisante pour stabiliser l'interaction p67^{phox}/p40^{phox} en solution puisque celle-ci semble constitutive lors de l'activation de la NADPH Oxydase.

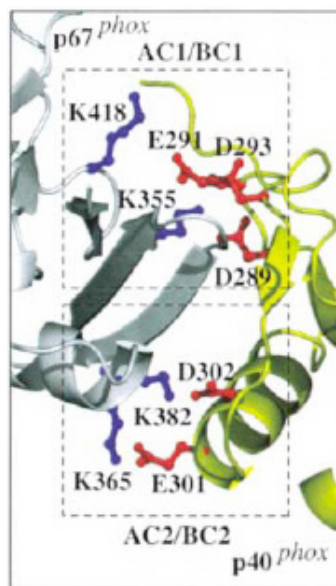


Figure 44 Résidus chargés impliqués dans l'interaction PB1^{p67}/PB1^{p40}. le PB1 de p67^{phox} est représenté en gris et celui de p40^{phox} en jaune. Les résidus acides sont en bâtonnets rouges et les résidus basiques en bâtonnets bleus. AC signifie cluster acide et BC, cluster basique.

D'après les alignements de séquences de domaines PB1, présenté sur la Figure 45, il est possible de généraliser les zones d'interaction au type de domaine. En effet, les domaines de type I, comme celui des protéines p40^{phox} et Cdc24p, ont leur surface d'interaction qui correspond globalement aux résidus acides du motif PC. A l'inverse, les domaines PB1 partenaires comme ceux des protéines p67^{phox} et Bem1p, ont une interface d'interaction correspondant aux résidus basiques situés autour de la lysine strictement conservée (K482^{Bem1p} et K355^{p67phox}) (Wilson *et al.*, 2003 ; Terasawa *et al.*, 2001 ; Yoshinaga *et al.*, 2003 ; Van Drogen-Petit *et al.*, 2004).

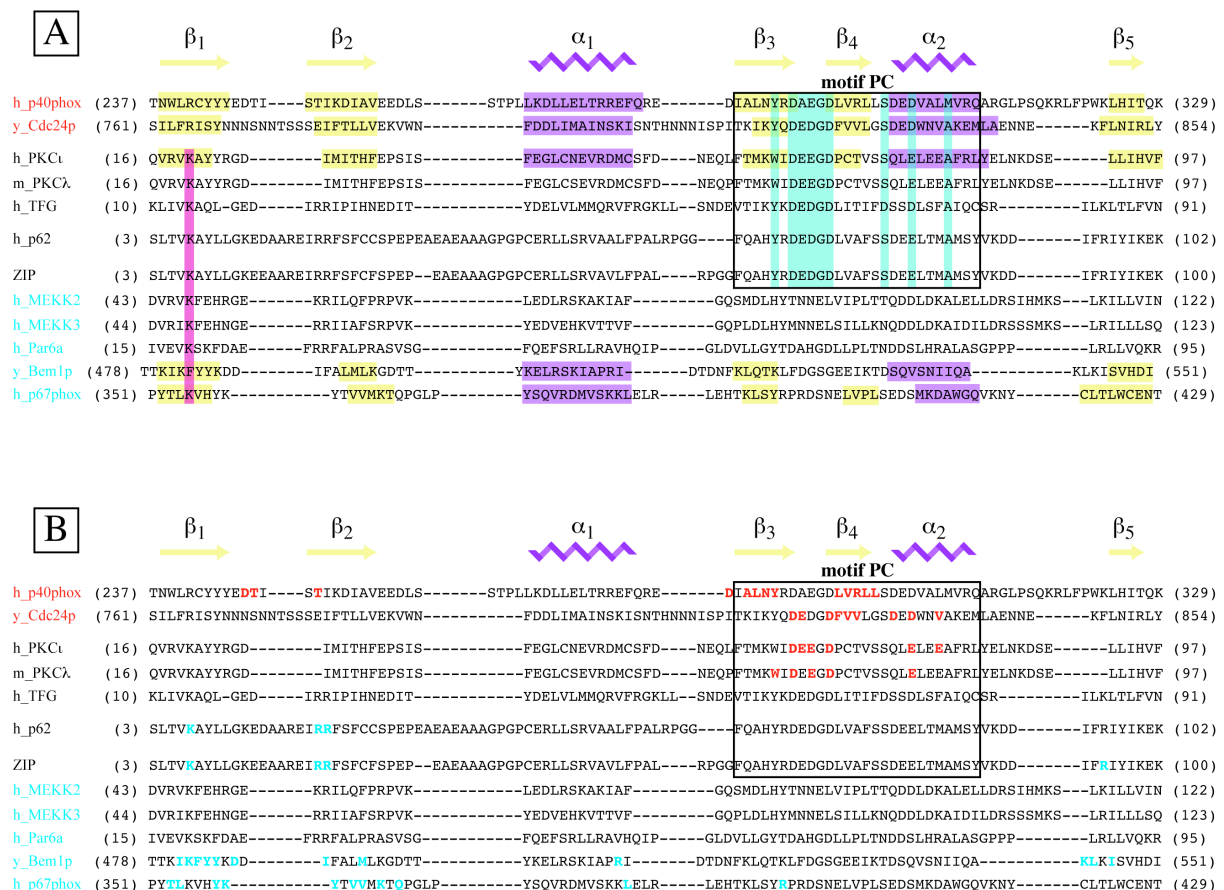


Figure 45 Alignements de séquences de domaines PB1. Différentes espèces sont représentées □ l'humain (h), la levure (y) et la souris (m). Le nom des protéines possédant un domaine PB1 de type I est indiqué en rouge, un domaine de type II en bleu clair et de type I+II en noir. Les structures secondaires sont schématisées au-dessus des séquences. A □ les séquences correspondant aux brins □ et aux hélices □ sont surlignées en jaune et mauve respectivement. La lysine surlignée en rose est strictement conservée dans la séquence des domaines PB1 de type II et I+II. Les résidus surlignés en bleu, dans le motif PC encadré, ont leur fonction conservée ou sont strictement conservés. B □ les résidus impliqués dans une interaction avec un domaine de type II sont en gras et en rouge et ceux impliqués dans une interaction avec un domaine de type I sont en gras et en bleu clair. Pour les résidus déterminés par les variations de déplacements chimiques en RMN, seuls les résidus les plus affectés par l'interaction ont été représentés. Interaction PB1^{PKC}/PB1^{ZIP} □ Hirano *et al.*, 2004 □ PB1^{p62}/PB1^{PKC} □ Lamark *et al.*, 2003 □ PB1^{Bem1p}/PB1^{Cdc24p} □ Terasawa *et al.*, 2001, Yoshinaga *et al.*, 2003, Van Grogen-Petit *et al.*, 2004.

Il semble donc d'une part que les partenaires des domaines de type I soient des domaines de type II et *vice et versa*, et d'autre part, que cette interaction soit de type électrostatique. Les domaines de type I+II, comme celui des aPKC, sont d'ailleurs capables d'interagir soit avec un domaine de type II, comme celui de la protéine ZIP, par son motif PC, soit avec un domaine de type I, comme celui de la kinase MEK5, par sa lysine strictement conservée (Hirano *et al.*, 2004) (Figure 46). Quelle que soit l'interaction, celle-ci est de type électrostatique et engage des résidus acides du domaine de type I et des résidus basiques du domaine de type II.

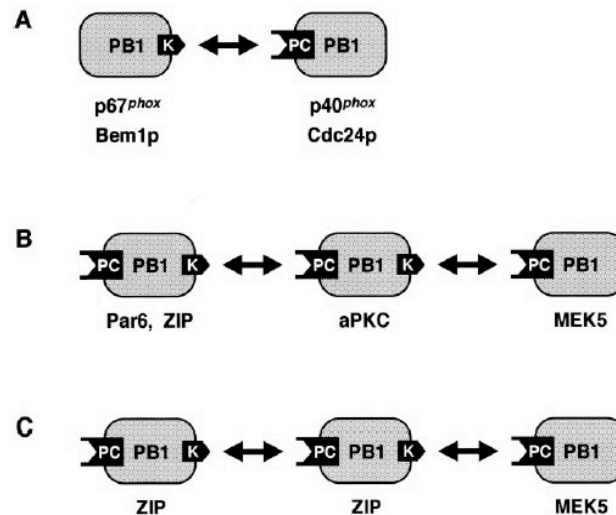


Figure 46 □ Différents modes d'interaction entre les domaines PB1. K correspond à la lysine conservée des PB1 de type II (ou I+II) et PC correspond au motif PC des PB1 de type I (ou I+II). A □ interaction entre un PB1 de type I et un PB1 de type II. B □ interaction entre des PB1 de type I+II et entre un PB1 de type I+II et un PB1 de type II. C □ auto-oligomérisation d'un domaine de type I+II (Noda *et al.*, 2003).

Plusieurs études de mutagenèses dirigées ont été conduites sur les différents domaines PB1. Les interactions avec le domaine PB1 partenaire ont ensuite été testées *in vitro*.

La mutation ponctuelle de la lysine strictement conservée en alanine des domaines PB1 de type II (ou I+II) abolit l'interaction avec le domaine partenaire. C'est notamment le cas pour les lysines 355 de p67^{phox}, 482 de Bem1p, 20 de Par-6 et 7 de p62 dont la mutation entraîne une perte d'interaction avec respectivement p40^{phox}, Cdc24p, aPKC, aPKC et MEK5 (Ito *et al.*, 2001 □ Lamark *et al.*, 2003 □ Noda *et al.*, 2003). D'autre part, la substitution des aspartates conservés du motif PC formant la séquence DXXGD, entraîne également la perte d'interaction avec le motif PB1 correspondant. C'est le cas pour les aspartates 820 et 824 de Cdc24p, 289 et 293 de p40^{phox} et 62 et 66 des aPKC dont chacune des substitutions en alanine empêche l'interaction respectivement avec Bem1p, p67^{phox} et Par6 (Terasawa *et al.*, 2001 □ Nakamura *et al.*, 1998 □ Noda *et al.*, 2003). La substitution de ces résidus strictement conservés au sein des domaines PB1 de type I et II, montrent que ces acides aminés sont essentiels pour l'interaction avec le domaine partenaire.

4-c2) Spécificité de reconnaissance

Il a été montré qu'il existe une spécificité de reconnaissance entre les domaines PB1. Par le système du double hybride, il a été observé que la région inter-SH3 de p67^{phox} (qui comporte le domaine PB1 de p67^{phox}) n'est pas capable d'interagir avec les régions de Cdc24p

et MEK5 qui possèdent le domaine PB1. Cette région de p67^{phox} ne peut interagir qu'avec la protéine p40^{phox} humaine et de souris (Nakamura *et al.*, 1998). Or, les protéines p40^{phox} humaine et de souris sont proches dans la séquence du motif PC. De la même façon, le domaine PB1 de Bem1p interagit avec le motif PC de Cdc24p mais ne reconnaît pas celui de p40^{phox} (Ito *et al.*, 2001). Bien que les domaines PB1 interagissent selon un schéma commun (interaction électrostatique entre un domaine de type I et un domaine de type II), il existe une spécificité de reconnaissance.

Les positions variables au sein du motif PC semblent pouvoir moduler la spécificité de reconnaissance entre domaines PB1. Ainsi, il a été montré que les résidus non conservés de Cdc24p (E821, F825, V826 et E832) et de Bem1p (K480, I489, A491 et R510) appartiennent à l'interface d'interaction. La substitution des résidus E821, F825 et V826 du motif PC de Cdc24p entraîne une diminution de 10 à 60% de l'interaction avec le domaine PB1^{Bem1p}. De plus, la mutation R510A de PB1^{Bem1p} entraîne la perte de l'interaction avec le motif PC (Terasawa *et al.*, 2001 □ Yoshinaga *et al.*, 2003). Ces résidus non conservés sont donc importants pour l'interaction entre les domaines PB1 et pourraient participer à une spécificité de reconnaissance. De même, la délétion des résidus 335 à 339 de la région C-terminale de p40^{phox}, extérieure au domaine PB1, déstabilise également l'interaction avec le domaine PB1 de p67^{phox} (Nakamura *et al.*, 1998). De plus, cette interaction est spécifique du système phox. Le bras C-terminal de p40^{phox} pourrait donc également participer à la spécificité de reconnaissance pour le domaine PB1 de p67^{phox}.

Certains domaines PB1, comme celui des aPKC ou de MEK5, peuvent interagir avec différents partenaires. Or, nous venons de voir qu'il existe une spécificité de reconnaissance entre domaines PB1. Il serait donc intéressant d'identifier les acides aminés importants pour la spécificité. Ceci permettrait peut-être de comprendre quelle est la nécessité physiologique d'une reconnaissance multiple qu'ont certains domaines PB1.

4-c3) Comportement des domaines PB1 en solution

Le domaine PB1 de la protéine adaptatrice p62 (ou ZIP) est capable de s'auto-oligomériser en solution par une interaction entre sa lysine strictement conservée et son motif PC (Lamark *et al.*, 2003). Ce domaine de type I+II possède 9 résidus acides dans la région du motif PC et cinq résidus basique dans son cluster basique comprenant la lysine strictement conservée. Le domaine PB1 de p67^{phox}, de type II, possède, en plus de sa lysine strictement conservée, deux résidus basiques dans cette région et 6 résidus acides dans la région

correspondant au motif PC. Lors des expériences RMN, réalisées à 25°C et à pH 5, une série de spectres 2D-HSQC (^1H , ^{15}N) a été enregistrée, avec un spectre toutes les 24 heures. Seule l'intensité des pics diminuait d'environ 20% par jour, due à une diminution de la concentration de protéines en solution. Une partie de la protéine se retrouvait sous forme de précipité visible au fond du tube. Une dénaturation de la protéine peut être responsable de ce comportement en solution. Cela peut également provenir d'une oligomérisation du domaine PB1 en solution. Nous avons d'ailleurs pu observer sur gel filtration, dans le cadre d'une purification du domaine PB1 de p67^{phox} produit en grande quantité, la formation d'un dimère en solution. Nous avons donc cherché à vérifier si le domaine PB1 de p67^{phox} pouvait se comporter, dans des conditions de concentration liées aux expériences RMN, de la même façon que le domaine PB1 de p62 en solution (Figure 47).

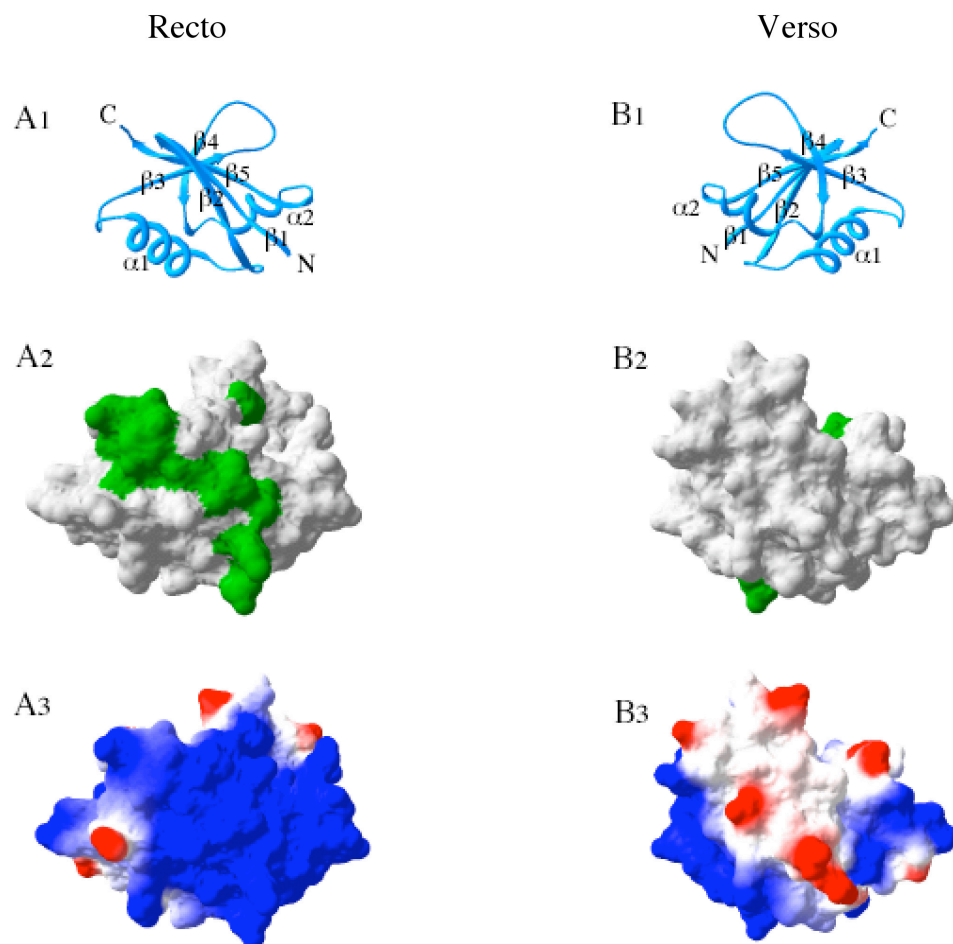


Figure 47 Structure du domaine PB1^{p67}. Une face appelée «Recto» de PB1^{p67} est numérotée en A et la face opposée «Verso» en B. A₁ et B₁ représentent le repliement tridimensionnel de squelette de PB1^{p67}. Les structures secondaires et les extrémités N- et C-terminales sont identifiées. A₂ et B₂ représentent la structure de PB1^{p67} en surface. Les acides aminés impliqués dans l'interaction avec p40-Cter sont indiqués en vert. A₃ et B₃ montrent la surface électrostatique du domaine. Les zones en rouge indiquent une surface chargée négativement et les zones en bleu, une surface chargée positivement (bornes de neutralité -1,8 à 1,8). (Figure réalisée avec Swiss-PDB viewer à partir de la structure cristallographique de Wilson *et al.*, 2003).

La zone d'interaction avec p40-Cter, visualisée en vert sur la Figure 47 en A₂, correspond à une zone de PB1^{p67} chargée positivement (Figure 47 en A₃). Ceci était attendu, étant donné la nature basique des résidus en interaction. La face de PB1^{p67} opposée à la surface d'interaction présente un certain nombre de résidus chargés négativement (en B₃). Mais ces charges sont trop ponctuelles pour affirmer qu'une auto-oligomérisation entre une face électronégative et la face opposée électropositive se réalise pour PB1^{p67}. L'hypothèse d'une dénaturation de PB1^{p67} en solution, à 25°C, devient alors la plus probable.

La même question peut se poser pour le domaine PB1 de p40^{phox}. En effet, ce domaine de type I possède 7 résidus acides dans son motif PC et deux résidus basiques en N-terminal, dont une arginine alignée avec la lysine strictement conservée des domaines de type II (Figure 45). De plus, lors des expériences RMN 2D-HSQC (¹H, ¹⁵N) réalisée à 25°C et à pH7,5, les spectres évoluent au cours du temps□des pics apparaissent, d'autres disparaissent ou encore se dédoublent. Ceci suggère une hétérogénéité de la protéine en solution. Or, des échantillons prélevés à 4 jours d'intervalle dans le tube RMN puis centrifugés ont été analysés par spectrométrie de masse electrospray. Les résultats montrent que la protéine ne subit pas de dégradation. L'évolution des spectres RMN n'est donc pas due à la présence d'espèces protéiques clivées dans la solution. Cela peut alors provenir d'une dénaturation ou de la formation de petits oligomères en solution. De grands oligomères ne seraient pas visibles sur les spectres RMN réalisées car l'intensité des pics serait inférieure au seuil de détection. Comme pour PB1^{p67}, nous avons analysé la surface du domaine PB1 de p40^{phox} afin de départager ces deux possibilités de comportement en solution (Figure 48).

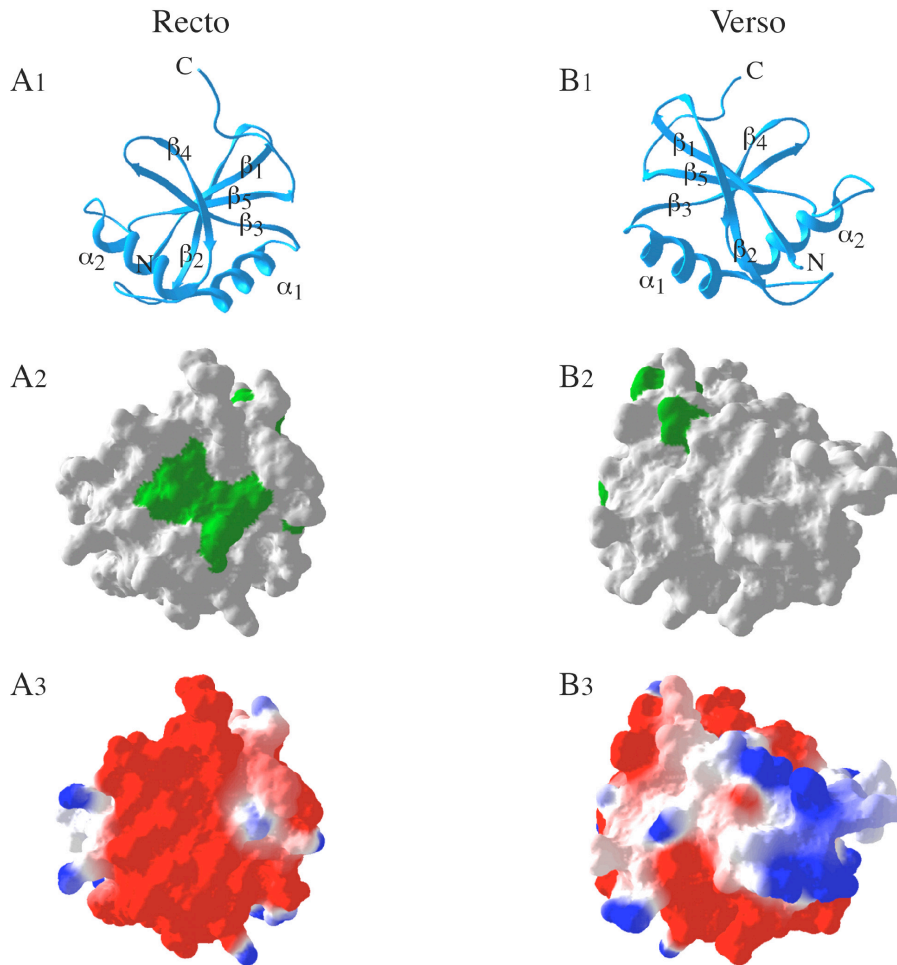


Figure 48 Structure du domaine p40-Cter. Une face appelée «**Recto**» de p40-Cter est numérotée en A et la face opposée «**Verso**» en B. A₁ et B₁ représentent le repliement tridimensionnel de squelette de p40-Cter. Les structures secondaires et les extrémités N- et C-terminales sont identifiées. A₂ et B₂ représentent la structure de p40-Cter en surface. Les acides aminés impliqués dans l'interaction avec PB1^{p67} sont indiqués en vert. A₃ et B₃ montrent la surface électrostatique du domaine. Les zones en rouge indiquent une surface chargée négativement et les zones en bleu, une surface chargée positivement (bornes de neutralité -1,8 à 1,8). (Figure réalisée avec Swiss-PDB viewer à partir de la structure cristallographique de Wilson *et al.*, 2003).

La zone d'interaction de p40-Cter avec PB1^{p67}, visualisée en vert sur la Figure 48 en A₂, correspond à une zone de p40-Cter chargée négativement (Figure 48 en A₃). Ceci était attendu, puisque les résidus affectés par l'interaction correspondent aux acides aminés acides du motif PC. La face de p40-Cter opposée à la surface d'interaction présente une petite zone chargée positivement (en B₃). Cette surface est très localisée et le module semble essentiellement chargé négativement. L'hypothèse d'une auto-oligomérisation de PB1^{p40} semble donc peu probable. Il s'agit plus sûrement d'une hétérogénéité conformationnelle de la protéine en solution.

4-d) Le domaine PB1, un module ubiquitaire

Les domaines PB1 sont trouvés chez des organismes eucaryotes variés, allant de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), la drosophile (*drosophila melanogaster*), la souris (*Mus musculus*) à l'Homme (*Homo sapiens*) en passant par les plantes (*Lotus japonicus*). D'après la banque de données SMART (a Simple Modular Architecture Research Tool identification of signaling domains), 212 protéines eucaryotes possédant un domaine PB1 ont été identifiées à ce jour. Ce nombre est amené à croître avec l'augmentation de la quantité d'ADN eucaryote séquencé. Parmi ces protéines, 37 sont codées par le génome humain. Un échantillon des protéines possédant un domaine PB1 est présenté sur la Figure 49.

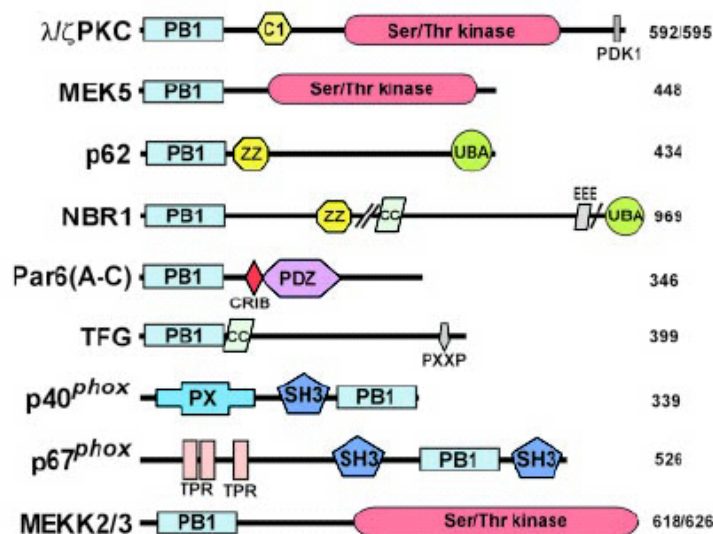


Figure 49 Architecture de protéine possédant un domaine PB1. A part le domaine PB1, les motifs et les domaines suivants sont présents au sein de ces protéines : doigts à zinc C1 ou ZZ, domaine catalytique des kinases à serine/thréonine, domaine associé à l'ubiquitine (UBA pour Ubiquitin Associated), PDZ (PSD-95, Dlg, and ZO-1/2), Phox (PX), Src homology 3 (SH3), tetratricopeptide repeat (TPR), liaison interactive Cdc42/Rac (CRIB pour Cdc42/Rac-interactive binding) et coiled-coil (CC). (Lamark *et al.*, 2003).

Ces domaines PB1 sont présents chez de nombreuses protéines de signalisation. Ils permettent des interactions protéine/protéine, autorisant la formation de complexes protéiques nécessaires à la transduction d'un signal. Outre le complexe de la NADPH Oxydase, dont l'interaction PB1^{p40}/PB1^{p67} est importante pour l'activité oxydase, de nombreux systèmes biologiques fonctionnent par des interactions de type PB1/PB1. C'est le cas notamment des protéines Cdc24p et Bem1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Ces protéines interviennent dans l'établissement de la polarité cellulaire de la levure lors de deux événements : le bourgeonnement, pendant la phase de croissance végétative, et l'accouplement, en réponse à des phéromones spécifiques (Madden and Snyder, 1998). Cdc24p et Bem1p interagissent par

leur domaine PB1 et forment un complexe avec Cdc42p. Ce complexe est le cœur de la machinerie responsable de l'établissement de la polarité cellulaire. Bem1p joue le rôle d'échafaudage du complexe et Cdc24p est le facteur d'échange (GEF) de la petite protéine G Cdc42p.

Les domaines PB1 sont également présents au sein de nombreuses protéines kinases (Figure 49). Parmi ces protéines kinases, les aPKCs (atypical Protein Kinases C). Comme nous venons de le voir, le domaine PB1 des aPKCs est capable d'interagir d'une part, avec le domaine PB1 de p62 et d'autre part, avec le domaine PB1 de Par6 (Partitioning-defective protein 6). Tout d'abord, deux aPKCs (β PKC et γ PKC) interagissent avec la protéine adaptatrice p62. Cette interaction est l'un des chaînons de la cascade d'activation du facteur de transcription NK- κ B par les cytokines TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'IL-1 (Interleukine 1) (Sanz *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000). Puis, les aPKCs peuvent également interagir avec la protéine Par6 par leur domaine PB1 respectif. Cette interaction est essentielle au sein de la machinerie moléculaire nécessaire à l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire pendant la morphogenèse et la migration cellulaires (Etienne-Manneville et Hall, 2003).

D'autres kinases possèdent un domaine PB1 grâce auquel elles exercent leur fonction. C'est le cas de certaines protéines MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) les MAPK kinase kinases MEKK2 et MEKK3 activent la MAPK kinase MEK5 par des interactions entre domaines PB1 (Nakamura *et al.*, 2003). MEK5 est un activateur spécifique de la protéine kinase ERK5 impliquée dans la prolifération cellulaire (Kato *et al.*, 1998) (Figure 50).



Figure 50 Cascade d'activation de la prolifération cellulaire. Les flèches noires correspondent à l'activation des différentes kinases.

Nous venons de voir différents systèmes biologiques impliqués dans des processus variés comme l'établissement de la polarité cellulaire, l'activation d'un facteur de transcription ou encore la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces mécanismes fait intervenir des interactions entre les domaines PB1 de leurs protéines clefs. Seuls quelques exemples de protéines possédant un domaine PB1 ont été présentés ici. Or, le nombre de ces protéines eucaryotes augmente de façon spectaculaire depuis ces trois dernières années.

VI Conclusion et perspectives

L'étude de l'interaction entre les domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} du complexe de la NADPH Oxydase a débuté par une approche cristallographique de la région C-terminale de p67^{phox}. Les tests de cristallogenèse n'ayant donné aucun cristal exploitable, nous avons poursuivi cette étude par Résonance Magnétique Nucléaire en réduisant les protéines p67^{phox} et p40^{phox} à leur module PB1, plus les résidus C-terminaux pour p40^{phox}. Nous avons obtenu le repliement de la chaîne principale de PB1^{p67}, la topologie de p40-Cter, ainsi que la surface d'interaction pour chacun des deux domaines PB1. Par des expériences de dynamique en solution, nous avons également déterminé une région de PB1^{p67} mobile. Il s'agit de la boucle formée entre les brins β_3 et β_4 , où se situe l'arginine 395 de p67^{phox}. Ce résidu forme une liaison hydrogène avec la proline 339 du bras C-terminal de p40^{phox} qui se replie sur PB1^{p67}. La mutation R395W, retrouvés chez des patients atteints de la CGD, provoque une diminution de l'efficacité d'interaction d'environ 50% (expérience réalisée par immuno-précipitation, Wilson *et al.*, 2003). Cette interaction paraît donc importante pour la stabilité du complexe formé entre PB1^{p67}/p40-Cter. Des mesures d'affinités pourraient confirmer ce résultat. Il faudrait déterminer l'affinité d'une part, entre p40-Cter et PB1^{p67} sauvages et d'autre part, entre p40-Cter sauvage et PB1^{p67} muté au niveau de l'arginine 395. La mutation R395W permettrait de préciser l'impact de cette mutation sur l'affinité entre les partenaires. Nous pourrions alors avoir une meilleure compréhension du mécanisme impliqué dans les CGD liées notamment à cette mutation. Il serait également intéressant de réaliser ces mesures d'affinité avec l'arginine 395 de PB1^{p67} substituée en résidu neutre tel que l'alanine. Ce travail serait un témoin de la mutation CGD et permettrait d'expliquer l'effet particulier d'un résidu aromatique à la place de l'arginine (R395W) chez les patients CGD.

De plus, Nakamura *et al.*, en 1998, ont montré par le système du double hybride que la délétion des cinq résidus C-terminaux de p40^{phox} déstabilise l'interaction PB1^{p67}/PB1^{p40}. Ceci laisse penser que le bras C-terminal de p40^{phox}, particulier au système phox, renforcerait l'interaction entre PB1^{p67} et PB1^{p40}. Or, au cours de l'une des purifications de la région C-terminale de p40^{phox}, la protéine a subi une protéolyse non maîtrisée dans sa région C-terminale. Cette préparation a été utilisée lors d'une étude préliminaire de RMN et nous avons observé la formation du complexe entre le domaine PB1 de p67^{phox} et p40-Cter clivé dans sa région C-terminale. Ainsi, l'absence des huit résidus C-terminaux du bras C-terminal de p40^{phox}, y compris la thréonine 337 et la proline 339 qui forment des liaisons hydrogènes avec l'arginine 395 et le tryptophane 425 de PB1^{p67}, n'empêche pas la formation du complexe.

Ce bras est-il alors vraiment important pour la stabilité du complexe en solution? Pour vérifier ceci, nous pourrions de nouveau mesurer l'affinité des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox} avec et sans le bras C-terminal de p40^{phox}. Il serait intéressant de comparer ces mesures aux affinités entre les domaines PB1 des différents systèmes. En effet, le bras de p40^{phox} permet peut-être une affinité particulièrement élevée entre PB1^{p67} et PB1^{p40}, pour que l'interaction p40^{phox}/p67^{phox} soit stable tout au long du processus d'activation de la NADPH Oxydase. La nécessité d'une telle interaction constitutive, donc forte, est suggérée par de nombreux auteurs (Wientjes *et al.*, 1993; Tsunawaki *et al.*, 1994; Tsunawaki *et al.*, 2000) pour une stabilisation mutuelle de p67^{phox} et p40^{phox} dans la cellule.

Le travail effectué par l'ensemble des équipes (dont la nôtre) au cours de ces trois dernières années, témoignent de l'émergence d'une nouvelle famille de domaines structuraux permettant des interactions protéine/protéine spécifiques. Ces domaines permettent non seulement des interactions de stoechiométrie 1:1, entre des domaines de type I et II, mais aussi des interactions multiples. En effet, des domaines de type I+II peuvent interagir avec des domaines de type I ou II mais aussi avec eux-mêmes pour former des oligomères. Les domaines PB1 sont présents chez de nombreuses espèces eucaryotes et leur nombre ne cesse d'augmenter depuis leur découverte.

**Evolution de l'interaction SH3/polyproline
au cours de l'activation**

Evolution de l'interaction SH3/polyproline au cours de l'activation

I Interactions SH3/polyproline entre les facteurs cytosoliques □ bilan des connaissances

1- Interactions motif polyproline/domaine SH3

Dans le complexe cytosolique au repos, le motif polyproline de p47^{phox} est capable d'interagir *in vitro* soit avec le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (Leto *et al.*, 1994), soit le domaine SH3 de p40^{phox} (Fuchs *et al.*, 1995). Cependant, le complexe p47^{phox}/p67^{phox} est de plus grande affinité que le complexe p47^{phox}/p40^{phox} avec des affinités respectives de l'ordre du nanomolaire et du micromolaire (Grizot *et al.*, 2001 □ Lapouge *et al.*, 2002).

Au cours de l'activation, p47^{phox} est phosphorylé, notamment au niveau des sérines qui encadrent la région du polyproline. L'ensemble de ces phosphorylations induit des réarrangements de p47^{phox} qui passe d'une conformation « fermée » (d'auto-inhibition, Figure 1B) à « ouverte » lors de l'activation. Les domaines SH3 de p47^{phox} sont alors libres d'interagir avec le motif polyproline de p22^{phox} (Ago *et al.*, 1999 □ Karathanassis *et al.*, 2002 □ Groemping *et al.*, 2003).

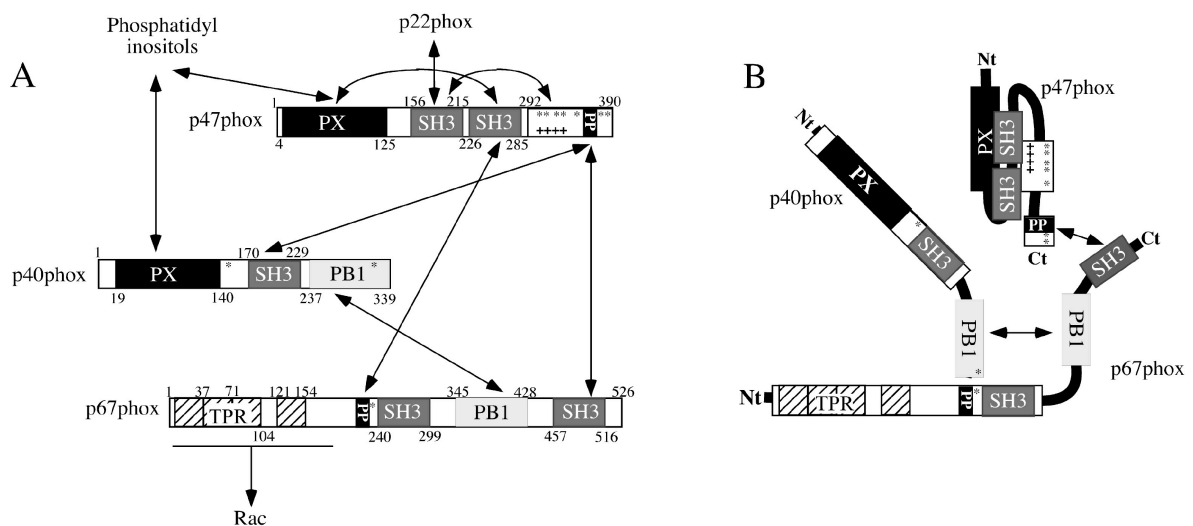


Figure 1: Interactions entre les facteurs cytosoliques. (A) □ Interactions possibles entre les facteurs cytosoliques p67^{phox}/p40^{phox}/p47^{phox} (Fuchs *et al.*, 1995 □ Fuchs *et al.*, 1996 □ Ito *et al.*, 1996 □ Sumimoto *et al.*, 1994 □ Sumimoto *et al.*, 1996 □ Leto *et al.*, 1994 □ de Mendez *et al.*, 1997 □ Diekmann *et al.*, 1994 □ Leusen *et al.*, 1995 □ McPhail *et al.*, 1994). (B) □ Interactions existantes *in vitro* au sein du complexe ternaire (1 □ □) au repos (Ito *et al.*, 2001 □ Lapouge *et al.*, 2002).

D'après les différents tests d'interaction *in vitro*, entre les modules des facteurs cytosoliques, il existe de nombreuses interactions possibles au sein du complexe ternaire (Figure 1A). Or, au repos, seules quelques interactions sont effectives *in vitro* (Figure 1B), ce qui rend envisageable une réorganisation du complexe ternaire lors de l'activation.

2- Phosphorylation de p47^{phox}

Les réarrangements observés au sein de p47^{phox} lors de l'activation de la NADPH Oxydase, sont la conséquence de nombreuses phosphorylations. Elles se réalisent sur 9 sérines de sa région C-terminale, comme indiqué sur la Figure 2.

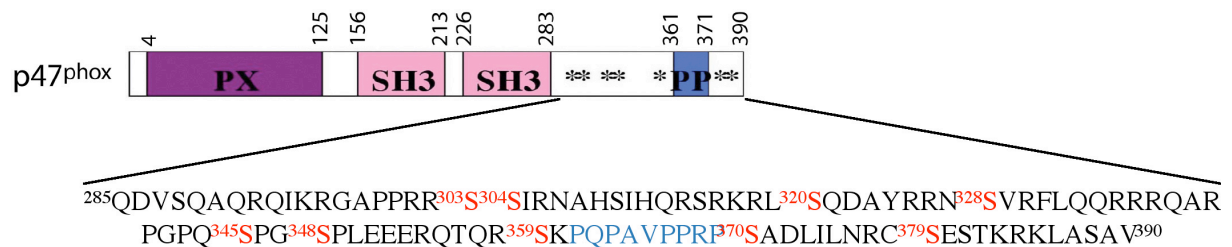


Figure 2: Séquence de la région C-terminale de p47^{phox} (résidus 285 à 390). Les sérines phosphorylables sont indiquées en rouge et le motif polyproline (PP) en bleu.

Des études de mutagenèse dirigée ont été réalisées *in vivo* par transfection de lymphocytes B déficients en p47^{phox}, ou de cellules K562, avec des vecteurs d'expression de différents mutants de p47^{phox}. Ces mutants correspondent à la mutation d'une ou deux sérines phosphorylables lors de l'activation. La substitution de ces sérines en alanines empêche la phosphorylation *in vivo* et leur substitution en aspartates ou glutamates mime la charge du groupement phosphate. L'effet de la phosphorylation sur le fonctionnement de la NADPH Oxydase diffère selon la sérine. Certaines phosphorylations seront importantes pour la phosphorylation des autres sérines, d'autres pour le transfert de p47^{phox} à la membrane et d'autres encore pour l'activation de l'oxydase. Un résumé des résultats décrits dans la littérature est présenté dans le tableau suivant (Figure 3).

Sérine	Mutant	Phosphorylation des autres sérines	Transfert à la membrane	Activité NADPH Oxydase	Références
	Sauvage	+	+	+	
Ser 303-304	S303A/S304A	+	+	-	1, 2, 3
	S303E/S304E	+	+	+	2
	S303D/S304D	+	+	-	2
Ser 328	S328A	n.d.	n.d.	-	1, 3
Ser 359/370	S359A/S370A	-	-	-	1, 4
	S359K/S370K	-	-	-	4
	S359E/S370E	+	+	-	4
	S359D/S370D	+	+	-	4
Ser 379	S379A	+	+/-	-	5

Figure 3 □ Résumé des effets de mutagenèse dirigée sur les sérines phosphorylables de p47^{phox}. Tous les résultats reportés ici sont issus d'expériences *in vivo*. (1) □ El Benna *et al.*, 1994 □ (2) □ Inanami *et al.*, 1998 □ (3) □ Ago *et al.*, 1999 □ (4) □ Johnson *et al.*, 1998 □ (5) □ Faust *et al.*, 1995.

L'expression *in vivo* de p47^{phox} portant la double mutation S303A/S304A abolit l'activité oxydase. Cependant, lorsque la cellule est stimulée, le mutant peut être transloqué à la membrane et les autres sérines phosphorylées (El Benna *et al.*, 1994 □ Inanami *et al.*, 1998 □ Ago *et al.*, 1999). Ces sérines S303 et S304 ne sont donc nécessaires ni à la translocation de p47^{phox} à la membrane, ni à la phosphorylation des autres sérines. Par contre, l'expression du double mutant S303E/S304E qui mime la phosphorylation de ces sérines, permet une production d'ions superoxydes en grande quantité.

La phosphorylation de la sérine 328, également présente dans la région polybasique (ou AIR) de p47^{phox}, paraît essentielle à l'activité oxydase. En effet, la mutation S328A inhibe l'activation de l'oxydase *in vivo* mais pas le transfert de p47^{phox} à la membrane, ni la phosphorylation des autres sérines (El Benna *et al.*, 1994 □ Ago *et al.*, 1999).

La phosphorylation des sérines S303, S304 et S328 est donc nécessaire pour l'activité de la NADPH Oxydase. Or, ces trois sérines appartiennent à la région polybasique de p47^{phox}. Ceci conforte l'hypothèse que la phosphorylation de cette région permet de rompre l'interaction intramoléculaire formée au repos entre le tandem de SH3 et la région polybasique (292-340) de p47^{phox}, permettant ainsi son interaction avec le flavocytochrome b₅₅₈ (voir introduction).

Le remplacement de la sérine 379 par une alanine diminue l'efficacité de translocation de p47^{phox} à la membrane, ce qui conduit à la perte de l'activité oxydase. Par contre, la phosphorylation de cette sérine ne semble pas indispensable à la phosphorylation des autres (Faust *et al.*, 1995). La phosphorylation de la sérine 379 semble donc essentielle à la translocation de p47^{phox} à la membrane et à l'activité oxydase.

L'expression *in vivo* des double mutants S359A/S370A et S359K/S370K de p47^{phox} entraîne une forte diminution de la phosphorylation de p47^{phox}, de l'activité oxydase et l'inhibition de la translocation de p47^{phox} à la membrane (El Benna *et al.*, 1994 □ Johnson *et al.*, 1998). Ces mutations empêchent donc la cascade d'activation de l'oxydase. Le fait de mimer la phosphorylation des sérines 359 et 370, par l'expression des mutants S359D/S370D ou S359E/S370E, rétablit la phosphorylation des autres sérines de p47^{phox} ainsi que sa translocation à la membrane (Johnson *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que les sérines 359 et 370 sont les premières phosphorylées lors de l'activation et que leur phosphorylation permet celle des autres sérines. Il existerait donc une chronologie dans la phosphorylation des sérines. De plus, ces sérines 359 et 370 encadrent directement le motif polyproline de p47^{phox} capable d'interagir soit avec le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}, soit avec le domaine SH3 de p40^{phox}. Ces éléments soulèvent quelques interrogations □ ces phosphorylations ont-elles un effet sur l'affinité du polyproline pour ses partenaires, induisent-elles un changement de préférence pour les deux SH3 □ Cette hypothèse a déjà été proposée dans la littérature comme premier événement initiant la cascade d'activation.

3- Structure des domaines SH3 de p40^{phox} et p67^{phox}

Au sein du laboratoire, la structure du domaine SH3 de p40^{phox} (résidus 174-228) seul et en complexe avec un peptide correspondant aux résidus 360-372 de p47^{phox} a été résolue par diffraction des rayons X. Ces structures sont présentées sur la Figure 4.

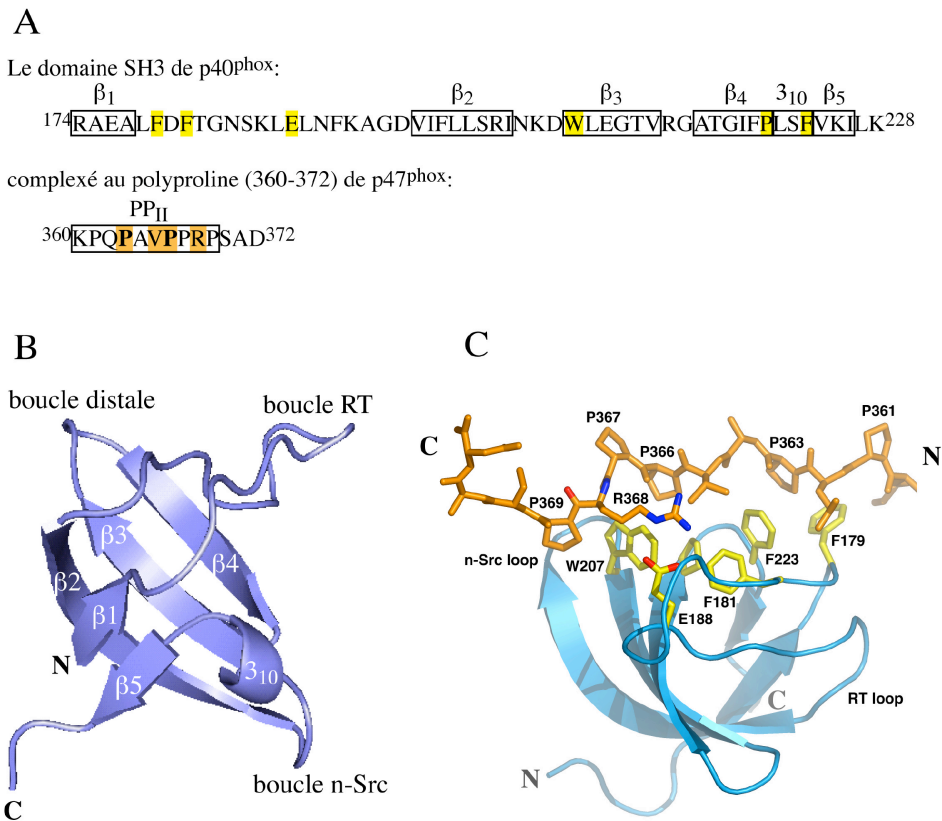


Figure 4: Séquence (A) et structure cristallographique du domaine SH3 de p40^{phox} (174-228) seul (B) et en complexe avec un peptide polyPro correspondant au motif polyproline de p47^{phox} (360-372) (C). Le domaine SH3 de p40^{phox} est représenté en bleu. (B) les structures secondaires, les boucles et les extrémités sont indiquées. (A et C) les résidus du domaine SH3 de p40^{phox} en interaction avec le polyPro sont représentés en jaune et les résidus du polyPro en interaction avec le SH3 sont représentés en orange. (Code PDB 1W6X et 1W70 figure réalisée avec PyMOL).

La structure du domaine SH3 de p40^{phox} est très similaire à celle des autres domaines SH3. Cette structure compacte forme un tonneau lui-même composé de 5 brins. Ces brins forment deux feuilletés et sont séparés par les boucles RT (178-195), n-Src (203-206) et distale (213-214) (Figure 4A et Figure 4B).

Les résidus hydrophobes F179, F181, W207, P220 et F223, représentés en jaune sur la Figure 4C, sont exposés à la surface du SH3^{p40} et forment une plate-forme hydrophobe entourée des boucles RT et n-Src. Le polyproline (peptide polyPro^{p47}) vient interagir avec cette surface hydrophobe par ses résidus P363, V365, P366 et R368, représentés en orange sur la Figure 4C. La région 360 à 369 du polyPro^{p47} forme une hélice de type PP_{II} avec 3 résidus par tour. Seuls les résidus 362 à 368 interagissent étroitement avec le SH3^{p40}.

En 2002, Kami *et al.* ont résolu par Résonance Magnétique Nucléaire la structure du domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (résidus 455-516) en complexe avec un peptide

correspondant à la région C-terminale de p47^{phox} (359-390), p47-Cter. Cette région de p47^{phox} contient le motif polyproline PxxP (362-369) plus une extension d'une vingtaine de résidus (370-390) qui sera appelée la région non-PxxP. La représentation simplifiée de la structure du complexe C-SH3^{p67}/polyPro^{p47} obtenue par RMN est présentée sur la Figure 5.

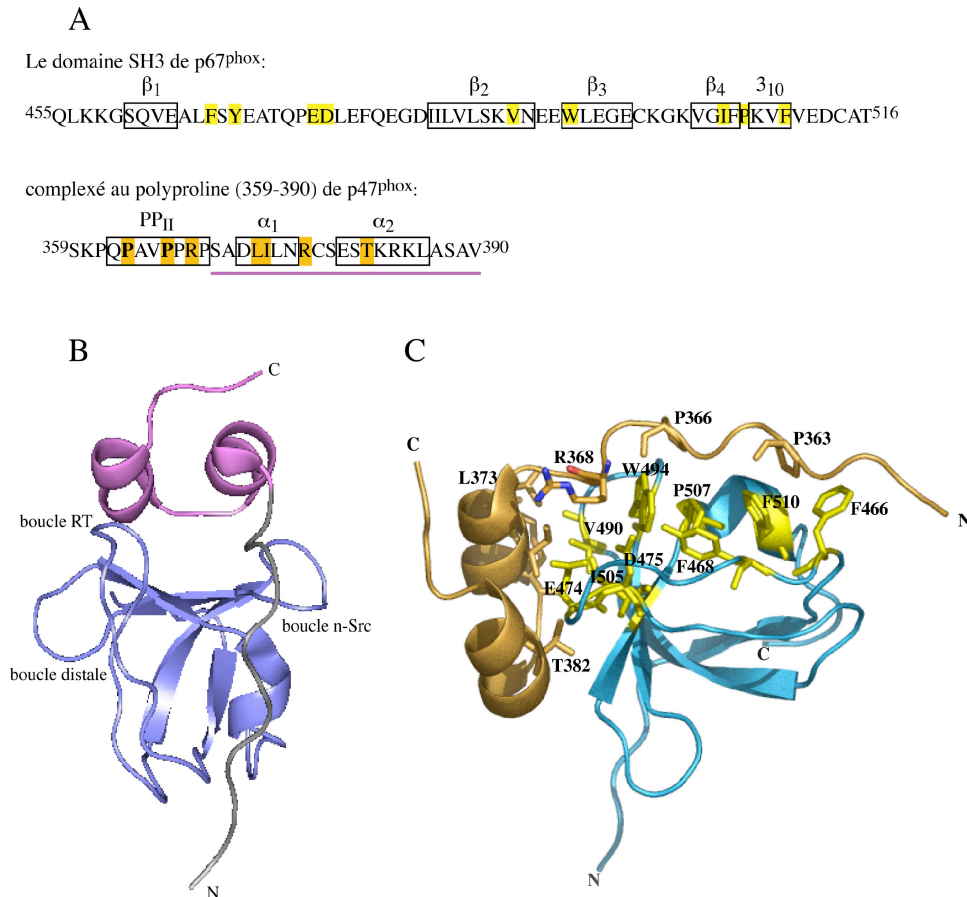


Figure 5: Séquence (A) et structure RMN du domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (455-516) en complexe avec un peptide correspondant à la région C-terminale de p47^{phox} (359-390). (B et C) Le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} est représenté en bleu. (B) les boucles RT, n-Src et distale du SH3^{p67} ainsi que les extrémités du polyproline de p47^{phox} sont indiquées. La région PxxP (359-369) du polyPro^{p47} est représentée en gris et la région non-PxxP (370-390) en violet (soulignée également en violet sur A). (A et C) les résidus du domaine SH3 de p67^{phox} en interaction avec le polyPro sont représentés en jaune et les résidus du polyPro en interaction avec le SH3 sont représentés en bâtonnets oranges. (C) pour plus de lisibilité, les résidus I374 et R377 de la région non-PxxP ne sont pas indiqués. (Kami *et al.*, 2002; Code PDB 1K4U; figure réalisée avec PyMOL).

Le domaine C-SH3^{p67} en solution maintient un repliement typique des domaines SH3 dans le complexe avec la région polyproline (359-390). Les boucles RT (464-482) et n-Src (492-493) forment une surface hydrophobe sur laquelle les résidus P363, P366 et R368 du polyPro^{p47} viennent interagir (Figure 5C). Le motif polyproline de p47^{phox} (362-369) adopte une conformation en hélice PP_{II} (Figure 5B).

La région non-PxxP (370-390) correspond à deux hélices anti-parallèles α (α 1 372-376 et α 2 380-386) qui forment une structure compacte en HTH (Helix-Turn-Helix). La région non-PxxP couvre dans le complexe une surface légèrement concave entre les boucles RT et n-Src du domaine C-SH3^{p67} (Figure 5B). Cette surface correspond à la poche de spécificité du domaine SH3 avec laquelle les résidus, L373, I374, R377 et T383 du non-PxxP viennent interagir (Figure 5C).

Le peptide polyPro^{p47} (360-370) a une affinité pour le C-SH3^{p67} de 20 μ M, ce qui est typique des interactions SH3/peptide riche en proline. La région non-PxxP (370-390) augmente l'affinité d'un facteur 1000 pour le C-SH3^{p67}. En effet, la région C-terminale de p47^{phox} (359-390) lie le C-SH3^{p67} avec une constante d'affinité de 24nM (Kami *et al.*, 2002). Cette région non-PxxP semble donc renforcer l'interaction entre le motif polyproline de p47^{phox} et le domaine C-SH3^{p67}.

L'arginine 368 du motif PxxP du polyproline de p47^{phox} est important pour l'interaction avec le domaine C-SH3^{p67} et le domaine SH3^{p40} (Figure 4 et Figure 5). La délétion de ce résidu qui appartient à la séquence consensus du motif polyproline de type II (PxxPxR), empêche l'interaction de la région 368-389 de p47^{phox} au C-SH3^{p67} (Kami *et al.*, 2002).

4- Comparaison des domaines SH3 de p40^{phox} et p67^{phox}

Le domaine SH3 de p67^{phox} présente 44% d'identité avec le domaine SH3 de p40^{phox}. La surface électrostatique de ces domaines, représentée Figure 6, montre que C-SH3^{p67} est très électro-négatif. Il possède en effet treize résidus chargés négativement pour seulement quatre positivement. Le SH3^{p40}, quant à lui, est globalement peu chargé.

Le motif polyproline de p47^{phox} se lie aux domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} avec la même orientation dans le sillon hydrophobe formé par chacun de ces deux domaines. Il est encadré par les sérines S359 et S370.

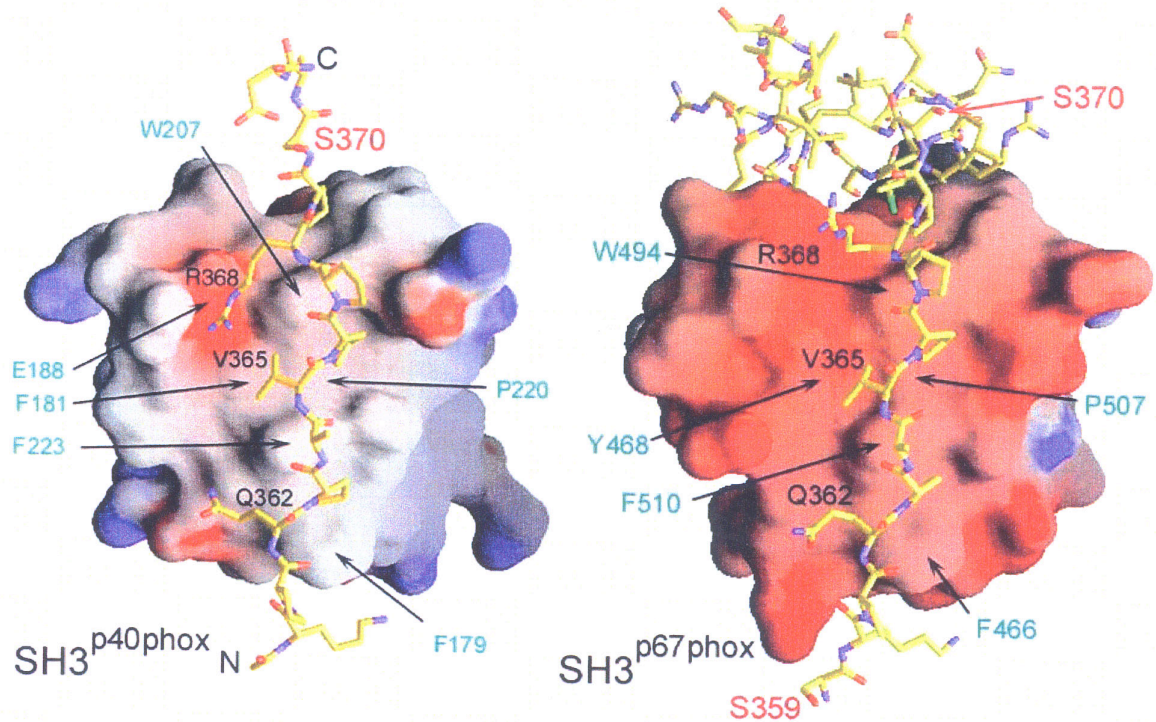


Figure 6: Surface moléculaire et potentiel électrostatique de SH3^{p40} et C-SH3^{p67} en complexe avec p47^{phox} (résidus 360-372) et p47^{phox} (résidus 359-390) respectivement. En bleu, sont représentées les surfaces chargées positivement et en rouge, les surfaces chargées négativement, avec la même échelle pour les deux molécules (réalisé avec le programme GRASP). En bleu ciel, les résidus des sites de liaison des domaines SH3 pour le polyproline. En noir, les résidus des sites de liaison du polyproline de p47^{phox} pour les domaines SH3. En rouge, les sérines S359 et S370 qui encadrent le motif polyproline.

Une telle différence de charge globale des domaines SH3 suggère que les interactions SH3/polyproline soient sensibles aux phosphorylations des sérines 359 et 370, bien que celles-ci ne soient pas en interaction directe avec les domaines SH3.

II Objectif

Le motif polyproline de p47^{phox} est capable d'interagir avec C-SH3^{p67} ou SH3^{p40}. Lors de l'activation de la NADPH Oxydase, les sérines de la région C-terminale de p47^{phox} sont phosphorylées selon une chronologie précise. Les premières sont les sérines 359 et 370 qui encadrent directement le motif polyproline de p47^{phox}. L'ensemble de ces phosphorylations conduisent à des réarrangements au sein de la protéine. En revanche, rien n'est connu des conséquences de ces phosphorylations au niveau du complexe ternaire p67^{phox}/p40^{phox}/p47^{phox}.

Toutefois, en comparant les interactions possibles *in vitro* entre les facteurs cytosoliques et celles présentes *in vivo* au repos, une réorganisation du complexe ternaire durant l'activation paraît envisageable. Ainsi, il a été suggéré que les phosphorylations de p47^{phox} pourraient moduler l'affinité de son polyproline pour ses deux domaines SH3 partenaires (Sathyamoorthy *et al.*, 1997□ Lapouge *et al.*, 2002). La différence de charge entre les domaines SH3^{p40} et C-SH3^{p67} appuie cette hypothèse. En effet, les groupements phosphates portés par les sérines 359, 370 puis 379, suite à l'activation, pourraient provoquer une répulsion du motif polyproline de p47^{phox} pour le domaine C-SH3^{p67} électronégatif. Le polyproline serait alors libre d'interagir avec le domaine SH3^{p40}. Nous avons exploré cette hypothèse par l'analyse des structures des domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} en complexe avec le polyproline C-terminal de p47^{phox} et la détermination de constantes de dissociation de ce motif polyproline pour ses domaines partenaires. Les premières étapes de la phosphorylation, sur les sérines S359, S370 et S379, ont été mimées par des aspartates ou par la greffe chimique de groupements phosphate. Ce travail a été réalisé en utilisant les propriétés de fluorescence intrinsèque du tryptophane des domaines SH3.

III La fluorescence intrinsèque du tryptophane est-elle une technique adaptée à l'étude de l'interaction motif polyproline/SH3□

Les constantes de dissociation entre les domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} et la région C-terminale de p47^{phox} (comprenant le motif polyproline), ont été déterminées grâce à la fluorescence intrinsèque du tryptophane des domaines SH3. Pour les raisons données dans l'annexe «□Spectroscopie de fluorescence□», nous avons choisi d'exciter le tryptophane par une lumière monochromatique à 290□m. En effet, les domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} comportent un seul tryptophane mais plusieurs phénylalanines et le domaine C-SH3^{p67} possède une tyrosine (Figure 7).

```

SH3p40              174RAEALFDFTGNSKLELNFKAGDVIWFLLSRINKDWLEGTVRGATGIFPLSFVKIL227
C-SH3p67          457KKSQVEALFSYEATQPELFFQEGDIILVLSKVNEEWLEGECKGKVGIFPKVFVEDC514

```

Figure 7: Alignement des séquences du domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (457-514) et du domaine SH3 de p40^{phox} (174-227). Les phénylalanines (F) sont indiquées en gris, la tyrosine (Y) en gras et les tryptophanes (W) sont encadrées.

Le rendement quantique de fluorescence de la phénylalanine ainsi que son absorbance à 260 nm sont extrêmement faibles (voir annexe «Spectroscopie de fluorescence»). La longueur d'onde de la lumière d'excitation étant fixée à 290 nm, ni les phénylalanines ni la tyrosine du C-SH3^{p67} ne sont excitées. Il n'y a alors pas de recouvrement du spectre d'émission des phénylalanines et de la tyrosine avec le spectre d'absorbance du tryptophane.

Les constantes d'affinité du polyproline de p47^{phox} pour les domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} ont donc été calculées à partir des courbes d'absorption des tryptophanes W494^{p67} et W207^{p40}.

De plus, d'après la structure des domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} en complexe avec le polyproline de p47^{phox}, le tryptophane passe d'un environnement polaire (exposé au solvant) lorsqu'il est seul, à un environnement apolaire (protégé du solvant par de nombreux contacts avec le polyproline) dans le complexe (Figure 8). La longueur d'onde d'émission varie selon l'environnement. Ainsi, lors de la complexation, le spectre de fluorescence des domaines SH3 a son maximum d'émission décalé vers les longueurs d'onde plus courtes (voir annexe «Spectroscopie de fluorescence»). Il est donc possible de suivre la complexation polyproline/SH3 par modification de spectre de fluorescence du tryptophane.

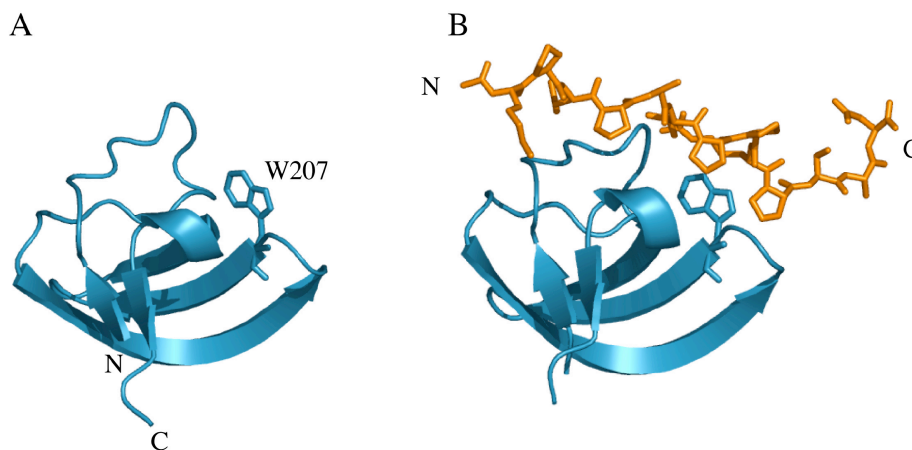


Figure 8 Structure du domaine SH3 de p40^{phox} seul (A) et en complexe avec le polyproline de p47^{phox} (360-372) (B). Le tryptophane 207 de SH3^{p40} est représenté en bâtonnets.

Enfin, les peptides utilisés, correspondant à la région C-terminale de p47^{phox}, ne possèdent aucun résidu aromatique dans leur séquence. Ils ne contribuent donc pas à l'émission de fluorescence observée (Figure 9).

polyPro^{p47} (résidus 358-372 de p47^{phox}) □ Ac-RSKPQPAVPPRPSAD-NH2

p47-Cter (résidus 358-390 de p47^{phox}) □ Ac-RSKPQPAVPPRPSADLILNRCSESTKRKCLASAV

Figure 9: Séquence des peptides de synthèse correspondant à la région C-terminale de p47^{phox}. Les sérines phosphorylables de cette région de p47^{phox} (S359, S370 et S379) sont indiquées en gras.

Il est donc relativement facile d'étudier l'affinité du polyproline de p47^{phox} pour les domaines SH3^{p40} et C-SH3^{p67}.

IV Obtention du matériel biologique et préparation des expériences de fluorescence

1- Préparation des échantillons

1-a) Clonage, production et purification du domaine C-SH3^{p67}

La séquence nucléotidique codant pour les résidus 455 à 516, c'est-à-dire le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}, a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur d'expression pET15b (Novagen) entre les sites BamHI et NdeI. Ce vecteur permet d'introduire une étiquette poly-histidine en position N-terminale de la protéine. La séquence nucléotidique a ensuite été vérifiée par séquençage.

La protéine recombinante, appelée His-C-SH3^{p67}, est exprimée dans la souche *Escherichia coli* C41(DE3). La surproduction est induite à une DO_{600nm} de 0,6 avec 0,5 mM d'IPTG. La culture bactérienne est ensuite placée à 16°C sur la nuit (Figure 10).

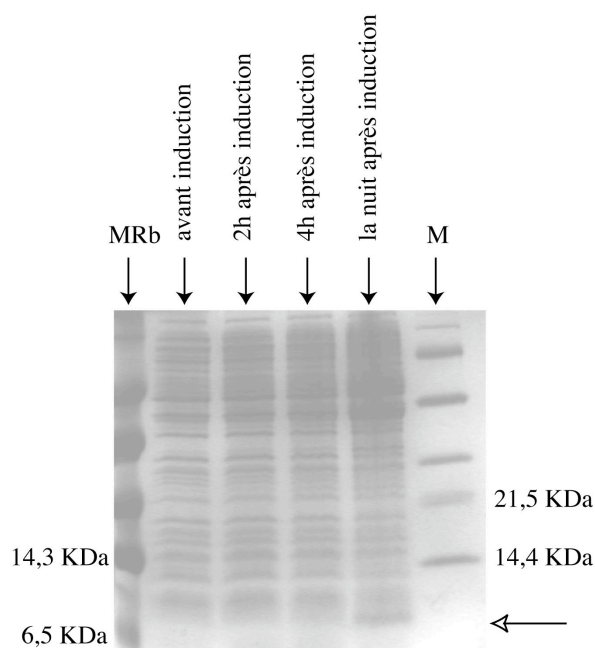


Figure 10 Gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide) de suivi de production de la protéine recombinante His-C-SH3^{p67} (PM 258,4 kDa). MRb, marqueurs de petite masse moléculaire colorés (Rainbow) (Amersham) et M, marqueurs de masse moléculaire (Boehringer). La protéine surproduite His-C-SH3^{p67} est indiquée par une flèche blanche.

Les cellules sont ensuite centrifugées. Après lyse des bactéries par «French press» et ultracentrifugation, la purification s'effectue sur FPLC à 4°C en deux étapes. La première, grâce à l'étiquette poly-histidine, est une chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA (Qiagen) équilibrée dans un tampon 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 20 mM Hepes, pH 7,5. La protéine est éluée par un gradient linéaire en imidazole (de 20 à 300 mM) (Figure 11).

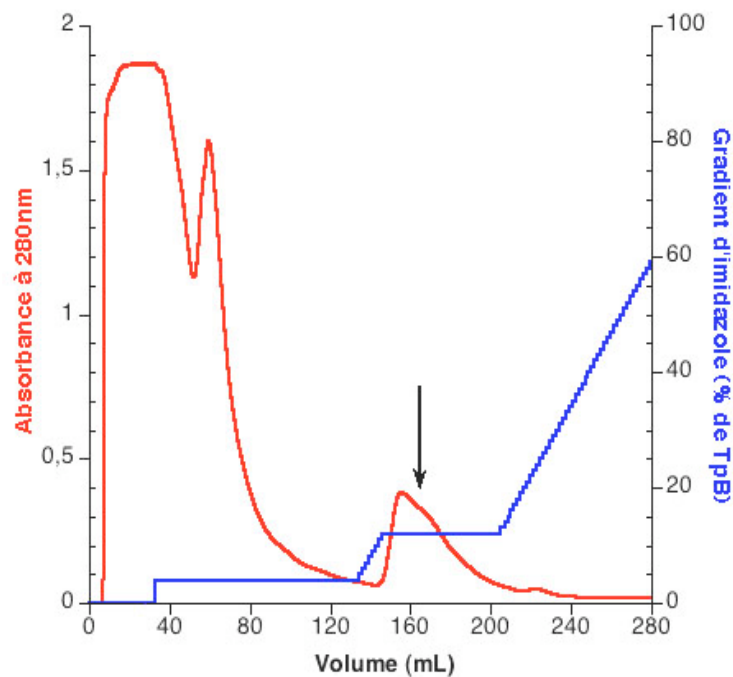


Figure 11 Chromatogramme de la purification sur colonne de nickel (Ni-NTA, Qiagen) de la protéine recombinante His-C-SH3^{p67}. La protéine est éluée par un gradient en imidazole de 20 à 300 μ M imidazole. Tampon B (Tp B) \square 150 μ M NaCl, 500 μ M imidazole, 20 μ M Hepes, pH \square ,5. Le pic d'éluion de His-C-SH3^{p67} est indiqué par la flèche.

Après concentration de la protéine, l'étiquette poly-histidine est clivée par la thrombine (Sigma). La protéine est alors appelée C-SH3^{p67}. La seconde étape de purification est une chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon 150 μ M NaCl, 2 μ M DTT, 20 μ M Hepes, pH \square ,5 (Figure 12). Cette étape permet de supprimer d'éventuels contaminants, l'étiquette poly-histidine et la thrombine. Elle permet également de changer le tampon afin d'éliminer l'imidazole provenant de l'étape précédente.

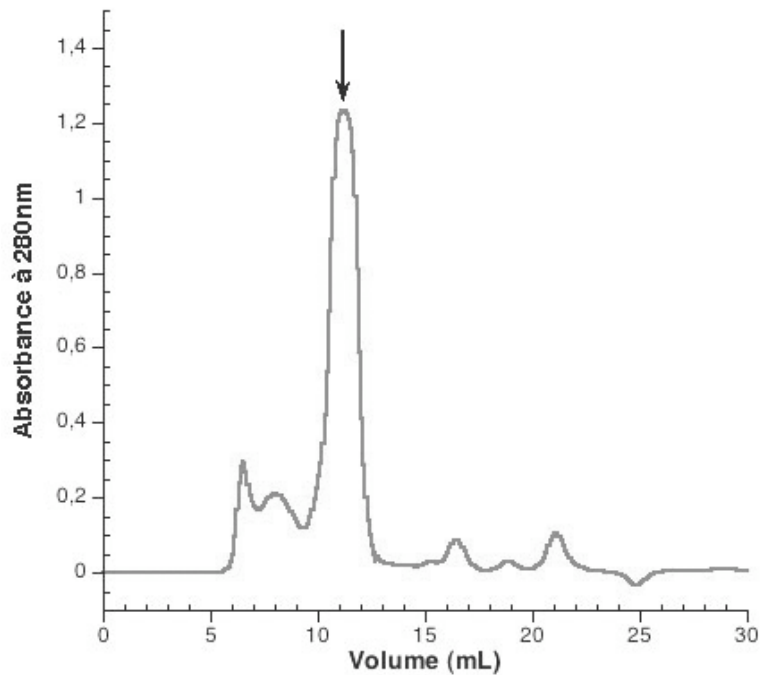


Figure 12 Chromatogramme de la filtration sur gel de la protéine C-SH3^{p67} sur colonne Superdex 75 analytique (24mL) (Pharmacia). La flèche montre le pic d'éluion de la protéine.

Environ 5 à 10 µg de protéine purifiée sont obtenus à partir de quatre litres de culture. La protéine C-SH3^{p67} est ensuite analysée sur gel SDS-PAGE (Figure 13) et son intégrité est vérifiée par séquençage N-terminal et spectrométrie de masse MALDI.

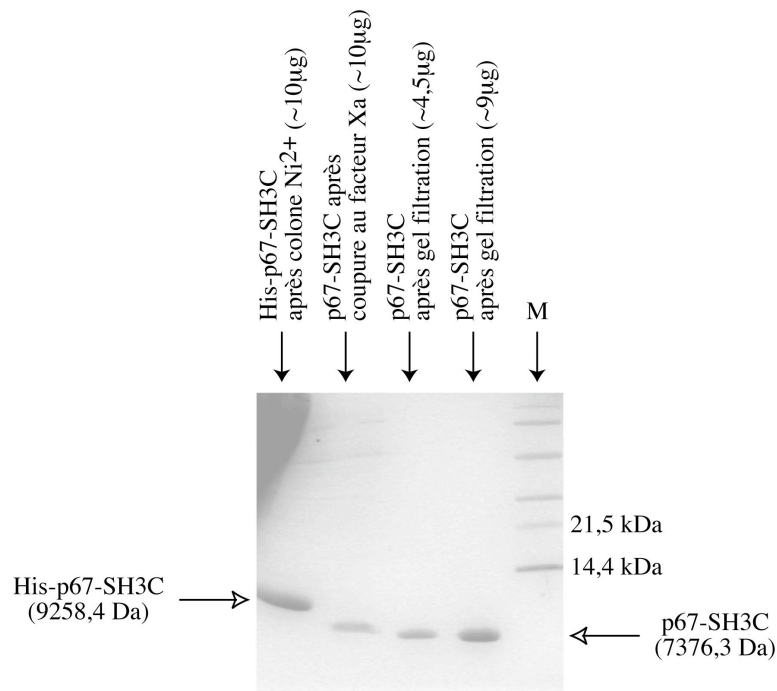


Figure 13 Suivi de la purification de C-SH3^{p67} sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide). M, marqueurs de masse moléculaire (Boehringer). Les masses moléculaires théoriques des protéines sont indiquées.

1-b) Clonage, production et purification du domaine SH3^{p40}

Le clonage de la séquence codant pour le domaine SH3 de p40^{phox} (résidus 174 à 228) a été réalisé précédemment au laboratoire. La séquence nucléotidique a été insérée dans le vecteur d'expression pIVEX 2.4 (Roche) qui permet d'introduire une étiquette poly-histidine en position N-terminale de la protéine, puis vérifiée par séquençage.

La protéine recombinante, appelée His-SH3^{p40}, est exprimée dans la souche *Escherichia coli* BL21(DE3). La surproduction est induite à une DO_{600nm} de 0,6 par 1 mM IPTG. La culture bactérienne est alors placée à 25°C pendant 3 heures. Ces conditions permettent d'éviter la formation d'agrégats. Les cellules sont ensuite centrifugées et lysées par sonication.

Après ultracentrifugation, la purification de la protéine a été réalisée sur FPLC à 4°C. La première étape est une chromatographie d'affinité sur colonne Ni²⁺ (Probond, Invitrogen) équilibrée dans un tampon 400 mM NaCl, 40 mM imidazole, 20 mM Hepes, pH 7,5. La protéine recombinante His-SH3^{p40} est éluée par un gradient linéaire en imidazole de 40 à 300 mM (Figure 14).

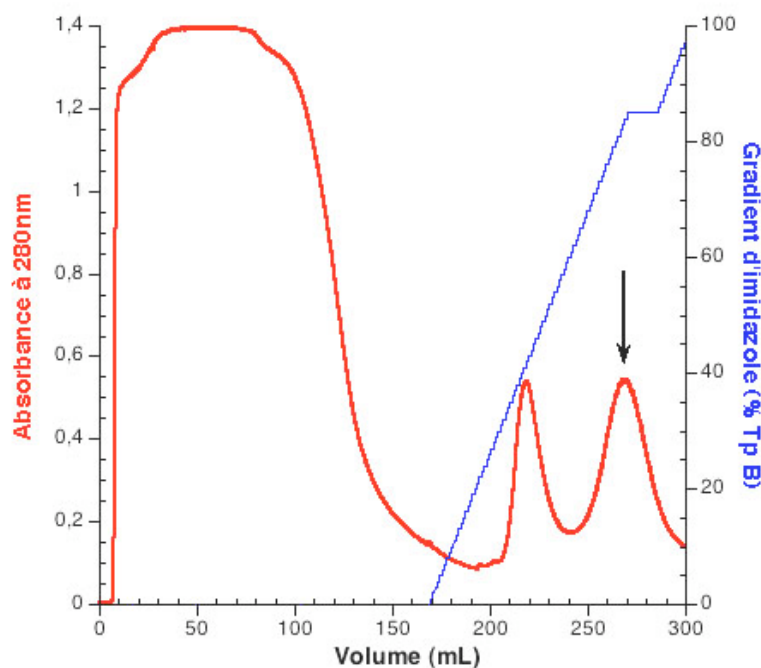


Figure 14 Chromatogramme de la purification sur colonne de nickel (Probond, Invitrogen) de la protéine recombinante His-SH3^{p40}. La protéine est éluée par un gradient en imidazole de 40 à 300 mM imidazole. Tampon B (Tp B) 150 mM NaCl, 300 mM imidazole, 20 mM Hepes, pH 7,5. Le pic d'élué de His-SH3^{p40} est montré par la flèche.

La protéine est ensuite concentrée. Son étiquette poly-histidine est clivée par coupure au facteur Xa (Novagen). La protéine est alors appelée SH3^{p40}. La seconde étape de purification est une chromatographie d'exclusion de type Superdex 75 (Pharmacia) équilibrée par un tampon 150mM NaCl, 20mM Hepes, pH7,5 (Figure 15).

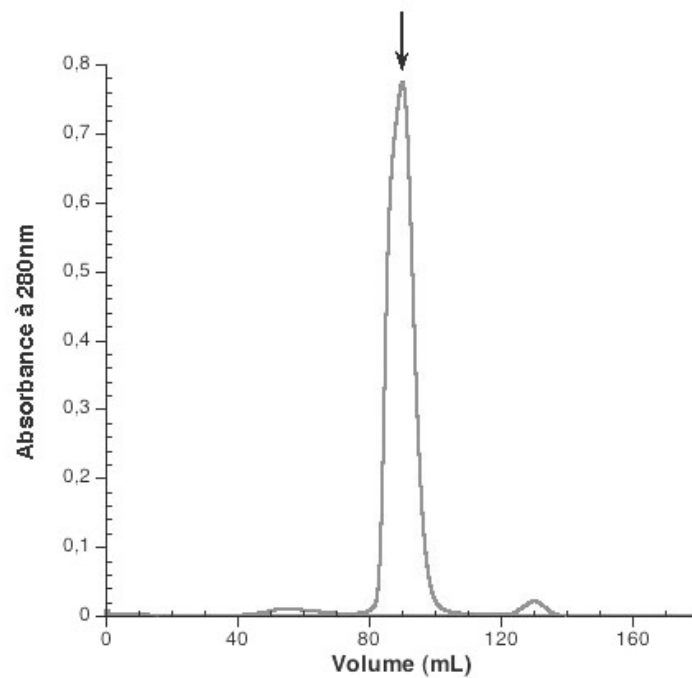


Figure 15 Chromatogramme de la filtration sur gel de la protéine SH3^{p40} sur colonne Superdex 75 Hiload 16/60 préparative (125mL) (Pharmacia). La flèche montre le pic d'élution de SH3^{p40}.

Environ 18mg de protéine purifiée sont obtenus à partir de quatre litres de culture. La protéine SH3^{p40} est ensuite concentrée et son intégrité est vérifiée par migration sur gel SDS-PAGE (Figure 16) et par spectrométrie de masse MALDI.

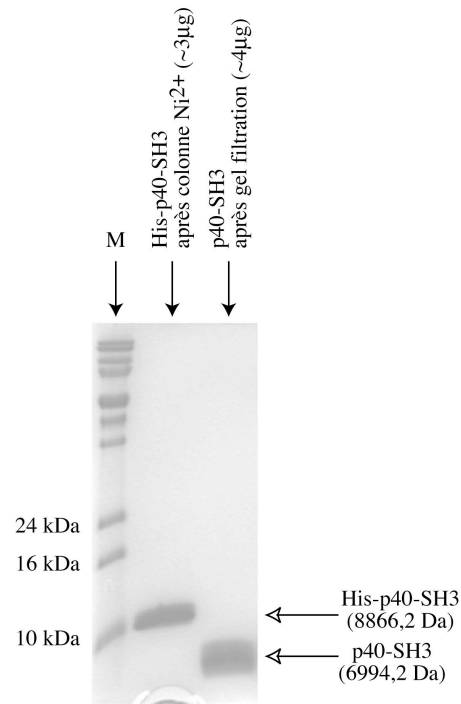


Figure 16 Suivi de la purification de SH3^{p40} sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide). M, marqueurs de masse moléculaire (Fermentas). Les masses moléculaires théoriques des protéines sont indiquées.

Les poids moléculaires apparents de His-SH3^{p40} et SH3^{p40} diffèrent d'environ 2000 Da des poids moléculaires théoriques.

1-c) Préparation des peptides dérivés du domaine C-terminal de p47^{phox}

Différents peptides dérivés de la séquence de p47^{phox} ont été synthétisés par Neosystem. Trois peptides courts, appelés polyPro^{p47}, correspondent aux résidus 358-372 et trois peptides longs, appelés p47-Cter, correspondent à la région C-terminale de p47^{phox} (résidus 358-390). La phosphorylation des sérines 359, 370 et 379 a été soit mimée en substituant la sérine par un aspartate, soit réalisée chimiquement par la greffe d'un groupement phosphate (PO₃H₂) sur la sérine. Les extrémités N- et C-terminales ont été respectivement acétylées et amidées afin de neutraliser les charges terminales non existantes au sein de la protéine. Seul le résidu C-terminal des peptides dits « longs » (358-390) n'a pas été modifié, celui-ci correspondant au dernier acide aminé de p47^{phox}. Les six peptides sont présentés dans le tableau ci-dessous (Figure 17).

Résidus de p47 ^{phox}	Représentation	Nom	Séquence synthétisée
358-372	S PP S	polyPro ^{p47} WT	Ac-RSKPQPAVPPRPSAD-NH ₂
	D PP D	polyPro ^{p47} DD	Ac-RDKPQPAVPPRPDAD-NH ₂
	P PP P	polyPro ^{p47} PP	Ac-RS(PO ₃ H ₂)KPQPAVPPRPS(PO ₃ H ₂)AD-NH ₂
358-390	S PP S S	p47 ^{phox} -Cter WT	Ac-RSKPQPAVPPRPSADLILNRCSESTKRKLASAV
	D PP D S	p47 ^{phox} -Cter DDS	Ac-RDKPQPAVPPRPDADLILNRCSESTKRKLASAV
	S PP S P	p47 ^{phox} -Cter SSP	Ac-RSKPQPAVPPRPSADLILNRC(PO ₃ H ₂)ESTKRKLASAV

Figure 17 Présentation des différents peptides de synthèse correspondant à la région C-terminale de p47^{phox}. Les sérines phosphorylables, les aspartates (D) et les groupements phosphate sont indiqués en rouge et les prolines du motif PxxP en gras dans les séquences. Sur les schémas représentatifs des peptides, le motif PxxP est indiqué par un «PP» encadré et les sérines, aspartates ou phosphates sont représentés en rouge. Pour le nom des peptides, WT désigne le type sauvage.

Les peptides ont été synthétisés avec une pureté de 75 à 90%. Ils ont alors été purifiés à nouveau par chromatographie sur colonne hydrophobe C18 (BioRad). Ils ont été injectés en présence de 95% de tampon A (0,1% de TFA dans de l'eau) et élués par un gradient de 5 à 50% de tampon B (0,09% de TFA dans de l'acétonitrile). En fin de purification, la pureté des peptides a été estimée supérieure à 95%.

Le produit de purification est lyophilisé puis repris par un volume adéquat de tampon (150mM NaCl, 2mM DTT, 20mM Hepes, pH7,5) pour obtenir une concentration estimée entre 10 et 40mM. Les solutions peptidiques sont ensuite aliquotées et stockées à -20°C.

2- Conditions expérimentales

Les mesures de fluorescence des domaines SH3 ont été réalisées avec un spectrofluorimètre Fluoromax (Jobin-Yvon) thermostaté à 20°C. La température doit être maintenue constante car l'intensité de fluorescence diminue avec l'augmentation de la température (perte d'énergie par chocs dus à l'agitation thermique). L'excitation du tryptophane est réalisée à 290nm pour les raisons données ci-dessus. La longueur d'onde d'émission est enregistrée entre 295 et 450nm avec un temps d'intégration d'une seconde et des pas d'incrémentations de 0,5nm.

La cuve en quartz à trois faces transparentes contient 100µL de solution protéique. Le peptide est suffisamment concentré pour éviter une trop grande dilution de l'échantillon lors des ajouts successifs (réalisés avec des seringues Hamilton de 1 ou 5µL). La solution est homogénéisée par pipetage.

3- Préparation des échantillons pour les expériences de fluorescence

Avant toute expérience de fluorescence, la préparation des échantillons se fait de la façon suivante.

Le tampon 150mM NaCl, 20mM Hepes, pH7,5 est supplémenté en DTT 2mM préparé extemporanément puis filtré à 0,2µm.

L'échantillon protéique est ultracentrifugé (70000rpm dans un rotor TLA 100.3 Beckman, 17min) à 4°C. Il est ensuite dilué avec le tampon filtré à une concentration variable selon le type d'interaction étudiée.

La solution peptidique est diluée à la concentration de travail voulue par ce même tampon. Cette concentration sera déterminée précisément par microanalyse en acide aminés après les expériences et ce, afin que la constante de dissociation obtenue après traitement des données soit la plus juste possible.

V Etude fonctionnelle de l'affinité du polyPro^{p47} pour les domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} au cours de l'activation de la NADPH Oxydase

1- L'effet Raman de l'eau

Lorsqu'une molécule est irradiée par une onde électromagnétique de fréquence ν_0 , une partie de la lumière est absorbée et une partie est diffusée soit avec la même fréquence, c'est la diffusion élastique ou Rayleigh, soit avec une fréquence différente c'est la diffusion Raman. En fluorescence, ces phénomènes sont parasites.

Dans notre cas, la longueur d'onde d'excitation est 290 nm et nous enregistrons les spectres de 295 à 450 nm. Nous ne voyons donc pas la diffusion Rayleigh.

Lorsque la solution aqueuse est excitée à 290 nm, le pic de diffusion Raman de l'eau est à 320 nm environ. Au début de chaque expérience, nous enregistrons un spectre d'émission du tampon (excitation à 290 nm) (Figure 18). Puis, nous soustrayons ce spectre à chacun des spectres de fluorescence des domaines SH3 afin d'éliminer la contribution de la lumière diffusée par l'effet Raman. Ainsi, la lecture des longueurs d'onde au maximum d'émission des domaines SH3 n'est pas faussée. Ceci est d'autant plus important qu'au fur et à mesure que la contribution du SH3 complexé augmente, le λ_{\max} se décale vers les longueurs d'onde plus courtes et donc se rapproche du pic de diffusion Raman. Ce problème est encore plus important pour le domaine C-SH3^{p67} qui voit son intensité de fluorescence diminuer lors de la formation du complexe.

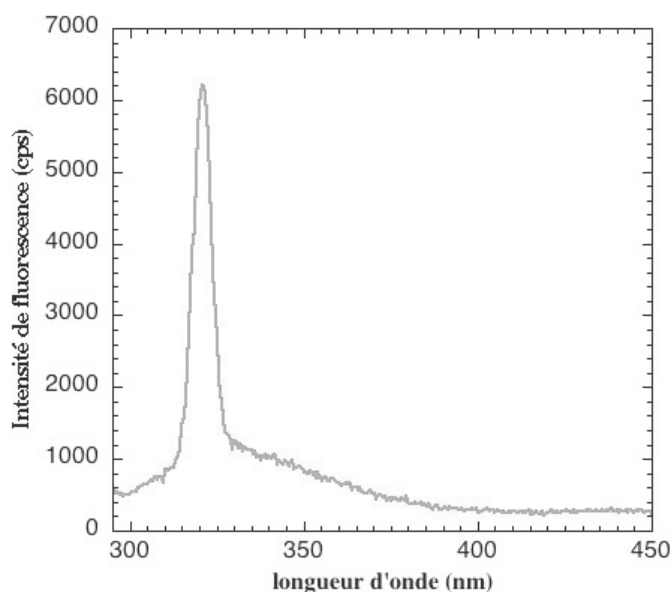


Figure 18 □ Spectre d'émission du tampon. Le pic de diffusion Raman de l'eau se situe vers 320 nm.

2- Contrôles des expériences de fluorescence

Plusieurs contrôles ont été réalisés pour valider les expériences de fluorescence présentées dans la partie suivante.

2-a) Est-ce bien la formation d'un complexe

Pour vérifier que le décalage de la longueur d'onde d'émission du domaine SH3 vers les longueurs d'onde plus courtes traduit bien un phénomène de complexation, nous avons réalisé le contrôle suivant. En fin d'expérience, lorsque 20 μ M de peptide (« α 47^{phox}-Cter DDS») ont été ajoutés à 5 μ M de C-SH3^{p67}, nous avons ajouté dans la cuve expérimentale 10 μ L de SDS 1%, un détergent amphiphile qui perturbe les interactions protéine/protéine. Comme observé sur la Figure 19, l'ajout de SDS entraîne un retour de la longueur d'onde au maximum d'émission à une valeur proche de celle de C-SH3^{p67} seul (342 nm). Ceci suggère une dissociation entre le domaine C-SH3^{p67} et le peptide.

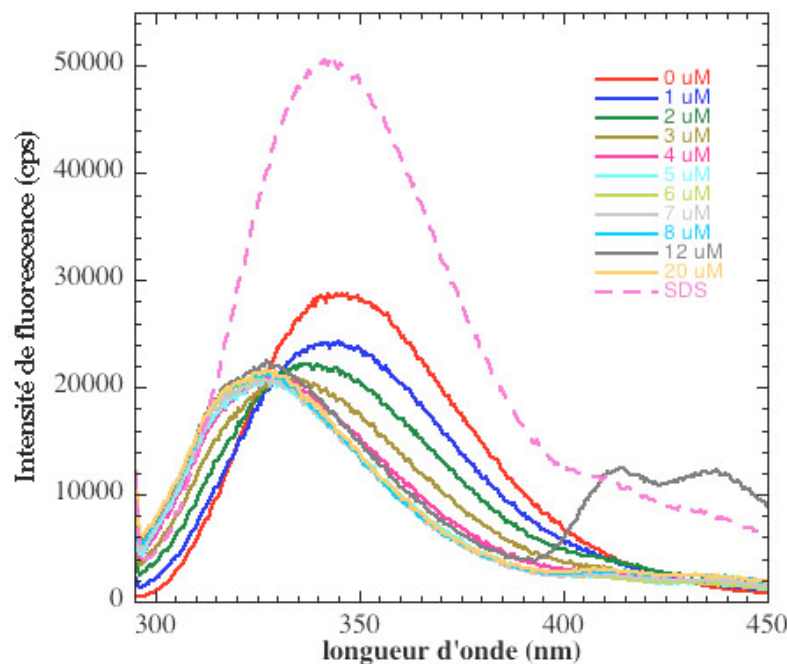


Figure 19 Effet du SDS sur le mélange C-SH3^{p67} (5 μ M)+peptide « α 47^{phox}-Cter DDS» (20 μ M). Le spectre en pointillés roses correspond au spectre d'émission de C-SH3^{p67} saturé par 20 μ M de peptide « α 47^{phox}-Cter DDS» et en présence de 10 μ L de SDS 1%. Les épaulements observés entre 400 et 450 nm correspondent à la présence d'impuretés dans la cuve expérimentale.

Cependant nous avons voulu vérifier que le léger décalage de la longueur d'onde observé après ajout de SDS (342 nm au lieu de 345 nm) était bien dû à la présence de SDS. Nous avons donc testé l'effet d'un ajout de 10 μ L de SDS 1% à une solution de C-SH3^{p67} à

5 μ M (Figure 20). On observe effectivement un décalage du maximum d'émission de C-SH3^{p67} à 342 nm. Ceci est probablement dû à une modification de l'environnement du tryptophane, soit par la présence même du SDS, soit par dénaturation partielle de la protéine. Notre approche expérimentale est donc validée.

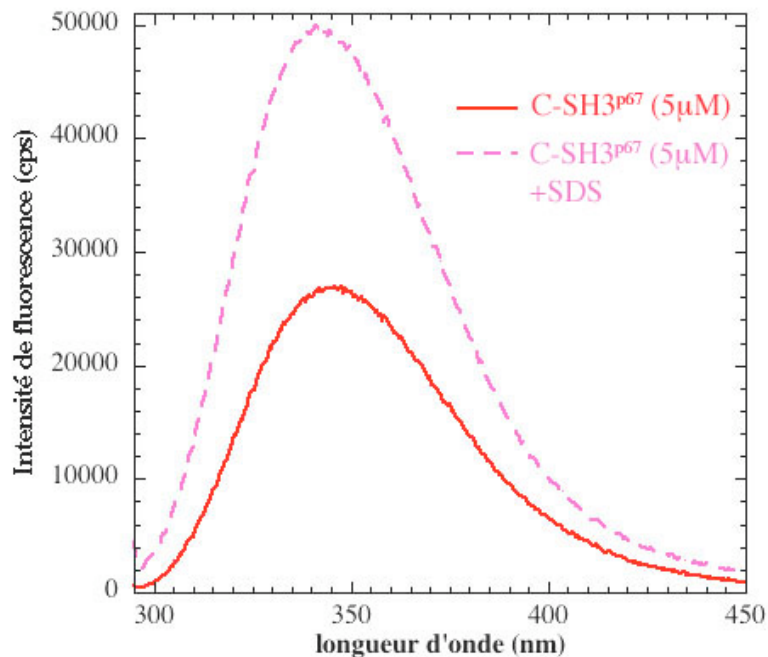


Figure 20 Effet du SDS sur la fluorescence de C-SH3^{p67} à 5 μ M. Le spectre rouge correspond au spectre d'émission de C-SH3^{p67} à 5 μ M. Le spectre en pointillés roses correspond au spectre d'émission de C-SH3^{p67} à 5 μ M en présence 10 μ L de SDS 1%.

2-b) Cinétique d'interaction

Il est important de s'assurer que la protéine ne se dégrade pas en solution à 20°C et donc que l'intensité de fluorescence reste constante lors des expériences. La stabilité du domaine SH3 en solution a donc été vérifiée. Pour cela, l'intensité de fluorescence à 345 nm, longueur d'onde au maximum d'émission des domaines SH3, a été mesurée pendant 10 minutes sur le domaine C-SH3^{p67} (Figure 21). Cette intensité est stable. Il n'y a donc pas de dégradation du domaine SH3 en 10 minutes. La même mesure a été réalisée après ajout de 0,2 μ L de peptide « Δ 47^{phox}-Cter DDS» (1 μ M final). L'intensité de fluorescence diminue de façon quasi instantanée après ajout du peptide. Cette diminution signifie que le complexe a été formé et ce, tout de suite après la mise en présence des deux partenaires.

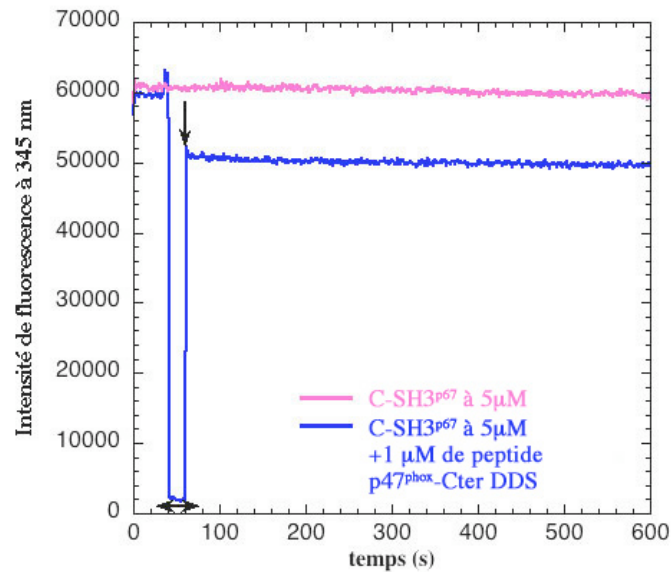


Figure 21 Variation de l'intensité de fluorescence de C-SH3^{p67}, seule ou complexée, au cours du temps. L'intensité de fluorescence est suivie à 345 nm. La flèche indique l'ajout de peptide (ici le peptide «p47^{phox}-Cter DDS») et la double flèche, le temps pendant lequel la cuve a été retirée du spectrofluorimètre pour ajouter le peptide.

2-c) Stabilité du complexe en solution

La stabilité du complexe SH3/polyproline en solution a également été testée. Pour cela, un spectre d'émission du mélange C-SH3^{p67} à 5 μM et peptide «polyPro^{p47} PP» à 140 μM a été réalisé en fin d'expérience et 100 minutes plus tard (Figure 22). Les longueurs d'onde au maximum de fluorescence sont identiques (330 nm). Le complexe SH3/polyproline est donc stable en solution, au moins sur la durée classique d'une expérience.

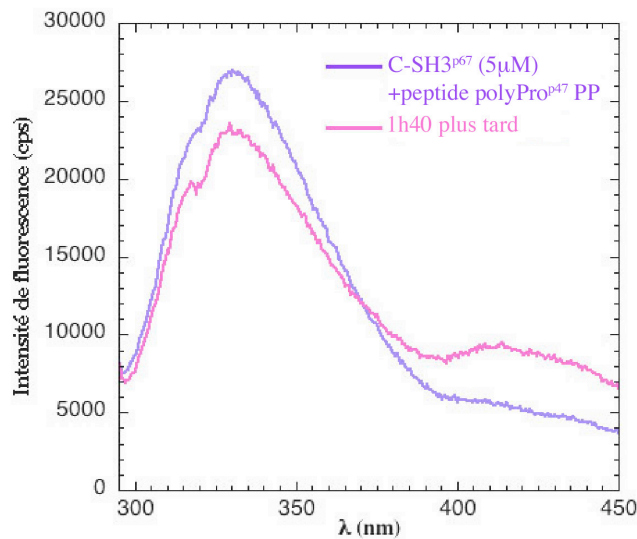


Figure 22 stabilité du complexe en solution. Le spectre mauve correspond au spectre d'émission du C-SH3^{p67} (5 μM) saturé de peptide «polyPro^{p47} PP» (140 μM). Le spectre rose a été réalisé dans la même cuve 100 minutes plus tard, la cuve étant restée à 20°C entre temps. Les épaulements entre 400 et 450 nm doivent correspondre à la diffusion d'impureté dans la cuve.

Les contrôles présentés ici ont été réalisés avec le domaine C-SH3^{p67}. Les mêmes contrôles ont également été effectués avec le domaine SH3^{p40}. Des résultats similaires ont été obtenus.

3- Résultats

La Figure 23 (graphes A et B) présente les spectres de fluorescence obtenus pour le domaine C-SH3^{p67} (A) et SH3^{p40} (B) lors d'ajout du peptide p47^{phox}-Cter SSP. Avant tout ajout de peptide, l'intensité de fluorescence de SH3^{p40} est environ 5 fois plus importante que celle de C-SH3^{p67}. Cet écart d'intensité de fluorescence est probablement dû à des différences d'environnement du tryptophane des deux SH3. Dans le cas de C-SH3^{p67}, l'intensité de fluorescence diminue au fur et à mesure que la proportion de complexe augmente dans la cuve. L'évolution de l'intensité de fluorescence de SH3^{p40}, lors de la complexation, est plus particulière. Pour des raisons que nous n'expliquons pas, l'intensité de fluorescence de SH3^{p40} commence par une légère diminution lors des premiers ajouts de peptide, puis très vite augmente. Dans les deux cas, l'intensité de fluorescence tend vers un maximum à saturation.

La longueur d'onde au maximum d'émission pour chacun des domaines SH3 isolés se situe vers 345nm et se déplace vers 328nm lorsque ces domaines sont complexés avec le polyproline de p47^{phox}. Comme il est expliqué ci-dessous, la constante de dissociation (K_d) est estimée à partir des valeurs expérimentales et notamment à partir de la différence $\Delta\lambda = \lambda_{\max} - \lambda_0$. λ_{\max} est la longueur d'onde d'émission maximale du domaine SH3 qui est lue avant et après chaque ajout de peptide. λ_0 est la longueur d'onde initiale au maximum d'émission du domaine SH3 isolé, c'est-à-dire avant tout ajout de peptide. La Figure 23 (graphes C et D) montre l'évolution de cette différence $\Delta\lambda$ en fonction de la concentration de peptide dans la cuve expérimentale. La courbe représentant le $\Delta\lambda$ en fonction de la concentration de peptide est tracée selon l'équation suivante (démonstration présentée dans l'annexe «Spectroscopie de fluorescence») :

$$\Delta\lambda = \lambda_{\max} \frac{[\text{SH3}_t] + [\text{pep}_t] + K_d \pm \sqrt{([\text{SH3}_t] + [\text{pep}_t] + K_d)^2 - 4[\text{SH3}_t][\text{pep}_t]}}{2[\text{SH3}_t]}$$

où $[\text{SH3}_t]$ et $[\text{pep}_t]$ sont les concentrations totales respectivement du domaine SH3 et du peptide dans la cuve.

Pour tracer cette courbe, le programme d'ajustement de données par moindre carrés (Kaleidagraph, Abelbeck Software) recherche les valeurs optimales de la constante de dissociation K_d et de l'effet maximal $\Delta\lambda_{\max}$ afin d'ajuster au mieux les variations $\Delta\lambda$, déterminées expérimentalement, en fonction de la concentration de peptide total ajouté.

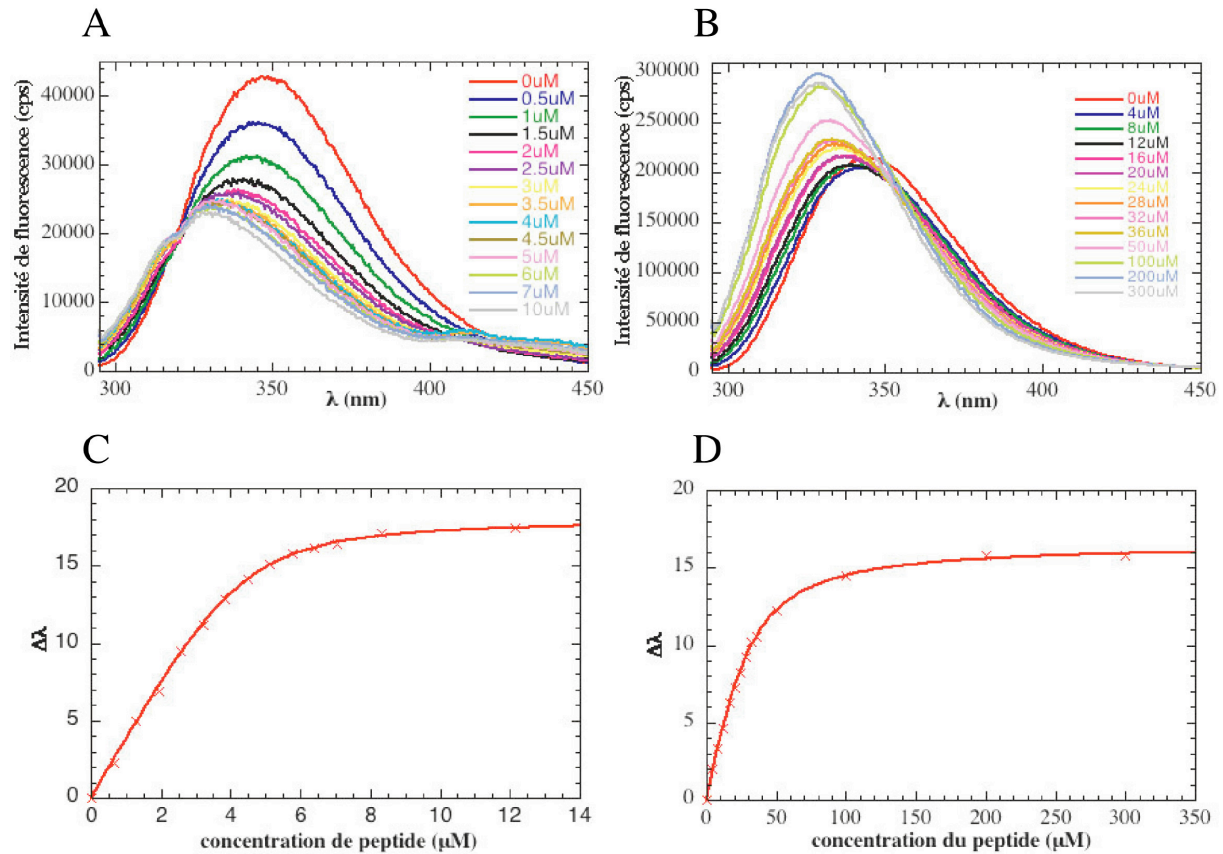


Figure 23 Détermination de la constante de dissociation des domaines C-SH3^{p67} (A et C) et SH3^{p40} (B et D) lors d'ajouts de peptide «p47^{phox}-Cter SSP». A et B montrent l'évolution de l'intensité de fluorescence (en coups) lors des ajouts de peptide. C et D représentent l'évolution de la variation de la longueur d'onde au maximum d'émission $\Delta\lambda$ en fonction de la concentration de peptide dans la cuve expérimentale.

Les constantes de dissociation obtenues pour les deux domaines SH3 pour chacun des 6 peptides sont présentées dans le tableau ci-dessous (Figure 24).

Résidus de p47 ^{phox}	Peptide	Constante de dissociation K_d (μM)	
		SH3 ^{p40}	C-SH3 ^{p67}
358-372	S PP S	200 \pm 20	10 \pm 0,7
	D PP D	270 \pm 27	31 \pm 1,9
	P PP P	268 \pm 13	61 \pm 4,3
358-390	S PP S S	0,52 \pm 0,011	0,047 \pm 0,030
	D PP D S	1,17 \pm 0,28	0,060 \pm 0,030
	S PP S P	14,4 \pm 0,60	0,290 \pm 0,037

Figure 24 Constantes de dissociation entre les 6 peptides dérivés de p47^{phox} et les domaines SH3^{p40} et C-SH3^{p67}. Les constantes de dissociations (K_d) sont exprimées en μM .

Pour remarque, il est difficile de déterminer une constante de dissociation lorsque l'affinité entre les deux partenaires est forte. C'est le cas pour le domaine C-SH3^{p67} et les peptides correspondant aux résidus 358 à 390 de p47^{phox}. Etant donné qu'une constante de dissociation est le reflet de la contribution d'une espèce (SH3 seul) par rapport à l'autre (SH3 complexé), il faut qu'à chaque point de mesure (c'est-à-dire à chaque spectre), les deux espèces soient présentes dans la solution. Pour cela, il faut travailler à des concentrations de protéines de l'ordre de la valeur du K_d . Donc, dans le cas d'une affinité forte, la concentration de SH3 doit donc être faible. Or, plus la concentration diminue, plus l'intensité de fluorescence se rapproche du bruit de fond. Dans le cas du C-SH3^{p67}, une difficulté vient s'ajouter : l'intensité de fluorescence de ce domaine SH3 diminue à chaque ajout de peptide. On se retrouve alors vite dans la limite de détection du fluorimètre.

3-a) Interactions entre p47^{phox} et les deux autres facteurs cytosoliques

Comme le montre le tableau ci-dessous (Figure 25), l'affinité du polyproline de p47^{phox} est renforcée d'environ 200 fois pour C-SH3^{p67} lorsque sa région C-terminale est présente. La structure RMN du domaine C-SH3^{p67} en complexe avec la région C-terminale de p47^{phox} (359-390) (Kami *et al.*, 2002) montre l'importance de la région non-PxxP de p47^{phox}-Cter dans l'interaction avec le domaine C-SH3^{p67}. Par une étude de l'interaction p47^{phox}/p67^{phox} en solution, Kami *et al.* montrent également que l'affinité du polyproline augmente remarquablement en présence de la région C-terminale de p47^{phox}. Notre travail confirme donc ces résultats.

Nous montrons également que l'affinité du polyproline de p47^{phox} est augmentée d'environ 400 fois pour SH3^{p40} par la présence de la région C-terminale de p47^{phox}. Ceci n'était pas évident car la préférence du polyproline de p47^{phox} pour le domaine C-SH3^{p67}

(Grizot *et al.*, 2001 □ Lapouge *et al.*, 2002) était implicitement liée à la région C-terminale de p47^{phox}. Notre résultat affaiblit donc fortement cette hypothèse.

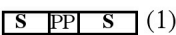
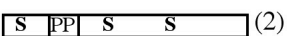

Résidus de p47 ^{phox}	Peptide	Constante de dissociation K _d (μM)		$\frac{K_d \text{ SH3}^{p40}}{K_d \text{ C-SH3}^{p67}}$
		SH3 ^{p40}	C-SH3 ^{p67}	
358-372	 (1)	200 ± 20	10 ± 0,7	20
358-390	 (2)	0,52 ± 0,011	0,047 ± 0,030	~11
	$\frac{K_d \text{ peptide (1)}}{K_d \text{ peptide (2)}}$	~385	~213	

Figure 25 □ Constante de dissociation entre SH3^{p40}/polyproline^{p47} et C-SH3^{p67}/polyproline^{p47}. Le rapport des K_d obtenus avec le polyPro^{p47} (358-372) et le p47^{phox}-Cter (358-390) est indiqué pour les deux domaines SH3 dans la ligne du bas. Le rapport des K_d obtenus avec SH3^{p40} et C-SH3^{p67} est indiqué pour chaque peptide dans la colonne de droite.

La Figure 24 montre clairement que le polyproline de p47^{phox} interagit plus fortement avec C-SH3^{p67} que SH3^{p40}. De plus, le rapport des K_d obtenus pour les deux SH3 avec le peptide polyPro^{p47} sauvage (358-372) est de 20 (Figure 25). Or, le rapport des K_d obtenus pour les deux SH3 avec p47^{phox}-Cter sauvage (358-390) est de 11, ce qui traduit une variation d'affinité moins marquée (Figure 25). D'une part, ceci confirme que l'addition de la région C-terminale de p47^{phox} (370-390) n'est pas responsable de la préférence du polyproline de p47^{phox} pour C-SH3^{p67}. D'autre part, cela signifie que cette préférence se réalise par la région PxxP de p47^{phox} et que la région C-terminale de p47^{phox} a pour unique rôle de renforcer cette interaction.

3-b) Effets de la phosphorylation de p47^{phox} sur son interaction avec les deux autres facteurs cytosoliques

Dans les études fonctionnelles antérieures (Figure 3), la phosphorylation des sérines est mimée par leur substitution en aspartates. Par comparaison avec ces études, nous avons fait synthétiser des peptides « PolyPro^{p47} □ (résidus 358-372) en remplaçant les sérines phosphorylables 359 et 370 par des aspartates. De plus, nous avons également testé l'effet d'un groupement phosphate sur ces sérines.

Résidus de p47 ^{phox}	Peptide	Constante de dissociation K_d (μM)		Rapport des K_d pour C-SH3 ^{p67}
		SH3 ^{p40}	C-SH3 ^{p67}	
358-372	S PP S	200 ± 20	10 ± 0,7 (1)	$\frac{(2)}{(1)} \approx 3$
	D PP D	270 ± 27	31 ± 1,9 (2)	$\frac{(3)}{(1)} \approx 6$
	P PP P	268 ± 13	61 ± 4,3 (3)	$\frac{(3)}{(1)} \approx 6$

Figure 26 Constantes de dissociation des complexes SH3^{p40}/polyPro^{p47} et C-SH3^{p67}/polyPro^{p47}. Le rapport du K_d obtenu avec le polyPro^{p47} muté ou phosphorylé sur le K_d obtenu avec le polyPro^{p47} sauvage est indiqué pour C-SH3^{p67}.

Les constantes de dissociation estimées pour les interactions polyPro^{p47} DD/SH3^{p40} et polyPro^{p47} PP/SH3^{p40} sont quasi identiques (Figure 26). Les aspartates semblent donc être de bons mimes des phosphorylations. De plus, les affinités des peptides polyPro^{p47} DD ou polyPro^{p47} PP pour SH3^{p40} sont très proches de l'affinité du polyPro^{p47} sauvage pour SH3^{p40}. La phosphorylation des sérines 359 et 370 ne semble donc pas avoir d'effet sur l'interaction de la région PxxP de p47^{phox} avec SH3^{p40}.

L'affinité du polyPro^{p47} (résidus 358-372) pour C-SH3^{p67} est, par contre, légèrement affectée par la présence des aspartates à la place des sérines 359 et 370 (diminution d'un facteur 3) (Figure 26). Bien que ces sérines n'interagissent pas directement avec le domaine SH3, elles encadrent le motif polyproline de p47^{phox}. La surface du domaine C-SH3^{p67} étant très électronégative, cette modification peut donc être suffisante pour entraîner une diminution d'affinité. Cette affinité est encore un peu plus affectée par la présence de groupements phosphate sur les sérines 359 et 370 (diminution d'un facteur 6 par rapport polyPro^{p47} sauvage). Etant donné le caractère électronégatif du groupement phosphate, cela peut expliquer que l'effet soit un peu plus marqué avec le peptide polyPro^{p47} PP. Malgré ces légères diminutions d'affinité, l'interaction polyPro^{p47}/C-SH3^{p67} reste toujours plus forte que l'interaction polyPro^{p47}/SH3^{p40} (Figure 26).

La synthèse des peptides longs (358-390) comportant deux groupements phosphate n'a pas été réalisable. La phosphorylation des sérines 359 et 370 au sein de ce peptide est donc mimée par des aspartates. Seule la phosphorylation de la sérine 379 a pu être réalisée par synthèse.

Résidus de p47 ^{phox}	Peptide	Constante de dissociation K_d (μ M)	
		SH3 ^{p40}	C-SH3 ^{p67}
358-390	$\boxed{\text{S}} \boxed{\text{PP}} \boxed{\text{S}} \boxed{\text{S}}$ (1)	$0,52 \pm 0,011$	$0,047 \pm 0,030$
	$\boxed{\text{D}} \boxed{\text{PP}} \boxed{\text{D}} \boxed{\text{S}}$ (2)	$1,17 \pm 0,28$	$0,060 \pm 0,030$
	$\boxed{\text{S}} \boxed{\text{PP}} \boxed{\text{S}} \boxed{\text{P}}$ (3)	$14,4 \pm 0,60$	$0,290 \pm 0,037$
	$\frac{K_d \text{ peptide (3)}}{K_d \text{ peptide (1)}}$	~ 28	~ 6

Figure 27 Constantes de dissociation des complexes SH3^{p40}/polyproline^{p47} et C-SH3^{p67}/polyproline^{p47}. Le rapport du K_d obtenu avec la région C-terminale de p47^{phox} phosphorylé sur la sérine 379 sur le K_d obtenu avec la région C-terminale de p47^{phox} sauvage est indiqué pour les deux domaines SH3.

La double mutation des sérines 359 et 370 au sein du peptide long n'affecte pas significativement l'affinité de la région C-terminale de p47^{phox} pour les deux domaines SH3 (Figure 27). La diminution d'affinité du polyPro^{p47} PP (359-372) observée pour le domaine C-SH3^{p67} semble donc artificiel. Ceci est probablement dû au fait que la région d'interaction dans le cas du polyPro^{p47} est courte, d'où l'effet des phosphorylations des sérines 359 et 370 amplifié. De plus, la présence de la région C-terminale de p47^{phox} (370-390) augmente nettement l'affinité du polyproline pour les SH3. La phosphorylation des sérines 359 et 370 n'a donc d'effet ni sur l'affinité, ni sur la préférence de la région C-terminale de p47^{phox} pour les domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40}.

La phosphorylation de la sérine 379 diminue l'affinité de la région C-terminale de p47^{phox} pour les deux domaines SH3 (Figure 27). Suite à cette phosphorylation, l'affinité pour le domaine SH3^{p40} est diminuée d'un facteur 28 contre un facteur 6 pour le domaine C-SH3^{p67}. Cela montre une modification importante de l'interaction entre p47^{phox}-Cter et SH3^{p40} et modérée pour C-SH3^{p67}.

VI Discussion

1- Importance de la région C-terminale

L'affinité du motif polyPro^{p47} (358-372) est de l'ordre de 10⁻⁶M pour C-SH3^{p67} et de 200⁻⁶M pour SH3^{p40}. La région PxxP de p47^{phox} détermine la préférence du polyproline pour le domaine SH3. Nous avons vu que SH3^{p40}, comme C-SH3^{p67}, est capable d'établir une interaction avec la région C-terminale de p47^{phox} (372-390). Cette interaction augmente l'affinité de p47^{phox} pour ses partenaires qui est alors de 0,047⁻⁶M pour C-SH3^{p67} et de 0,52⁻⁶M pour SH3^{p40}. Ces affinités sont alors bien meilleures que celles de la majorité des interactions de type SH3/polyproline (K_d compris entre 10 et 50⁻⁶M). Ceci montre bien l'importance de la région C-terminale de p47^{phox} pour la stabilité de l'interaction.

2- Interactions au sein du complexe cytosolique au repos

2-a) Différence d'affinité entre les protéines entières et les modules isolés

Les affinités entre les facteurs cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} entiers ou réduits à la région C-terminale de p47^{phox} (résidus 358-390) et au domaine C-SH3^{p67} sont proches (Figure 28). Ceci confirme que le complexe p47^{phox}/p67^{phox} est complètement déterminé par l'interaction entre la région C-terminale de p47^{phox} et le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox}.

Par contre, l'affinité entre la région C-terminale de p47^{phox} (résidus 358-390) et SH3^{p40} est environ 10 fois plus forte que celle entre les facteurs cytosoliques p47^{phox} et p40^{phox} entiers (Figure 28). Ceci va dans le sens des résultats de Sathyamoorthy *et al.* (1997), obtenus dans un système cellulaire reconstitué, qui montrent que le domaine SH3^{p40} inhibe plus efficacement l'oxydase que p40^{phox} entier. Cela suggère également que le domaine SH3^{p40} est plus affiné que p40^{phox} entier pour p47^{phox}. Au sein de p40^{phox}, le domaine SH3 (résidus 170-227) est encadré par les modules PX (résidus 24-143) et PB1 (résidus 237-329). Il est possible que ces modules diminuent l'accessibilité de p47^{phox} au domaine SH3. Ainsi, il a été rapporté que la phosphorylation de la sérine 154, située entre les modules PX et SH3, confère à p40^{phox} un rôle d'inhibiteur de la NADPH Oxydase. De plus, cette phosphorylation modifie le profil de protéolyse ménagée de p40^{phox} par la thrombine (Lopes *et al.*, 2004). Ceci suggère que la phosphorylation de p40^{phox} entraîne des changements conformationnels de la protéine. Ceci pourrait augmenter l'accessibilité du domaine SH3^{p40} pour p47^{phox}, le rendant ainsi compétitif avec C-SH3^{p67} pour interagir avec le motif polyproline de p47^{phox}. Si c'est le cas, cette meilleure accessibilité du domaine SH3^{p40} ne permet cependant pas de contre-balancer à elle

seule la force de l'interaction p67^{phox}/p47^{phox} (Figure 28). Des effets additionnels ont peut-être lieu et modifient les affinités SH3/polyproline. Ainsi, l'existence de site de phosphorylations bordant le motif polyproline étaient suspectés comme pouvant jouer ce rôle.


région de p47 ^{phox}	Constante de dissociation K_d (μ M)			
	région de p40 ^{phox}		région de p67 ^{phox}	
	SH3 ^{p40}	p40 ^{phox}	C-SH3 ^{p67}	p67 ^{phox}
p47 ^{phox} C-terminal (358-390) 	0,52 ± 0,011		0,047 ± 0,030	
p47 ^{phox}		5*, #		0,02#
$\frac{K_d \text{ p47}^{\text{phox}} \text{ C-terminal}}{K_d \text{ p47}^{\text{phox}}}$	~ 10		~ 2,3	

Figure 28 □ Constantes de dissociation entre SH3^{p40}/p47^{phox}-Cter, C-SH3^{p67}/p47^{phox}-Cter, p40^{phox}/p47^{phox} et p67^{phox}/p47^{phox}. Le K_d entre p40^{phox}/p47^{phox} a été déterminé par diffusion de neutrons aux petits angles (*, Grizot *et al.*, 2001) et par ultracentrifugation analytique (#, Lapouge *et al.*, 2002) □ Le K_d entre p67^{phox}/p47^{phox} a été déterminé par microcalorimétrie (#, Lapouge *et al.*, 2002).

2-b) Pourquoi le domaine C-SH3^{p67} possède une meilleure affinité que SH3^{p40} pour la région C-terminale de p47^{phox} □

D'après la structure cristallographique du complexe SH3^{p40}/polyPro^{p47} (360-372) (thèse de Claire Massenet, 2002), cette interaction est de type hydrophobe sauf pour l'arginine 368 de p47^{phox}. Le facteur B de la chaîne latérale de cette arginine est bas, ce qui indique que sa position est bien définie dans le complexe □ elle interagit fortement avec le glutamate 188 de la boucle RT de SH3^{p40} (Figure 29).

Selon la structure RMN du complexe C-SH3^{p67}/polyPro^{p47} (359-390) (Kami *et al.*, 2002), l'arginine 368^{p47} est capable d'interagir avec différents résidus acides de la boucle RT de C-SH3^{p67} (Figure 29).

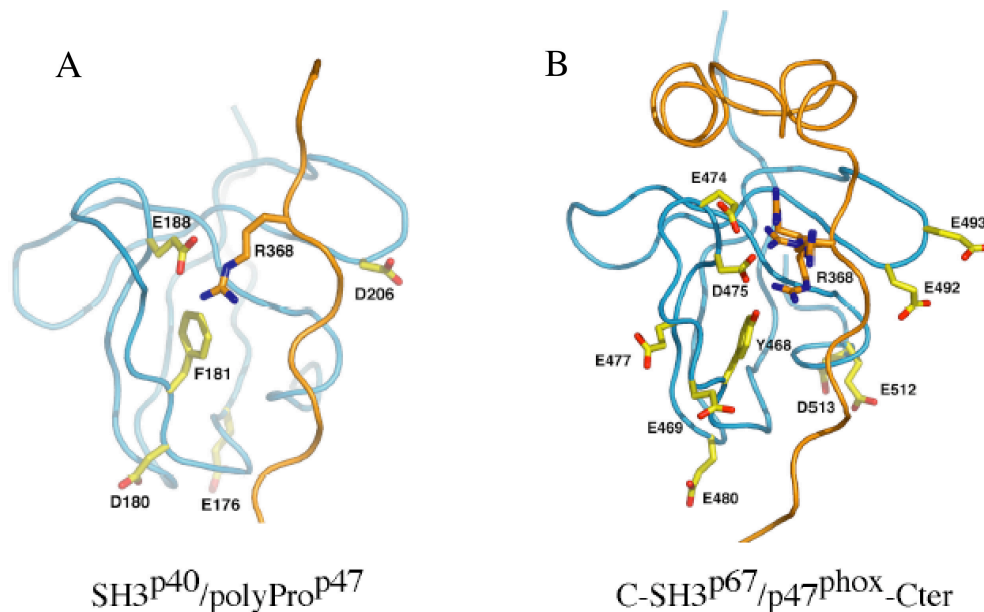


Figure 29 Interactions de l'arginine 368 du motif polyproline de p47^{phox} en complexe avec SH3^{p40} (A) et C-SH3^{p67} (B). Les domaines SH3 sont en bleu avec les chaînes latérales en jaune. L'arginine 368 (R368) et le motif polyproline de p47^{phox} sont en orange. (A) Structure cristallographique du complexe SH3^{p40}/polyPro^{p47} (résidus 360-372) (Thèse de Claire Massenet, 2002) (B) Structure RMN la plus représentative (numéro 7) du complexe SH3^{p40}/p47^{phox}-Cter (résidus 359-390) (Kami *et al.*, 2002, Code PDB 1K4U). Les différentes orientations de l'arginine 368 de p47^{phox}, proposées par les structures RMN, sont représentées.

Ces multiples interactions possibles de l'arginine 368^{p47}, au sein du complexe C-SH3^{p67}/polyPro^{p47}, peuvent renforcer l'interaction entre les deux partenaires. Ceci pourrait expliquer que p47^{phox} interagit plus fortement avec C-SH3^{p67} que SH3^{p40}.

Ainsi, il a été montré que l'arginine 368 de p47^{phox} est essentielle pour l'interaction avec C-SH3^{p67} (Kami *et al.*, 2002). En effet, la mutation ponctuelle R368A diminue l'affinité de p47^{phox}-Cter pour C-SH3^{p67} d'un facteur 625. De plus, la région C-terminale de p47^{phox} 369-389 n'interagit pas avec C-SH3^{p67}. La présence de l'arginine 368^{p47} (séquence 368-389) rétablit cette interaction (Kami *et al.*, 2002).

3- Interactions entre p47^{phox} phosphorylé et les deux autres facteurs cytosoliques

3-a) phosphorylation de p47^{phox} au niveau de ses sérines 359/370

Comme nous l'avons vu en début de chapitre, les sérines 359 et 370 seraient les premières phosphorylées au cours de l'activation de la NADPH Oxydase. Cette phosphorylation est essentielle pour la cascade de phosphorylations et la translocation de p47^{phox} à la membrane. La présence des sérines 359 et 370 de part et d'autre du motif polyproline de p47^{phox} suggérerait que leur phosphorylation puisse induire un changement

d'affinité et donc une réorganisation du complexe cytosolique. Cependant, nos mesures d'affinité entre le polyproline de p47^{phox} (résidus 358-372 ou 358-390) et les domaines SH3^{p40} et C-SH3^{p67} montrent que la phosphorylation mimée ou réelle des sérines 359 et 370 ne modifie ni la préférence de p47^{phox} pour ses partenaires, ni les affinités polyPro/SH3 de façon significative. On peut supposer que l'effet des phosphorylations sur ces positions n'est visible qu'au niveau des protéines entières. Il serait donc intéressant de poursuivre ce travail avec les facteurs cytosoliques entiers.

3-b) phosphorylation de p47^{phox} au niveau de sa sérine 379

Nos mesures d'affinité montrent que la phosphorylation de la sérine 379 affecte l'affinité de la région C-terminale de p47^{phox} pour les deux SH3 et plus fortement pour SH3^{p40}. La structure RMN du complexe SH3C^{p67}/région C-terminale de p47^{phox} (Kami *et al.*, 2002) montre que la sérine 379 est accessible et interagit avec le glutamate 496^{p67}. La diminution de l'affinité polyproline/SH3, due à la phosphorylation de cette sérine, peut donc provenir d'une répulsion par effet de charge entre la sérine 379^{p47} phosphorylée et les glutamates 496^{p67} ou 209^{p40} voisins (Figure 30).

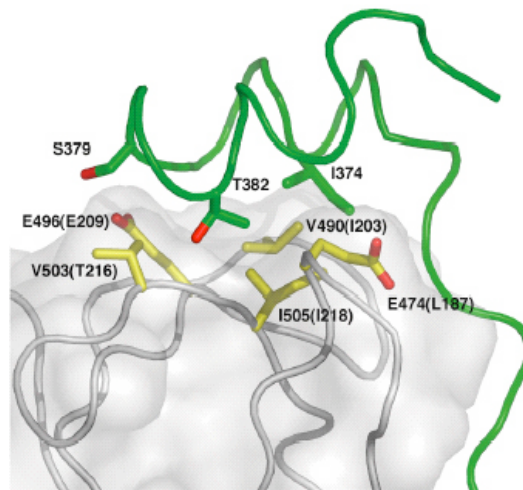


Figure 30 Interface d'interaction entre la région non-PxxP de p47^{phox}-Cter et C-SH3^{p67}. La surface de C-SH3^{p67} est en blanc et la chaîne principale de p47^{phox}-Cter en vert. Les chaînes latérales des résidus de C-SH3^{p67} sont en jaune et de p47^{phox}-Cter en vert. Les résidus indiqués entre parenthèses sont ceux correspondant à SH3^{p40}. La figure a été réalisée avec pyMol, le code PDB du complexe SH3^{p67}/p47^{phox}-Cter est 1K4U.

Nous observons que la phosphorylation de la sérine 379^{p47} affaiblit les interactions p47^{phox}-Cter/SH3 au sein du complexe cytosolique de la NADPH Oxydase. Or, la sérine 379 a été rapportée comme importante pour la translocation de p47^{phox} à la membrane et l'activité

oxydase (Faust *et al.*, 1995). De plus, la translocation du complexe cytosolique à la membrane nécessite des interactions suffisamment fortes et stables entre les facteurs cytosoliques. Il est donc difficile d'expliquer le fait que la phosphorylation de la sérine 379 de p47^{phox} fragilise les complexes polyproline^{p47}/SH3^{p40} et polyproline^{p47}/C-SH3^{p67} dans le contexte de l'activation. Toutefois, si la phosphorylation de cette sérine est effectivement importante pour le transfert de p47^{phox} au flavocytochrome b₅₅₈, une interprétation de nos résultats pourrait être qu'un quatrième partenaire permettrait de consolider le complexe ternaire.

VII Conclusion et perspectives

Au sein du complexe cytosolique de la NADPH Oxydase, p47^{phox} est capable d'interagir via son motif polyproline soit avec p40^{phox}, par son domaine SH3, soit avec p67^{phox} par son domaine SH3 C-terminal (Wientjes *et al.*, 1993 □ Fuchs *et al.*, 1995 □ Dusi *et al.*, 1996). Des études d'affinités ont montré qu'au repos le motif polyproline de p47^{phox} interagit préférentiellement avec le domaine SH3 C-terminal de p67^{phox} (Grizot *et al.*, 2001 □ Lapouge *et al.*, 2002). Au cours de l'activation, plusieurs sérines de p47^{phox} sont phosphorylées, ce qui conduit à une réorganisation de la protéine. Nous pouvons alors nous demander si le complexe ternaire p67^{phox}/p47^{phox}/p40^{phox} ne subissait pas également des réorganisations lors de l'activation. Il avait d'ailleurs été suggéré que la phosphorylation des sérines de la région C-terminale de p47^{phox} pourrait provoquer une diminution de l'affinité du polyproline de p47^{phox} pour C-SH3^{p67}, créant ainsi une compétition entre les domaines C-SH3^{p67} et SH3^{p40} pour interagir avec le motif polyproline de p47^{phox} (Sathyamoorthy *et al.*, 1997 □ Lapouge *et al.*, 2002).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé la fluorescence intrinsèque du tryptophane des domaines SH3. Nous nous sommes d'abord assurés que les changements de propriétés spectrales des domaines SH3, lors des ajouts de p47^{phox} (résidus 358-372 ou 357-390), traduisent bien un phénomène de complexation. Puis, nous avons estimé les constantes de dissociation entre le polyproline de p47^{phox} et les domaines SH3^{p40} et C-SH3^{p67} en fonction de l'état de phosphorylation des sérines 359, 370 et 379 de p47^{phox}.

Notre étude montre que le motif PxxP (358-370) de p47^{phox} est à l'origine de l'affinité plus élevée du polyproline de p47^{phox} pour C-SH3^{p67}. Nous confirmons que la région C-terminale de p47^{phox} permet uniquement de renforcer l'interaction du polyproline de p47^{phox} avec C-SH3^{p67}. Contrairement à ce qui pouvait être attendu, la région C-terminale de p47^{phox} renforce également l'affinité du polyproline^{p47} pour SH3^{p40}. Le mode d'interaction de la région C-terminale de p47^{phox} (résidus 370-390) est donc semblable pour C-SH3^{p67} et SH3^{p40}.

La préférence de p47^{phox} pour p67^{phox} peut être expliquée, au moins en partie, par la forte électronégativité de la boucle RT de C-SH3^{p67} qui permet une meilleure stabilisation de l'arginine 368^{p47}, résidu essentiel à l'interaction polyPro^{p47}/C-SH3^{p67}. De plus, l'accessibilité de SH3^{p40} à p47^{phox} pourrait être gênée par la présence des modules PX et PB1 voisins. Cependant, nous avons montré que SH3^{p40} est capable d'interagir fortement avec les motifs PxxP et non-PxxP de la région C-terminale de p47^{phox}. L'existence d'une situation physiologique, par exemple au cours de l'activation ou de la régulation de l'oxydase,

impliquant l'interaction SH3^{p40}/polyproline^{p47} n'a pas été mise en évidence jusqu'ici. Toutefois, un rôle de régulateur de l'oxydase est proposé pour p40^{phox}. Il n'est pas exclu qu'au cours de l'une des étapes du mécanisme de régulation, l'interaction p47^{phox}/p40^{phox} ait lieu.

De plus, nous avons montré que la phosphorylation des sérines 359/370, ne modifie pas la préférence du polyproline de p47^{phox} pour le domaine C-SH3^{p67}. Ces phosphorylations ne peuvent donc pas initier la cascade d'activation en modifiant les propriétés de liaison du motif polyproline de p47^{phox} aux domaines SH3. Donc, contrairement à ce qui a souvent été suggéré dans la littérature, la phosphorylation des sérines 359/370 n'induit pas la cascade d'activation en modifiant les affinités relatives de p47^{phox} pour p67^{phox} et p40^{phox}. Un autre mécanisme doit être mis en jeu par ces phosphorylations mais il reste à le découvrir.

L'effet des phosphorylations 359/370 est détectable uniquement au niveau de p47^{phox} lui-même. Contrairement à ce qui est généralement admis, Brown *et al.* (2003) ont récemment décrit qu'au repos, les facteurs cytosoliques ne forment pas un complexe ternaire. L'activation conduirait p47^{phox} à interagir avec p67^{phox} afin de transloquer à la membrane le complexe ternaire ainsi formé. Dans ce cas, la phosphorylation des sérines 359 et 370 de p47^{phox} pourrait être nécessaire à la formation du complexe ternaire, en rendant la région C-terminale de p47^{phox} accessible à p67^{phox}. De fait, la phosphorylation des sérines S359^{p47} et S370^{p47} est compatible avec la formation du complexe polyproline de p47^{phox} (résidus 358-390)/C-SH3^{p67}, puisque la constante de dissociation de cette interaction n'est pas affectée par cette phosphorylation.

Enfin, la déstabilisation des complexes polyproline^{p47}/SH3 provoquée par la phosphorylation de la sérine 379 de p47^{phox} est surprenante au regard des données publiées précédemment. Cet effet est encore plus drastique pour l'interaction polyproline^{p47}/SH3^{p40}. Afin de comprendre ce qui se passe au niveau moléculaire, il serait intéressant d'étudier la structure du domaine SH3 de p40^{phox} en complexe avec la région C-terminale de p47^{phox} (358-390). Ce travail pourrait être réalisé en cristallographie des rayons X.

Conclusion et perspectives

Il est généralement admis que les facteurs cytosoliques forment un complexe ternaire au repos. Au sein de ce complexe, p67^{phox} possède un rôle pivot puisqu'il est le seul à interagir simultanément avec les deux autres facteurs.

Au début de ce travail, l'interaction p67^{phox}/p40^{phox} était définie par la région située entre les domaines SH3 de p67^{phox} et la région contenant le motif PC (PCCR) de p40^{phox}. Aucune information structurale étant connue sur ces régions, nous avons entrepris la caractérisation structurale de cette interaction. Notre première approche fut la cristallographie des rayons X de la région de p67^{phox} comprenant les deux domaines SH3. Malgré des efforts d'optimisation de la purification et de nombreux essais de cristallisation, aucun cristal ne fut obtenu pour cette région. Au cours de ce travail, un nouveau module d'interaction avec les régions PCCR partenaires a été délimité. Ce module est appelé PB1 pour Phox et Bem1p. Ainsi, le domaine PB1 de p67^{phox}, capable d'interagir avec le PCCR de p40^{phox}, a été délimité entre les deux domaines SH3. Nous avons donc poursuivi ce travail avec la région comprenant le domaine SH3 N-terminal et le domaine PB1 de p67^{phox} (SH3NPB1) et la région C-terminale de p40^{phox} (p40-Cter). Les essais de cristallisation de SH3NPB1 seule et en complexe avec p40-Cter ont également échoué. L'étude a donc été restreinte au domaine PB1 de p67^{phox} (PB1^{p67}) afin de s'affranchir des risques de flexibilité de la protéine dus aux séquences charnières. Une fois de plus, malgré les 960 conditions testées par le robot de cristallisation, disponible à l'institut, aucun cristal ne s'est formé. Nous avons alors testé la structuration des PB1^{p67} et p40-Cter par protéolyse ménagée à la trypsine. Ces résultats plus les spectres 2D-HSQC (¹H-¹⁵N) préliminaires de PB1^{p67} et p40-Cter nous ont encouragés à poursuivre la caractérisation de l'interaction p67^{phox}/p40^{phox}, via ces régions, par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Nous avons ainsi obtenu le repliement de la chaîne principale du domaine PB1 de p67^{phox}, la topologie du domaine de p40-Cter et la caractérisation de l'interface d'interaction. Par des expériences de dynamique en solution, nous avons également déterminé une région de PB1^{p67} mobile. Il s'agit de la boucle formée entre les brins α_3 et α_4 , où se situe l'arginine 395 de p67^{phox}. Ce résidu, dont la mutation en tryptophane a été identifiée chez un patient atteint de CGD, forme une liaison hydrogène avec la proline 339 du bras C-terminal de p40^{phox} qui se replie sur PB1^{p67}. Cette région semble donc particulière dans l'interaction entre les PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}.

Au cours de ce travail, de nombreux domaines PB1 appartenant à des protéines eucaryotes de systèmes biologiques variés ont été caractérisés. La structure cristallographique

ou RMN a été résolue pour quelques-uns de ces domaines PB1 et des régions PCCR. Ces structures sont compactes et toutes de type ubiquitine. Sur la base de ces données structurales, les régions PCCR ont alors été classées parmi les domaines PB1. L'ensemble des données structurales permet de définir deux types de domaines PB1. Les domaines qui possèdent un motif PC riche en résidus acides, comme le domaine PB1 de p40^{phox}, sont appelés de type I. Ceux qui ne possèdent pas de motif PC mais une lysine conservée en N-terminal, souvent entourée par d'autres résidus basiques, comme le domaine PB1 de p67^{phox}, sont appelés de type II. Les domaines PB1 de type I et de type II sont partenaires et leur interaction est de type électrostatique. Certains domaines PB1 possèdent l'ensemble de ces critères et sont alors appelés de type I+II. Ces domaines sont parfois capables d'interagir avec eux-mêmes ou de fédérer une chaîne d'interactions pour former des oligomères en solution. Les résidus conservés au sein de ces domaines semblent importants pour l'interaction. Des résidus non conservés semblent importants pour la spécificité d'interaction mais ils restent à définir précisément.

Au repos, p67^{phox} interagit avec le motif polyproline C-terminal de p47^{phox} par son domaine SH3 C-terminal. Des études d'interaction montrent que ce motif polyproline de p47^{phox} est également capable d'interagir avec le domaine SH3 de p40^{phox}. Toutefois, le complexe C-SH3^{p67}/polyproline est plus favorable au repos. Lors de l'activation, p47^{phox} subit de nombreuses phosphorylations, notamment au niveau de ce motif polyproline. La protéine passe alors d'une conformation fermée à ouverte. De nombreuses interactions entre les modules des facteurs cytosoliques ont été mises en évidence *in vitro*. Or, seules certaines de ces interactions sont présentes au repos. Cela suggère des possibilités de réarrangements au sein du complexe ternaire suite à l'activation. Une hypothèse est d'ailleurs souvent rencontrée dans la littérature. Elle propose que, suite à l'activation, le motif polyproline C-terminal de p47^{phox} change de domaine SH3 partenaire. Nous avons testé cette hypothèse en déterminant l'affinité du motif polyproline de p47^{phox} pour les domaines SH3 de p40^{phox} (SH3^{p40}) et p67^{phox} (C-SH3^{p67}). Ces mesures ont été réalisées par fluorescence intrinsèque du tryptophane avec des peptides mimant les premières étapes de phosphorylation de p47^{phox} sur les sérines 359, 370 et 379. Nous avons fait synthétiser des peptides courts, correspondant au motif PxxP classique dans les interactions SH3/polyproline (résidus 358-372), et des peptides longs comprenant la région C-terminale de p47^{phox} (résidus 358-390). Nos résultats ainsi que l'analyse des structures des domaines SH3^{p40} (thèse de Claire Massenet réalisée au laboratoire) et C-SH3^{p67} (Kami *et al.*, 2002) en complexe avec le polyproline de p47^{phox}, nous

ont permis de caractériser ces interactions SH3/polyproline au cours des premières étapes de phosphorylation de p47^{phox}. Tout d'abord, nous confirmons que le motif PxxP est responsable de la forte affinité du polyproline pour C-SH3^{p67} et que la région C-terminale (résidus 372-390) est importante pour renforcer cette interaction. Nous montrons que la région C-terminale renforce également l'affinité du polyproline pour SH3^{p40} et donc que le mode d'interaction du polyproline de p47^{phox} (résidus 358-390) est le même pour ses deux domaines SH3 partenaires.

La phosphorylation des sérines 359 et 370 ne modifie pas l'affinité du polyproline pour les deux domaines SH3. Ces sérines sont les premières de la cascade de phosphorylation de p47^{phox} lors de l'activation. Elles sont essentielles à la phosphorylation des autres sérines et à l'activité oxydase. Elles encadrent directement le motif PxxP de p47^{phox} en interaction avec la plateforme hydrophobe des domaines SH3. Bien que ces sérines n'interagissent pas directement avec les domaines SH3, le domaine C-SH3^{p67} étant chargé négativement (et SH3^{p40} étant neutre), nous pensions observer un effet de charge sur l'affinité du polyproline pour ses partenaires. Or, ces phosphorylations n'affectent l'affinité du polyproline ni pour le SH3 C-terminal de p67^{phox}, ni pour le SH3 de p40^{phox}. Contrairement à ce qui a souvent été suggéré, ces phosphorylations ne déclenchent donc pas la cascade d'activation en modifiant les affinités relatives du motif polyproline de p47^{phox} pour ses domaines SH3 partenaires. L'initiation de la cascade d'activation par la phosphorylation des sérines 359 et 370 doit donc impliquer un mécanisme moléculaire qui reste à définir.

De plus, la phosphorylation de la sérine 379 de p47^{phox} diminue également l'affinité du polyproline de p47^{phox} pour les deux SH3, surtout pour le domaine SH3^{p40}. Cette sérine étant en interaction avec des résidus acides des domaines SH3, cette diminution d'affinité peut provenir d'un effet de charge du groupement phosphate. Cependant, la phosphorylation de la sérine 379 étant rapportée comme importante pour la translocation de p47^{phox} à la membrane (Faust *et al.*, 1995), la déstabilisation des complexes SH3/polyproline est difficilement interprétable. Si la phosphorylation de cette sérine est effectivement importante pour le transfert à la membrane de p47^{phox}, une interprétation de nos résultats pourrait être qu'un quatrième partenaire du complexe ternaire permettrait une cohésion entre les facteurs cytosoliques.

L'étude structurale des facteurs cytosoliques de la NADPH Oxydase a conduit à la résolution de la structure des différents domaines qui composent ces protéines modulaires. Certaines structures de complexes entre modules partenaires, comme celle des domaines SH3

de p47^{phox} en complexe avec sa région d'auto-inhibition (AIR), ont apporté des informations importantes dans la compréhension de l'activation du complexe. Ce travail a effectivement contribué à la compréhension du mécanisme d'activation de p47^{phox} par son ouverture lors de l'activation. Cependant, cela a également fait surgir de nouveaux points d'interrogation. En effet, de nombreuses interactions possibles entre les différents modules ont été décrites *in vitro* mais il est possible que certaines soient artefactuelles, ou présentes qu'à certaines étapes du processus d'activation... Par exemple, l'interaction entre le tandem de SH3 de p47^{phox} et sa région AIR (montrée par la structure cristallographique) est difficilement conciliable avec l'interaction entre ce même tandem de SH3 et le motif polyproline du domaine PX de p47^{phox} (montrée par RMN) au repos. Pour apporter des éléments de réponse à ce type d'interrogations, il faut désormais travailler avec les protéines entières. Or, les protéines cytosoliques sont constituées de modules liés entre eux par des séquences charnières de 10 à 50 acides aminés qui, très probablement, entraînent une flexibilité des protéines. La cristallographie ne permet donc pas l'étude structurale de ce type de protéines dans leurs formes entières. De plus, étant donnée la taille de ces protéines (entre 40 et 67 kDa) la RMN n'est pas non plus une technique adaptée à leur étude structurale. Cependant, des techniques de résolution de structures à très basse résolution est une alternative très prometteuse pour l'étude structurale des facteurs cytosoliques entiers. En effet, la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS pour Small Angle X ray Scattering) ou la microscopie électronique permettent de révéler l'enveloppe de la protéine. Il est alors possible d'insérer la structure haute résolution des modules, donnant ainsi un modèle structural des protéines entières.

Outre la structure des composants de la NADPH Oxydase, il me semble que la priorité est maintenant l'étude de la dynamique des interactions entre les facteurs cytosoliques lors de l'activation de la NADPH Oxydase. Des informations de ce type, conjuguées à des données de cinétique de l'explosion respiratoire, pourraient, à mon avis, définir précisément le rôle de p40^{phox} au sein du complexe. En effet, des premiers résultats montrent une concomitance entre l'activité enzymatique de l'oxydase et la phosphorylation de p40^{phox} (Fuchs *et al.*, 1994). Etant donnée que la moitié des auteurs attribue à p40^{phox} un rôle d'inhibiteur de l'oxydase et l'autre moitié un rôle d'activateur, et que Lopes *et al.* en 2004 ont montré que p40^{phox} est inhibiteur de l'oxydase lorsqu'il est phosphorylé, il n'est pas impossible que ce facteur cytosolique puisse, au début de l'activation, être activateur de l'oxydase. Il pourrait permettre de renforcer la stabilité de p67^{phox} pourquoi pas en jouant un rôle d'adaptateur. Puis, en fin de réaction lorsque p40^{phox} est complètement phosphorylé, la protéine pourrait subir des réarrangements

suite à ces phosphorylations, comme dans le cas de p47^{phox}, et ainsi déstabiliser le complexe. Il serait alors inhibiteur de l'oxydase.

Un autre versant du fonctionnement de la NADPH Oxydase serait l'étude des interactions entre les facteurs cytosoliques, notamment p47^{phox}, avec les protéines du cytosquelette. En effet, des interactions de p47^{phox} avec la moésine (Wientjes *et al.*, 2001) et la coronine (Grogan *et al.*, 1997) ont été décrites. Ces interactions avec les protéines du cytosquelette sont probablement responsables du transfert à la membrane des facteurs cytosoliques. Ce type d'étude pourrait donc également permettre une meilleure compréhension de la dynamique d'interaction lors du processus d'activation du complexe.

Annexes

Principe de la cristallogénèse des protéines

(David Sheehan)

Un cristal peut être défini comme la répétition régulière de molécules dans l'espace tridimensionnel. Le cristal formé est placé dans un faisceau de rayons X. Les molécules diffractent les rayons X et des images de diffraction sont alors enregistrées. La densité électronique de la molécule est obtenue à partir de ces images de diffraction, après un long traitement mathématiques. Un modèle s'appuyant sur la séquence primaire de la protéine est ensuite introduit dans cette densité électronique. Après affinement du modèle, la structure atomique de la protéine est alors obtenue.

En pratique, la cristallogénèse des protéines est l'une des étapes limitantes majeures. Pour obtenir un cristal de protéine, il faut que les molécules s'organisent de façon très ordonnée à partir d'une phase liquide, la solution protéique (Figure 1). La zone du diagramme de phase où la protéine cristallise est étroite, contrairement à la zone de précipitation. La précipitation correspond à un arrangement plus ou moins aléatoire des molécules entre elles, formant des agrégats désordonnés.

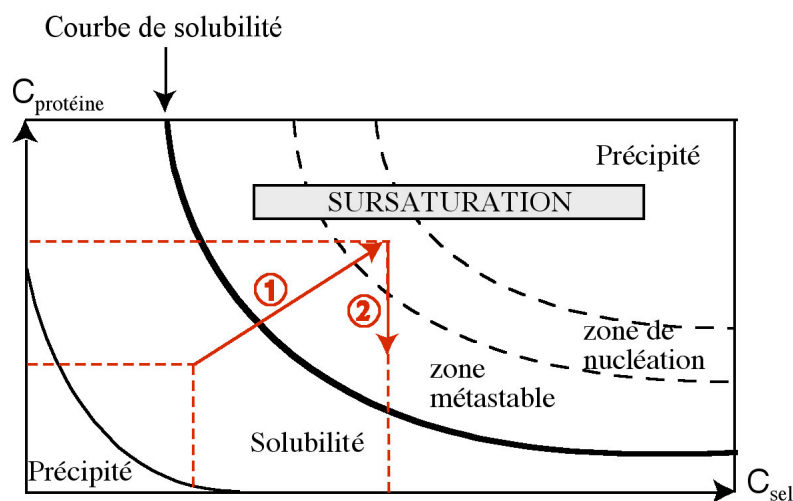


Figure 1 □ diagramme de phase. (1) □ premier équilibre qui se produit lors de la diffusion en phase vapeur □ (2) □ second équilibre qui se fait lors de la croissance du cristal.

Le principe le plus souvent utilisé est celui de la diffusion en phase vapeur. Il permet de concentrer la protéine et l'agent précipitant de façon à passer de l'état soluble à cristallin. La méthode que j'ai utilisée est la goutte suspendue dont le montage expérimental est

représenté par la Figure 2. Le volume de la goutte est composé à 50% de solution protéique et à 50% de la solution du réservoir contenant l'agent précipitant (par exemple un sel ou un polymère de haut poids moléculaire comme le polyéthylène glycol). La concentration en agent précipitant est donc deux fois plus diluée dans la goutte que dans le réservoir. Le phénomène de diffusion en phase vapeur équilibre cette concentration dans la goutte et le réservoir (chemin (1) sur la Figure 1). Les concentrations en agent précipitant et protéine sont alors doublées dans la goutte. En partant de conditions initiales adéquates, la cristallisation peut être atteinte. Un germe cristallin est formé et va croître pour donner un cristal. La concentration de protéines dans la goutte diminue alors jusqu'à atteindre un nouvel équilibre (chemin (2) sur la Figure 1). La zone de sursaturation est divisée en trois régions □ la zone de précipitation, la zone de nucléation où le germe peut se former et croître, et la zone métastable où le germe ne peut pas se former mais où il peut grandir. L'objectif est donc d'atteindre la zone de nucléation.

Plusieurs variables peuvent affecter la solubilité de la protéine et sa cristallisation. Il faut donc faire varier des paramètres comme la nature de l'agent précipitant, sa concentration, la concentration de la protéine, le tampon, la température, le pH, les volumes, etc... J'ai donc commencé les essais de cristallogenèse par les kits de cristallisation du commerce (Hampton) qui permettent de tester de nombreuses conditions en agents précipitant, pH et tampon. J'ai également joué sur la température (20°C et 8°C) juste après la formation des gouttes. Puis, les conditions prometteuses (observation de granules ou précipité cristallin dans la goutte) sont de nouveau testées, à partir de solutions réalisées au laboratoire, en faisant varier le pH ou les concentrations.

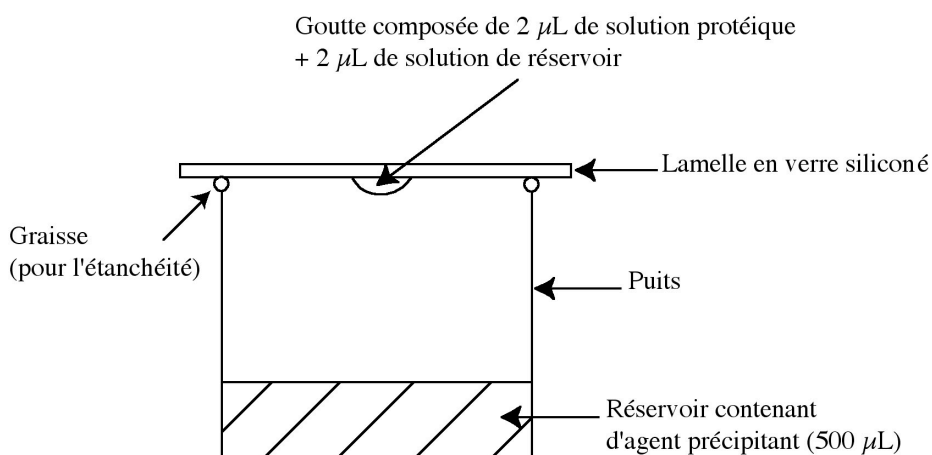


Figure 2 □ schéma du montage expérimental de la goutte suspendue.

De plus, la cristallogenèse des protéines demande des solutions protéiques pures et homogènes. Il faut également des quantités de protéine relativement importantes pour pouvoir travailler à des concentrations de protéine d'environ 10 à 50 mg/mL et tester de nombreuses conditions de cristallisation.

Etude des domaines PB1 par Résonance Magnétique Nucléaire

1- Résonance Magnétique Nucléaire – généralités

La Résonance Magnétique Nucléaire est une méthode spectroscopique fondée sur une propriété du noyau – le spin.

Certains atomes ont un spin exploitable par RMN. C'est le cas du proton naturellement présent au sein des protéines. La RMN du proton est donc très largement utilisée pour l'étude de molécule biologique. L'échantillon protéique est placé dans un champ magnétique statique d'une dizaine de Teslas. Les spins nucléaires sont ensuite « excités » par une impulsion radiofréquence. Suite à cette impulsion, des signaux correspondant à des sinusoïdes amorties en fonction du temps (FID pour Free Induction Decay) sont détectés. La transformée de Fourier de ces signaux temporels permet d'obtenir un spectre RMN (Sheehan, 2000). Chaque pic de ce spectre correspond à un proton dont le spin a été excité. La position du pic dépend de l'environnement du spin au sein de la protéine et permet ainsi d'obtenir des informations structurales. Cette position est définie par les déplacements chimiques (δ) exprimés en ppm (partie par million).

De nombreux protons sont présents dans les protéines. Ceci conduit à des recouvrements de pics et rend l'interprétation des données difficile. Pour que les spectres deviennent exploitables, des expériences à deux ou trois dimensions sont réalisées (Sheehan, 2000). Ce type d'expérience est obtenu par la corrélation entre des spins de même nature ou de nature différente. Cela conduit à des spectres multidimensionnels, où l'information est distribuée sur les différentes dimensions, limitant ainsi les recouvrements. Souvent, ces dimensions correspondent aux fréquences de résonance du proton, de l'azote et du carbone, composants majoritaires des protéines. Cependant, le carbone ^{12}C et l'azote ^{14}N ne sont pas exploitables en RMN liquide contrairement aux isotopes ^{13}C et ^{15}N . Or, ces isotopes possèdent une abondance naturelle faible (1,11% pour le ^{13}C et 0,37% pour le ^{15}N) et il faut enrichir isotopiquement les protéines que l'on souhaite étudier par RMN (Janin et Delpierre, 1994). Le protocole de marquage est donné dans la partie « Matériel et méthodes ». La corrélation observée entre les spins peut être de deux sortes – soit à travers les liaisons chimiques, par couplage scalaire, soit à travers l'espace, par couplage dipolaire.

La RMN, comme la cristallographie des rayons X, permet d'accéder à la structure des protéines à l'échelle atomique. La cristallographie est considérée comme la méthode de choix

pour l'obtention de structures à haute résolution. Cependant, la cristallisation d'une protéine est une étape délicate qui n'aboutit pas toujours. La RMN peut alors être une technique alternative pour l'obtention de structures tridimensionnelles, à condition que la protéine ne dépasse pas 30 à 40 kDa. Dans ce cas, la protéine est sous forme soluble et non plus dans un empilement cristallin. La démarche est différente entre ces deux techniques. Par RMN, la structure protéique est obtenue en positionnant les atomes les uns par rapport aux autres grâce à des contraintes expérimentales de distance et d'angle. Par cristallographie, une carte de densité électronique est obtenue dans laquelle un modèle basé sur la séquence primaire est introduit. Cela revient à attribuer à chaque atome des coordonnées dans l'espace au sein du cristal. Chacune de ces techniques permet d'identifier les résidus situés dans la zone d'interaction entre deux protéines et ainsi de caractériser le type d'interaction mis en jeu entre les partenaires. En RMN, ce type d'information peut être obtenu sans résoudre la structure de la protéine. Cette technique permet également d'étudier la dynamique de molécules en solution (Sheehan, 2000), ce qui n'est pas le cas en cristallographie. Cependant, une étude RMN exige que la protéine soit stable dans le temps à température ambiante.

Il peut être intéressant d'utiliser la complémentarité de ces deux techniques. Une structure obtenue par cristallographie peut être enrichie d'une étude d'interaction ou de dynamique en solution. La RMN peut également être un pré-requis pour une étude cristallographique. Cette technique permet en effet d'estimer la flexibilité d'une protéine en solution et donc la faisabilité d'une étude par cristallographie.

2- Etude structurale des domaines PB1

Pour réaliser l'étude structurale des domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}, nous avons marqué ces protéines recombinantes (PB1^{p67} ≈ 10319 Da et p40-Cter ≈ 14076 Da) avec de l'¹⁵N et/ou du ¹³C, selon le type d'expérience (voir partie « Matériel et méthodes »). La stratégie adoptée pour ce travail est présentée ci-dessous.

2-a) La première étape est l'**attribution de la chaîne principale peptidique**. Cela consiste à déterminer la fréquence de résonance de tous les atomes de la chaîne principale. Pour l'étude des domaines PB1, nous avons réalisé les expériences suivantes. Le premier type d'expérience est un HSQC (¹H-¹⁵N) qui permet d'identifier la fréquence de résonance de l'azote amide (N^H) et de son proton (H^N) (Figure 1). Cette expérience très sensible est réalisée avec la protéine marquée ¹⁵N. Sur ce type de spectre à deux dimensions, chaque acide aminé

de la protéine est représenté par un pic dont les coordonnées sont les fréquences de résonance ^1H et ^{15}N (Figure 2).

Puis, pour la protéine p40-Cter, un ensemble d'expériences trois dimensions de type HNCA, HNCO, HNCACB et DEPT-CBCA(CO)NH (Brutscher, 2004) est effectué avec la protéine doublement marquée $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. Ces expériences permettent de déterminer la fréquence de résonance des atomes H^\square , $\text{C}^\square(i)$, $\text{C}^\square(i-1)$, $\text{C}^\square(i)$, $\text{C}^\square(i-1)$ et $\text{CO}(i-1)$ des acides aminés (Figure 1 et Figure 2). Le DEPT signifie qu'il est possible de différencier la nature du C (CH, CH₂ ou CH₃), ce qui peut donner une idée sur le type d'acide aminé. Ces expériences 2D et 3D sont basées sur le transfert d'aimantation à travers les liaisons chimiques (couplages scalaires). La séquence primaire donnant l'enchaînement des acides aminés, il est possible d'attribuer l'ensemble des fréquences de résonance aux différents résidus.

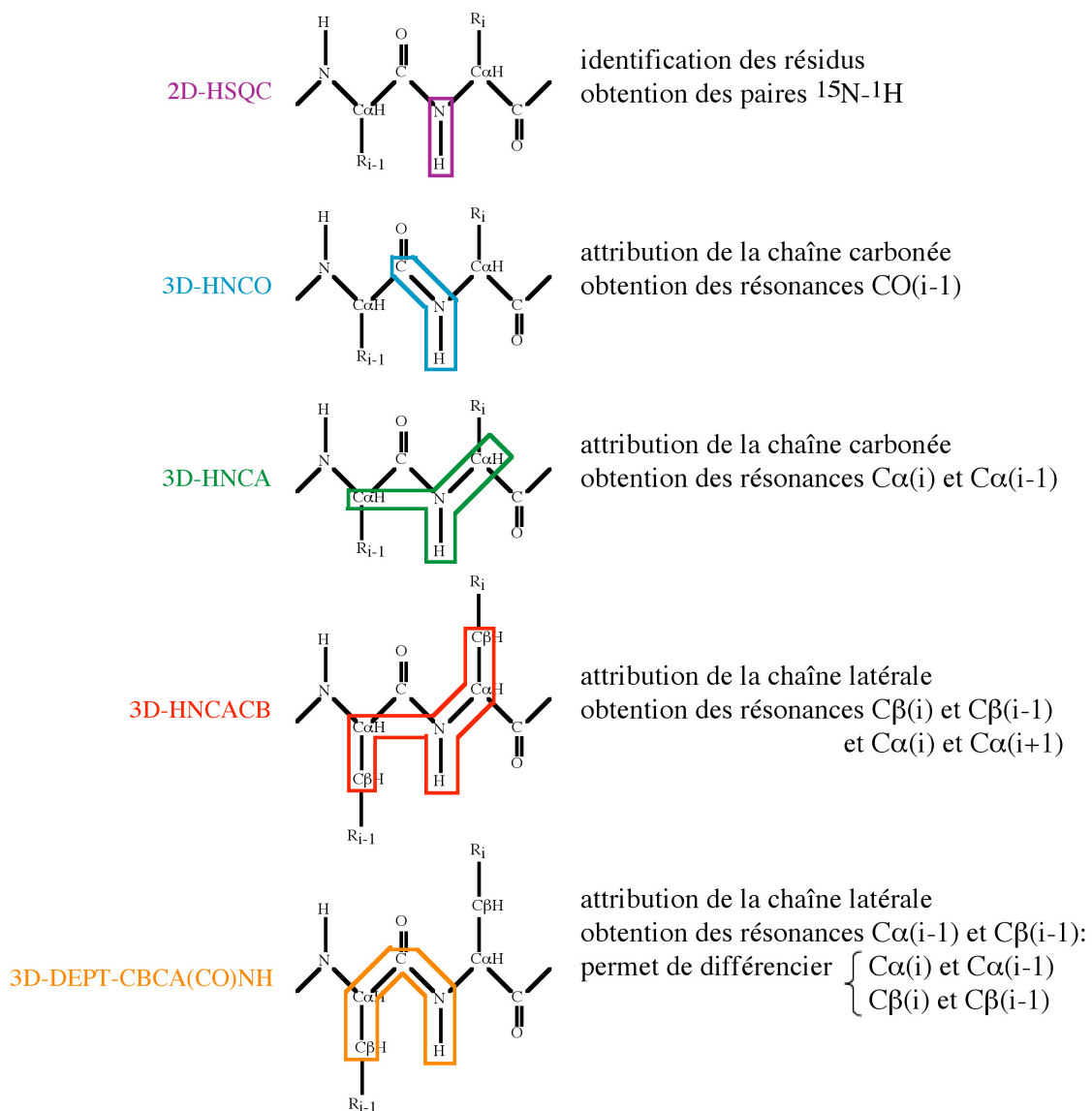


Figure 1 \square Couplage scalaire obtenu selon le type d'expérience RMN. L'objectif de ces expériences et les fréquences de résonance obtenues sont indiquées dans la colonne de droite. R pour résidu.

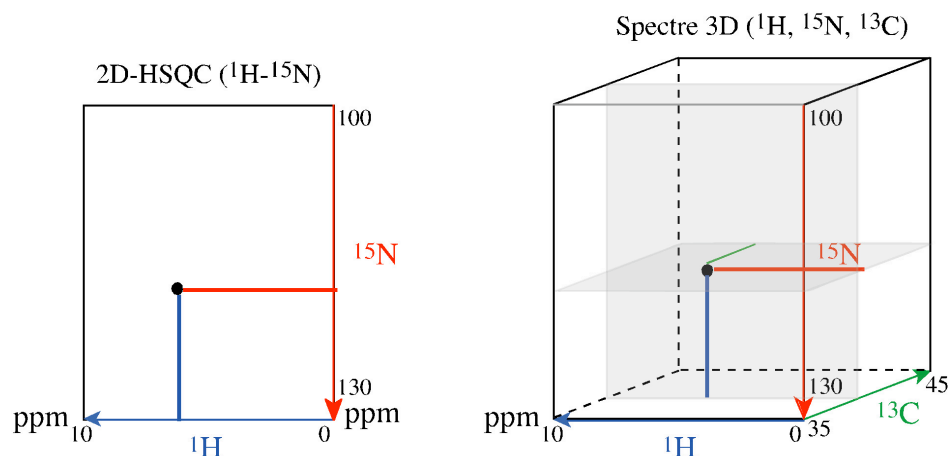


Figure 2 Représentation schématique d'un spectre à deux dimensions (de type HSQC ^1H - ^{15}N) (à gauche) et à trois dimensions ^1H , ^{15}N , ^{13}C (à droite).

L'attribution de la protéine PB1^{p67} a été réalisée par une approche de « dimensionnalité réduite » (Szyperski *et al.*, 1993). Elle consiste en l'obtention d'une série de spectres à deux dimensions qui permet d'obtenir les mêmes informations spectrales que la méthode classique décrite ci-dessus (Simorre *et al.*, 1994 ; Brutscher *et al.*, 1994 ; Bersch *et al.*, 2003). De plus, l'ensemble des spectres nécessaires à l'attribution de la protéine peut être enregistré très rapidement (environ une journée). Le temps expérimental est donc significativement réduit.

2-b) La seconde étape est la **délimitation des structures secondaires.**

La délimitation des structures secondaires en RMN se fait par recoupement de plusieurs types d'informations.

Nous utilisons d'abord des informations sur la distance entre protons, obtenues par des expériences de type ^1H - ^1H NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Les spectres NOESY permettent en général d'observer des pics de corrélation (NOEs) entre des protons distants de moins de 5Å . Dans ce type d'expérience, le transfert d'aimantation se fait par couplage dipolaire (magnétique) à travers l'espace. Ces spectres permettent, par exemple, de visualiser un pic de corrélation correspondant au couplage dipolaire entre le couple amide N-H d'un résidu i avec celui d'un résidu $i+1$ distants de moins de 5Å . Les structures secondaires possèdent un repliement particulier de la chaîne polypeptidique. Ils présentent donc des distances entre protons $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ et $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ caractéristiques. Dans une hélice α , les protons $\text{H}^{\text{N}}(i)\text{-H}^{\text{N}}(i+1)$ sont distants de $2,8\text{Å}$ et $\text{H}^{\alpha}(i)\text{-H}^{\text{N}}(i+3)$ de $3,4\text{Å}$. Dans un feuillet β , les protons $\text{H}^{\alpha}(i)\text{-H}^{\text{N}}(i+1)$ sont distants de $2,2\text{Å}$ (Figure 3). Il est donc possible d'observer des pics de

corrélation entre ces protons sur des spectres NOESY. Nous avons donc réalisé ce type d'expériences avec les protéines marquées ^{15}N .

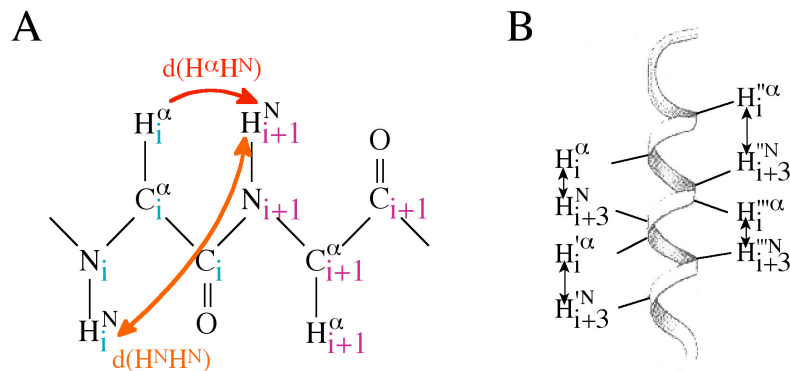


Figure 3 Distances inter-protons dans les feuillets et les hélices. A) la distance entre H_i^α et $\text{H}_{i+1}^{\text{N}}$ ($d(\text{H}_i^\alpha\text{-H}_{i+1}^{\text{N}})$) est de $2,2\text{\AA}$ dans un feuillet; la distance entre H_i^{N} et $\text{H}_{i+1}^{\text{N}}$ ($d(\text{H}_i^{\text{N}}\text{-H}_{i+1}^{\text{N}})$) est de $2,8\text{\AA}$ dans une hélice. B) la distance entre H_i^α et $\text{H}_{i+3}^{\text{N}}$ ($d(\text{H}_i^\alpha\text{-H}_{i+3}^{\text{N}})$) est de $3,4\text{\AA}$ dans une hélice.

Puis, nous utilisons la propriété qu'ont les protons amides d'être échangeables avec les protons du solvant. Le but ici est de repérer les protons qui s'échangent lentement, c'est-à-dire protégés du solvant. Cette protection est généralement due à l'implication du proton amide dans une liaison hydrogène. Pour réaliser ceci, la protéine est lyophilisée puis remise en solution avec de l'eau lourde (D_2O). Un spectre 2D-HSQC ($^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$) est réalisé immédiatement après la remise en solution puis 40 minutes et 24 heures plus tard. Seuls les résidus protégés du solvant n'échangent pas leur proton amide et donnent un signal sur ce type de spectre RMN. Ces acides aminés sont donc très probablement impliqués dans des liaisons hydrogène.

Enfin, nous utilisons l'Indice de déplacement chimique (CSI) (Wishart and Sykes, 1994). La variation de déplacement chimique ($\Delta\delta$) des C^α ($\Delta\delta_{\text{C}^\alpha}$) et CO ($\Delta\delta_{\text{CO}}$) d'un résidu est calculée par rapport à une valeur moyenne ($\delta_{\text{C}^\alpha}^r$) représentative d'un résidu de même nature dans une séquence peptidique variable.

$$\Delta\delta_{\text{C}} = \delta_{\text{C}} - \delta_{\text{C}}^r, \text{ où } \delta_{\text{C}} \text{ correspond à } \delta_{\text{C}^\alpha} \text{ ou } \delta_{\text{CO}}$$

Si $\Delta\delta_{\text{C}} > 0$, c'est la signature d'une structuration en hélice.

Si $\Delta\delta_{\text{C}} < 0$, c'est la signature d'une structuration en feuillet.

La représentation peut être simplifiée en admettant que :

Si $\Delta\delta_{\text{C}^\alpha} > 0,7$ ppm, on donne le score +1

Si $\Delta\delta_{\text{C}^\alpha} < 0,7$ ppm, on donne le score -1

Si $\Delta\delta_{\text{CO}} > 0,5$ ppm, on donne le score +1

Si $\Delta\delta_{\text{CO}} < 0,5$ ppm, on donne le score -1

Puis la somme des scores est réalisée pour les C^α et CO d'un même résidu. Si, sur plusieurs résidus consécutifs, cette somme est positive (+1 ou +2), ceci est représentatif d'une hélice α et inversement, un score négatif (-1 ou -2) est représentatif d'un brin β .

2-c) L'orientation des brins β au sein du feuillet β est réalisée à partir de deux types de données. D'une part, les résidus protégés du solvant, déterminés précédemment, nous renseignent sur les liaisons hydrogènes formées entre brins β . D'autre part, les pics de corrélation NOE entre les protons H^N-H^N et H^N-H^α nous renseignent sur la proximité des résidus au sein du feuillet β . Ainsi, nous pouvons orienter les brins β deux à deux et les positionner de façon parallèle ou anti-parallèle.

2-d) La dernière étape est la **détermination de la structure tridimensionnelle** de la protéine. Les calculs de structures sont réalisés à partir de données expérimentales intégrées dans un calcul de dynamique moléculaire qui permet de respecter les propriétés physico-chimiques de la molécule (longueurs des liaisons, angles de torsion, *etc*). Le principe du calcul de structures est de minimiser une fonction d'énergie, appelée «**l'énergie cible**», composée du champ de force et d'un terme expérimental. Le champ de force regroupe différents termes d'énergie potentielle décrivant, entre autres, l'élongation des liaisons ou les angles de torsion. Un ensemble de conformères obtenus par le calcul et en accord avec ces contraintes est sélectionné. Les structures de plus basse énergie expérimentale sont retenues pour former le modèle RMN de la structure tridimensionnelle de la protéine.

Le fichier de calcul de la structure de PB1^{p67} contient la délimitation des hélices α et des brins β , les liaisons hydrogènes identifiées par les échanges H/D et enfin les distances méthyle-méthyle. Les groupements méthyles appartiennent souvent à des résidus hydrophobes qui sont généralement au cœur de la protéine. Les NOEs méthyle-méthyle contraignent donc le repliement de la protéine. Pour déterminer ces contraintes longues distances, l'attribution des résonances ¹H et ¹³C des groupements méthyle de la chaîne latérale des résidus alanine, leucine, isoleucine, thréonine et valine est nécessaire. Les pics de corrélation entre méthyles sont ensuite identifiés à partir de l'expérience 3D CT-HSQC-NOESY-CT-HSQC éditée ¹³C (Zwahlen *et al.*, 1998). Ils informent sur la proximité entre ces

résidus ($\approx 0.1 \text{ \AA}$) et permettent d'imposer des contraintes supplémentaires pour le calcul de structures. S'ajoutent à ces données expérimentales des informations comme les angles de torsion τ (entre C^α et N^H) et ϕ (entre C^α et CO), calculés par le programme TALOS à partir des déplacements chimiques mesurés (Cornilescu *et al.*, 1999), et le champ de force (AMBER). Plusieurs structures, toutes satisfaisant les contraintes de distances et d'angles, résultent des calculs de structures. Environ vingt structures de plus basse énergie sont retenues et constituent le modèle structural tridimensionnel de la protéine.

3- Etude de l'interface d'interaction par RMN

Pour étudier l'interface d'interaction entre deux partenaires, il faut, au préalable, que les deux protéines soient attribuées dans le complexe. Pour cela, des expériences HNCO, HNCA et DEPT-CBCA(CO)NH sont réalisées. Les fréquences de résonance des atomes $C^\alpha(i)$, $C^\alpha(i-1)$, $C^\beta(i-1)$ et CO(i-1) ainsi obtenues, sont peu sensibles à l'environnement. La variation de déplacement chimique entre la protéine seule et complexée est donc faible pour ces atomes. En comparant ces fréquences à celles obtenues pour la protéine seule, il est possible d'attribuer les pics du spectre 2D-HSQC ($^1H/^{15}N$) de la protéine en complexe. L'approche que nous avons utilisée est basée sur la liste d'attribution de la protéine libre. Seuls les résidus déjà attribués pour la protéine seule peuvent donc l'être dans le complexe. Les résidus qui possèdent une forte variation de déplacement chimique pour le 1H et ^{15}N correspondent aux acides aminés dont l'environnement change. Ces résidus sont donc ceux situés dans la zone d'interaction entre les deux partenaires.

Pour réaliser ce genre d'expériences, seule la protéine dont on souhaite identifier la région d'interaction doit être visible en RMN. Pour cela, cette protéine est la seule marquée ^{15}N et le complexe est formé avec son partenaire non marqué. Les résidus possédant une forte variation de déplacement chimique pour le 1H et ^{15}N sont identifiés. Le même travail est réalisé pour la seconde protéine.

Spectroscopie de fluorescence

Les grands principes de la fluorescence, ainsi que le calcul pour déterminer les constantes de dissociation par fluorescence intrinsèque du tryptophane, vont être présentés ici.

1- Principes de la fluorescence

Cette partie a été réalisée à partir des références bibliographiques suivantes [Janin et Delepierre, 1994] [Callis, 1997] [Eftink, 1997] [Sheehan, 2000].

A l'échelle atomique, les électrons peuvent passer de l'état énergétique fondamental S_0 à différents niveaux électroniques d'énergie supérieure (état excité S_1). Pour cela, il faut apporter à l'atome l'énergie juste nécessaire pour passer de l'état S_0 à S_1 . Cette énergie E est fournie par une radiation électromagnétique de longueur d'onde λ ($E = hc/\lambda$, h étant la constante de Planck et c la vitesse de la lumière). C'est la phase d'absorption ou d'excitation. L'étude de molécules en solution par spectroscopie est limitée aux régions du spectre où le solvant n'absorbe pas. En solution aqueuse, les longueurs d'onde plus courtes que 180 nm sont entièrement absorbées par le solvant. Seules les molécules qui absorbent dans l'ultraviolet proche et le visible (entre 250 et 600 nm) peuvent être étudiées par spectroscopie de fluorescence (Figure 1).

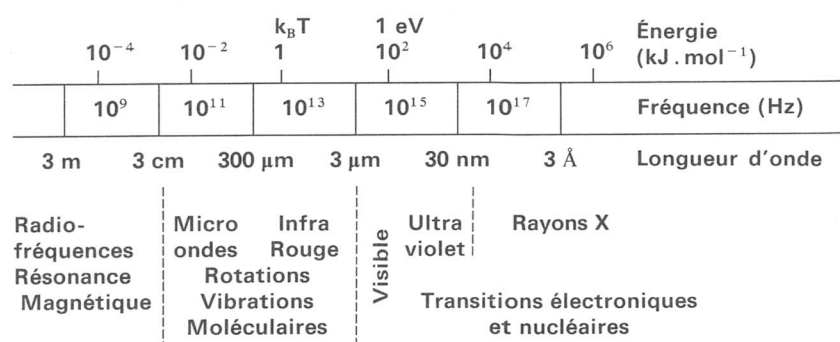


Figure 1: Echelle des énergies en spectroscopie. (Janin et Delepierre, 1994)

Un fluorophore est une molécule qui possède des niveaux électroniques suffisamment voisins de l'état fondamental pour que l'énergie fournie par la lumière visible ou le proche UV soit suffisante pour passer de l'état fondamental S_0 à un état excité S_1 .

Parmi les 20 acides aminés qui composent les protéines, trois sont des fluorophores. Il s'agit des résidus aromatiques [phénylalanine, tyrosine et tryptophane (Figure 2).

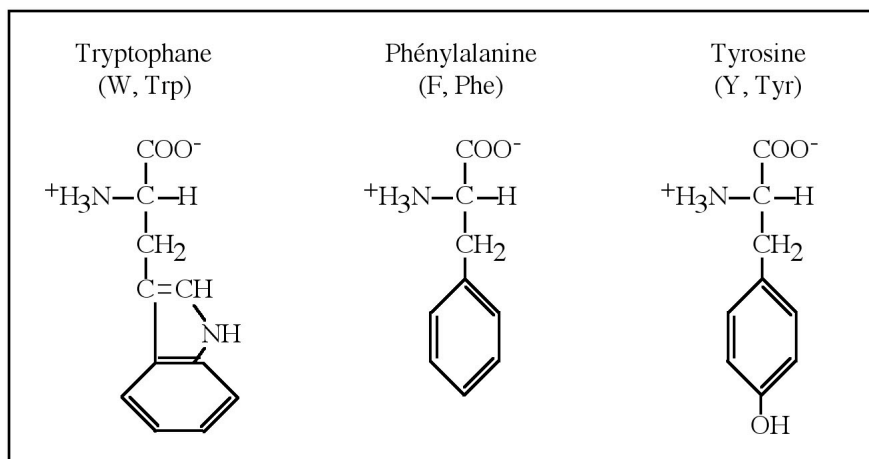


Figure 2: formule des trois acides aminés aromatiques.

Après excitation, les électrons de ces fluorophores retombent à leur état fondamental. Ce retour à l'état d'énergie le plus bas se fait en dispersant une partie de l'énergie absorbée sous forme de lumière, la fluorescence, et le reste de façon non radiative (Figure 3).

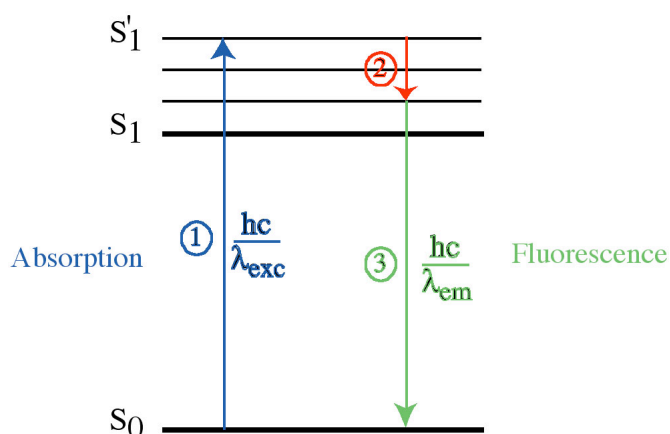


Figure 3: Schéma simplifié du principe d'émission de fluorescence. (1) Les électrons à l'état fondamental S_0 absorbent l'énergie des photons incidents et passent alors dans un état excité. Ils se situent alors sur une couche (ici S_1') du niveau électronique d'énergie supérieure (S_1). Puis les électrons retournent à l'état fondamental en libérant de l'énergie. (2) Une partie de cette énergie est dissipée par des processus non radiatifs. (3) Une autre partie est restituée sous forme de photons de fluorescence.

La fluorescence s'observe dans un spectrofluorimètre dont le schéma simplifié est présenté par la Figure 4. Une cuvette en quartz contenant l'échantillon est éclairé par un faisceau incident ou faisceau d'excitation de longueur d'onde λ_{exc} . Ce faisceau traverse la cuve (lumière transmise) et la fluorescence émise irradie dans toutes les directions. La fluorescence est détectée perpendiculairement au faisceau incident pour éviter que ce dernier gêne la mesure. Le monochromateur permet de disperser la lumière blanche et un faisceau

monochromatique est sélectionné par la fente de sortie. Plus cette fente est petite, plus l'intervalle de longueur d'onde sélectionné est étroit.

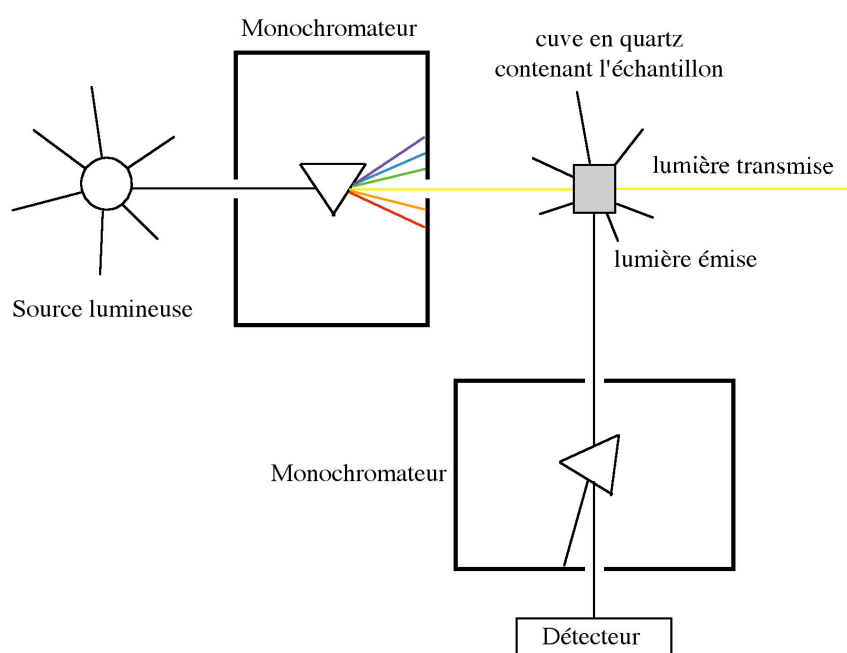


Figure 4: schéma de principe du spectrofluorimètre.

Pour un fluorophore donné, les spectres d'excitation d'une part et d'émission d'autre part ne sont pas superposables. En effet, les photons émis ont une énergie toujours plus faible que ceux absorbés (excitation), une partie de l'énergie étant dissipée par des processus non radiatifs. L'énergie E étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde λ ($E = hc/\lambda$), la longueur d'onde d'émission λ_{em} est donc toujours plus grande que la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} ($\lambda_{em} > \lambda_{exc}$).

Le rendement de fluorescence ou rendement quantique (Q) est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

$$Q = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

Les différents résidus aromatiques n'ont pas tous le même rendement (Figure 5).

	λ_{max} (nm)		Rendement quantique (Q)
	excitation	émission	
tryptophane	280	350	0,20
tyrosine	275	300	0,15
phénylalanine	260	280	0,05

Figure 5: caractéristiques de fluorescence des acides aminés aromatiques. Les valeurs données dans ce tableau sont approximatives car le maximum d'émission et le rendement quantique d'un fluorophore sont sensibles à l'environnement physique et chimique.

La longueur d'onde du maximum d'émission varie en fonction du milieu. Par exemple, sous excitation à 280 nm, le maximum d'émission du tryptophane dans l'eau est situé vers 350 nm. Il se déplace vers 340 nm dans la plupart des protéines à l'état natif, du fait de l'environnement apolaire du fluorophore à l'intérieur de la structure 3D. Le spectre d'émission ainsi que le rendement quantique changent en fonction de l'environnement physique et chimique du fluorophore.

C'est la fluorescence du tryptophane, plus que celle des autres aromatiques, qui est exploitée pour l'étude des protéines. En effet, le tryptophane possède un meilleur rendement quantique et surtout, son spectre et son intensité de fluorescence sont beaucoup plus sensibles à l'environnement local. De plus, les tryptophanes peuvent être excités à 290 ou 295 nm, ce qui permet d'éviter l'excitation simultanée des tyrosines (à 280 nm). En effet, si les tyrosines sont excitées, l'énergie des photons émis peut être transmise aux tryptophanes distants de moins de 100 Å (recouvrement des spectres d'émission des tyrosines et d'excitation des tryptophanes, Figure 6), ce qui perturbe l'émission des tryptophanes.

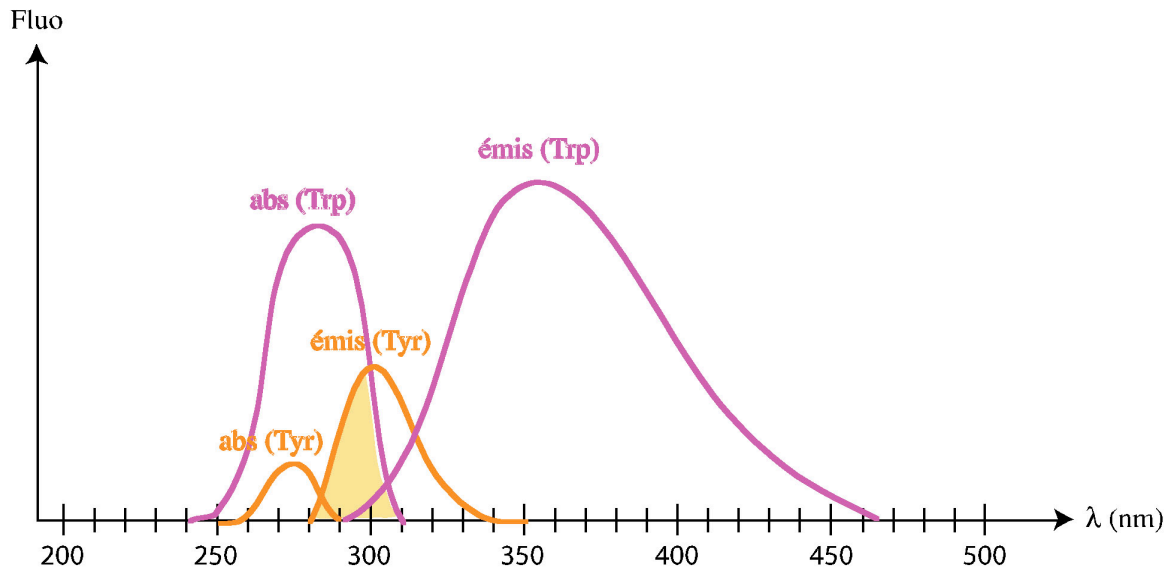


Figure 6: spectres d'absorbance et d'émission de la tyrosine (Tyr, en orange) et du tryptophane (Trp, en mauve). La surface jaune correspond à la zone de recouvrement du spectre d'émission (émis) de la tyrosine et du spectre d'absorption (abs) du tryptophane.

2- Etude de l'interaction protéine/protéine par fluorescence

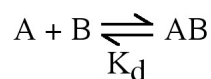
Deux paramètres sont couramment mesurés pour observer une interaction entre protéines : l'intensité émise (I) et la longueur d'onde d'émission (λ_{em}), paramètres qui sont sensibles à l'environnement. En effet, le spectre d'émission de fluorescence va varier en amplitude (intensité) et en position (déplacement de la longueur d'onde du maximum d'émission) en fonction de la polarité de l'environnement. Une interaction entre deux partenaires peut changer l'environnement d'un fluorophore soit par masquage, si celui-ci est dans la zone de contact, soit par un changement de conformation qui peut conduire à un enfouissement ou à une exposition au solvant aqueux. Lorsque le fluorophore passe d'un environnement polaire (en interaction avec le solvant) à apolaire (protégé du solvant), la longueur d'onde au maximum d'émission se décale vers les longueurs d'onde plus courtes.

Il est possible de déterminer par spectroscopie de fluorescence la constante de dissociation entre deux protéines en observant le décalage de longueur d'onde au maximum d'émission en faisant varier les conditions de l'interaction. Le principe de détermination de la constante de dissociation est présenté ci-dessous. Ce calcul est correct pour des variations de fluorescence intrinsèque du tryptophane d'une protéine lors de l'interaction avec un ligand dépourvu de résidus aromatiques dans sa séquence.

3- Détermination d'une constante de dissociation

La démonstration donnée ci-dessous s'applique à la fluorescence intrinsèque du tryptophane d'une protéine excitée à sa longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}). Cette fluorescence est suivie par déplacement de la longueur d'onde au maximum d'émission (λ), lors d'ajouts dans la solution d'un ligand dépourvu d'aromatiques. Les équations montrées ici seront utilisées pour déterminer la constante de dissociation entre un domaine SH3 (fluorescent) et un peptide dérivé de p47^{phox} sans résidu aromatique.

1- Définissons la constante de dissociation pour une interaction simple bi-moléculaire



où A est la protéine dont la fluorescence intrinsèque est suivie par son λ au cours de sa complexation avec le ligand B non fluorescent.

Le K_d est la constante de dissociation entre A et B

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

avec $[A]$, la concentration de la molécule A libre, $[B]$ la concentration du ligand B libre et $[AB]$, la concentration du complexe.

En introduisant $[A_t]$, la concentration de A total et $[B_t]$, la concentration de B total

$$[A_t] = [A] + [AB]$$

$$[B_t] = [B] + [AB]$$

l'équation du K_d devient

$$K_d = \frac{([A_t] - [AB])([B_t] - [AB])}{[AB]}$$

d'où l'équation du second degré

$$[AB]^2 - [AB]([A_t] + [B_t] + K_d) + [A_t][B_t] = 0 \quad (1)$$

2- Définissons la longueur d'onde d'émission de fluorescence au cours de la complexation

La longueur d'onde λ est une fonction linéaire des concentrations de l'espèce libre A et du complexe AB, d'où

$$\lambda[A_t] = \lambda_A[A] + \lambda_{AB}[AB]$$

Comme: $[A_t] = [A] + [AB]$

$$[B_t] = [B] + [AB]$$

l'équation devient

$$(\lambda - \lambda_A)[A_t] = [AB](\lambda_{AB} - \lambda_A)$$

Or $\lambda - \lambda_A = \lambda - \lambda_{max}$ et $\lambda_{max} - \lambda_{AB} = \lambda_{AB} - \lambda_A$

Il en découle

$$\lambda - \lambda_{max} = \lambda_{max} - \lambda_{AB} \frac{[AB]}{[A_t]} \quad (2)$$

3- Expression de la variation de longueur d'onde λ en fonction de la constante de dissociation K_d

L'équation (1) peut s'écrire de la façon suivante

$$\frac{[AB]^2}{[A_t]^2} - \frac{[AB]}{[A_t]}([A_t] + [B_t] + K_d) + \frac{[A_t][B_t]}{[A_t]^2} = 0$$

$$\text{Or } \frac{\lambda - \lambda_{max}}{\lambda_{max} - \lambda_{AB}} = \frac{[AB]}{[A_t]}$$

D'où l'équation du second degré suivante qui décrit la relation entre les données expérimentales (λ) et la constante d'affinité

$$\frac{(\lambda - \lambda_{max})^2}{(\lambda_{max} - \lambda_{AB})^2} - \frac{\lambda - \lambda_{max}}{\lambda_{max} - \lambda_{AB}} \left(1 + \frac{[B_t]}{[A_t]} + \frac{K_d}{[A_t]} \right) + \frac{[B_t]}{[A_t]} = 0 \quad (3)$$

La solution à cette équation est

$$F = F_{\max} \frac{[A_t] + [B_t] + K_d + \sqrt{([A_t] + [B_t] + K_d)^2 - 4[A_t][B_t]}}{2[A_t]} \quad (4)$$

Cette solution (4) de l'équation (3) a été introduite et traitée dans un programme d'ajustement de données par moindres carrés (Kaleidagraph-Abelbeck Software). Le programme recherche les valeurs optimales de la constante de dissociation K_d et de l'effet maximal F_{\max} permettant le meilleur ajustement des variations F , déterminées expérimentalement, en fonction de la concentration de ligand B total ajouté.

Certaines mesures ont été réalisées loin de l'équilibre car les interactions étudiées étaient de forte affinité. La constante de dissociation obtenue est alors une valeur approchée. Néanmoins, le programme parvient à trouver une solution cohérente à l'équation (3) même pour ce type d'expérience. De plus, les expériences sont reproductives même pour des affinités fortes.

Séquences des protéines recombinantes

His-C-SH3^{p67} □résidus 455 à 516 de p67^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MQLKKG SQVE	ALFSYEATQP	EDLEFQEGDI	ILVLSKVNEE 60
61	WLEGECKGKV	GIFPKVFVED	CAT			

C-SH3^{p67} □résidus 455 à 516 de p67^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	GSHMQLKKG	S QVEALFSYEA	TQPEDLEFQE	GDIILVLSKV	NEEWLEGECK	GKVGIFPKVF 60
61	VEDCAT					

His-SH3^{p40} □résidus 174 à 228 de p40^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	MSGSHHHHHH	SSGIEGRGRL	IKHMRAEALF	DFTGNSKLEL	NFKAGDVIFL	LSRINKDWLE 60
61	GTVRGATGIF	PLSFVKILK				

SH3^{p40} □résidus 174 à 228 de p40^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	GRLIKHMRAE	ALFDFTGNSK	LELNFKAGDV	IFLLSRINKD	WLEGTVRGAT	GIFPLSFVKI 60
61	LK					

His-p67-2SH3 □résidus 238 à 526 de p67^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MRALEGEAHR	VLFGFVPETK	EELQVMPGNI	VFVLKKGNDN 60
61	WATVMFNGQK	GLVPCNYLEP	VELRIHPQQQ	PQEESSPQSD	IPAPPSSKAP	GKPQLSPGQK 120
121	QKEEPKEVKL	SVPMPYTLKV	HYKYTVVMKT	QPGLPYSQVR	DMVSKKLELR	LEHTKLSYRP 180
181	RDSNELVPLS	EDSMKDAWGQ	VKNYCLTLWC	ENTVGDQGF	DEPKSEKAD	ANNQTTEPQL 240
241	KKGSQVEALF	SYEATQPEDL	EFQEGDIILV	LSKVNEEWLE	GECKGKVGIF	PKVFVEDCAT 300
301	TDLESTRREV					

His-p67-SH3NPB1 □résidus 238 à 428 de p67^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MEHRVLFVF	VPETKEELQV	MPGNIVFVLK	KGNDNWATVM 60
61	FNGQKGLVPC	NYLEPVELRI	HPQQQPQEE	SPQSDIPAPP	SSKAPGKPOL	SPGQKQKEEP 120
121	KEVKLSVPMP	YTLKVHYKY	VVMKTQPGL	YSQVRDMVSK	KLELRLEHTK	LSYRPRDSNE 180
181	LVPLSEDSMK	DAWGQVKNYC	LTLWCEN			

His-p40Cter □résidus 230 à 339 de p40^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	MSGSHHHHH	SGIEGRRLI	KHMEFPEED	PTNWLRCYY	EDTISTIKDI	AVEEDLSSTP 60
61	LLKDLELTR	REFQREDIAL	NYRDAEGLV	RLSDEDVAL	MVRQARGLPS	QKRLFPWKLH 120
121	ITQKDNRYV	NTMP				

p40-Cter □résidus 230 à 339 de p40^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	GRLIKHMEFP	EEDDPTNWL	CYYYEDTIST	IKDIAVEEDL	SSTPLLKDLL	ELTRREFQRE 60
61	DIALNYRDAE	GDLVRLSDE	DVALMVRQAR	GLPSQKRLFP	WKLHITQKDN	YRVYNTMP

His-PB1^{p67} □résidus 238 à 428 de p67^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MKLSVPMPYT	LKVHYKYTVV	MKTQPGLPYS	QVRDMVSKKL 60
61	ELRLEHTKLS	YRPRDSNELV	PLSEDSMKDA	WGQVKNYCLT	LWCEN	

PB1^{p67} □résidus 238 à 428 de p67^{phox}

1	11	21	31	41	51	
1	GSHMKLSVPM	PYTLKVHYKY	TVVMKTQPGL	PYSQVRDMVS	KKLELRLEHT	KLSYRPRDSN 60
61	ELVPLSEDSM	KDAWGQVKNY	CLTLWCEN			

Matériel & Méthodes

Amplification du fragment de gène d'intérêt

La PCR est réalisée avec le mélange suivant

- 100 µL de matrice à 100 ng/mL
- 2,5 µL d'oligonucléotide 1 à 100 ng/mL
- 2,5 µL d'oligonucléotide 2 à 100 ng/mL
- 20 µL de dNTP à 10 mM
- 10 µL de tampon de Pfu polymérase 10X (Stratagène)
- 2 µL de Pfu polymérase (Stratagène)
- qsp 100 µL avec de l'eau filtrée

Le protocole d'amplification de l'ADN est

- Dénaturation 94°C, 1 min
- 25 cycles {
 - Dénaturation 94°C, 45 s
 - Hybridation 59°C, 1 min
 - Elongation 72°C, 2 min
- Elongation 72°C, 10 min

Ligation de l'ADN et transformation des cellules compétentes

Le mélange de ligation est le suivant

- 1 μ L de vecteur préalablement digéré
- 3 μ L d'insert préalablement digéré
- 2 μ L de tampon de dilution de l'ADN (kit Rapid DNA ligation, Roche)
- 4 μ L d'eau stérile
- 10 μ L de tampon de dilution de la T4 DNA ligase (kit Rapid DNA ligation, Roche)
- 1 μ L de T4 DNA ligase (kit Rapid DNA ligation, Roche)

Le mélange est laissé 30 minutes à température ambiante

Transformation des cellules d'E. coli compétentes

1. 15 μ L de mélange de ligation sont ajoutés stérilement à 50 μ L de cellules compétentes
2. le mélange est laissé 30 minutes dans la glace
3. un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 90 secondes
4. 150 μ L de milieu riche LB sont ajoutés au mélange
5. le mélange est laissé à 37°C, à 220 rpm, pendant 1 heure
6. les cellules sont centrifugées puis reprises par 80 μ L de milieu LB
7. Le mélange est étalé sur boîte LB+agar contenant de l'ampicilline à 100 μ g/mL

Production des protéines recombinantes

1. Ensemencement de 5 mL de milieu riche LB à 100 µg/mL d'ampicilline avec une colonie sur boîte. La culture se fait sur la nuit à 37°C, 220 rpm.
2. Ensemencement à 1% de 4 L de milieu LB avec la préculture de nuit à 37°C, 220 rpm.
3. A une DO_{600nm} de 0,6, les cellules sont induites par 0,5 mM d'IPTG puis placées à 16°C, 220 rpm.
4. La production se réalise sur la nuit à 16°C, 220 rpm.
5. Centrifugation des cellules à 4°C.

Gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide

Les gels SDS-PAGE signalés à 17% d'acrylamide dans le manuscrit ont été réalisés selon le protocole de fabrication des gels à la tricine, gels performant pour séparer des protéines de petite masse moléculaire. Les quantités données ci-dessous sont pour 1 gel

gel de migration

200 μ L de gel buffer
0,600 μ L de glycérol
3,400 μ L d'acrylamide 30%
200 μ L de persulfate d'ammonium 10%
400 μ L de TEMED

gel de concentration

6200 μ L de gel buffer
1,5600 μ L d'eau
3200 μ L d'acrylamide 30%
200 μ L de persulfate d'ammonium 10%
200 μ L de TEMED

1000 μ L de gel buffer correspondent à

36,30 de TRIZMA Base
300 μ L de SDS 10%
pH ajusté à 8,5

Les protéines migrent dans du tampon LAEMMLI (Tris 250 μ M, SDS 0,1% p/v, glycine pH 8,3 250 μ M), à 220V, 600A, pendant 1h45.

Clonage de C-SH3^{p67} dans le vecteur pET15b

1. Amplification du gène codant pour les résidus 455 à 516 de p67^{phox} par PCR en utilisant la construction p67-2SH3 de p67^{phox} humain comme matrice.

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés□

Oligonucléotide sens□

5'-CGTCGACCATATGCAGCTTAAGAAAGGCAGCCAA-3'

Oligonucléotide anti-sens□

5'-GGTCGACGGATCCCTAAGTTGCGCAGTCTTCAACAAAA-3'

La PCR est réalisée selon le protocole donné précédemment.

2. Analyse sur gel d'agarose 2% du fragment d'ADN amplifié
3. Purification du fragment de PCR avec le kit «PCR purification kit□ de Qiagen.
4. Digestion du vecteur pET15b et de 20□L de mélange de PCR par les enzymes de restriction Nde□ et BamH□ (Roche) pendant 3h40 à 37°C.
5. Purification sur gel d'agarose du vecteur pET15b doublement digéré (kit de Qiagen).
6. Ligation du fragment de PCR dans le vecteur pET15b comme expliqué précédemment.
7. Transformation dans la souche MC1061 de *E. coli* selon le protocole donné précédemment.
8. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Midiprep (kit Qiagen).
9. Vérification du clonage par séquençage.

Expression et purification de C-SH3^{p67}

1. La production se réalise comme expliqué précédemment.
2. Reprise du culot bactérien par un tampon A \square 150 \square hM NaCl, 20 \square hM Hepes, pH \square ,5 contenant un cocktail complet d'anti-protéases sans EDTA (Roche).
3. Lyse des cellules par «French press».
4. Ultracentrifugation à 40000 \square pm dans un rotor Beckman 45Ti, pendant 1 heure, à 4°C.
5. Injection du surnageant sur une colonne de nickel (10 \square hL) (Ni-NTA, Qiagen) équilibrée en tampon A.
6. Lavage de la colonne par environ 100 \square hL de tampon 150 \square hM NaCl, 20 \square hM imidazole, 20 \square hM Hepes, pH \square ,5 (4% de tampon A et 96% de tampon B \square tampon B \square 150 \square hM NaCl, 500 \square hM imidazole, 20 \square hM Hepes, pH \square ,5).
7. Elution de la protéine par un gradient linéaire de 20 à 300 \square hM d'imidazole (de 4 à 60% de tampon B) sur 90 \square hL, à 1 \square hL/min.
8. Analyse des fractions sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide), avec, au préalable, précipitation au TCA \square 0% pour certains échantillons.
9. Rassemblement des fractions contenant His-p67-SH3C (\square _{héo 280 \square m} \square \square 258,4 \square M⁻¹.cm⁻¹) et concentration sur cellule Biomax 5000 \square Da (Millipore) au minimum jusqu'à 300 \square L.
10. Clivage de l'étiquette poly-histidine par la thrombine (Sigma) à raison de 0,025 \square unité d'enzyme pour 10 \square g de protéine. Réaction à 4°C sur la nuit.
11. Injection sur colonne de gel filtration Superdex 75 16/60 analytique (Pharmacia) équilibrée en tampon C \square 150 \square hM NaCl, 2 \square hM DTT, 20 \square hM Hepes, pH \square ,5.
12. Elution de C-SH3^{p67} par le tampon C à 0,5 \square hL/min.
13. Analyse sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide) des pics.
14. Rassemblement des fractions contenant C-SH3^{p67} (\square _{héo 280 \square m} \square \square 970 \square M⁻¹.cm⁻¹) et concentration sur membrane 5000 \square Da (Millipore).
15. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C.
16. Vérification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse MALDI.
17. Vérification de l'homogénéité de coupure par séquençage N-terminal.

Clonage de SH3^{p40} dans le vecteur pIVEX2.4

1. Amplification du gène codant pour les résidus 174 à 228 de p40^{phox} par PCR en utilisant l'ADNc de p40^{phox} comme matrice.
La PCR est réalisée selon le protocole donné précédemment.
2. Analyse sur gel d'agarose 2% du fragment d'ADN amplifié
3. Purification du fragment de PCR avec le kit «PCR purification kit» de Qiagen.
4. Clonage du fragment de PCR dans le vecteur pPCRscript Amp SK (Stratagène).
5. Digestion de pPCRscript contenant le fragment de PCR et du vecteur pIVEX2.4 (Roche) par les enzymes de restriction NdeI et XhoI.
6. Purification de l'insert sur gel d'agarose.
7. Ligation du fragment de PCR dans le vecteur pIVEX2.4 comme expliqué précédemment.
8. Transformation dans la souche MC1061 de *E. coli* selon le protocole donné précédemment.
9. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Midiprep (kit Qiagen).
10. Vérification du clonage par séquençage.

Expression et purification de SH3^{p40}

1. La production se réalise comme expliqué précédemment.
2. Reprise du culot par un tampon A 400mM NaCl , 40mM imidazole , 5% glycérol, 20mM Hepes , $\text{pH } 7,5$.
3. Lyse des cellules par sonication \square 1 minute à 40% d'amplitude, pulsation de 2 secondes avec pause de 10 secondes \square temps total de 11 minutes.
4. Ultracentrifugation à 40000rpm dans un rotor Beckman 70Ti, pendant 40 minutes, à 4°C .
5. Injection du surnageant sur une colonne de nickel (10mL) (Probond, Invitrogen) équilibrée en tampon 400mM NaCl , 40mM imidazole , 20mM Hepes , $\text{pH } 7,5$.
6. Lavage de la colonne par environ 100mL de tampon 400mM NaCl , 40mM imidazole , 20mM Hepes , $\text{pH } 7,5$.
7. Elution de la protéine par un gradient linéaire de 40 à 300mM d'imidazole sur 50mL , à $2\text{mL}/\text{min}$.
8. Analyse des fractions sur gel SDS-PAGE (15% d'acrylamide).
9. Rassemblement des fractions contenant His-p40-SH3 ($\text{OD}_{280\text{nm}} \approx 690\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et concentration sur cellule Diaflo avec membrane YM3 (Millipore).
10. Clivage de l'étiquette poly-histidine par le facteur Xa (Novagen) à raison de $0,024$ unité d'enzyme pour 10mg de protéine. Réaction à 4°C , sur la nuit, en présence de $2,5\text{mM CaCl}_2$.
11. Injection sur colonne de gel filtration Superdex 75 16/60 analytique (Pharmacia) équilibrée en tampon C 150mM NaCl , 20mM Hepes , $\text{pH } 7,5$.
12. Elution de p40-SH3 ($\text{OD}_{280\text{nm}} \approx 690\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) par le tampon C à $1\text{mL}/\text{mL}$.
13. Analyse sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide) des pics.
14. Rassemblement des fractions contenant p67-SH3C et concentration sur membrane 3000Da (Millipore).
15. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C .
16. Vérification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse MALDI.

Clonage de p67-2SH3 dans le vecteur pET15b

1. Amplification du gène codant pour les résidus 238 à 526 de p67^{phox} par PCR en utilisant comme matrice le vecteur pBluebac comportant l'ADNc de p67^{phox} humain.

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés□

Oligonucléotide sens□

5'-TGGTACCGGATATCCATATGAGGGCTCTGGAAGGGGAGG-3'

Oligonucléotide anti-sens□

5'-AGGCCTAGATCTGTCGACCTAGACTTCTCTCCGAGTGCT-3'

La PCR est réalisée selon le protocole donné précédemment.

2. Analyse sur gel d'agarose 1% du fragment d'ADN amplifié
3. Purification du fragment de PCR avec le kit «PCR purification kit□ de Qiagen.
4. Digestion de 20□L du mélange de PCR par les enzymes de restriction Nde□ et Bgl□ (Roche).
5. Digestion par Nde□ et BamH□ puis purification sur gel d'agarose du vecteur pET15b (kit de Qiagen).
6. Ligation du fragment de PCR dans le vecteur pET15b comme expliqué précédemment.
7. Transformation dans la souche MC1061 de *E. coli* selon le protocole donné précédemment.
8. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Midiprep (kit Qiagen).
9. Vérification du clonage par séquençage.
10. Puis une nouvelle transformation est réalisée dans la souche JM109 d'*Escherichia coli* pour la production de la protéine

Expression et purification de p67-2SH3

1. La production se réalise comme expliqué précédemment.
2. Reprise du culot par un tampon A 100mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ contenant un cocktail complet d'anti-protéases sans EDTA (Roche) et de la pepstatine ($0,7\text{g/mL}$ dilué dans du méthanol).
3. Lyse des cellules par sonication.
4. Ultracentrifugation à 40000rpm dans un rotor Beckman 45Ti, pendant 1 heure, à 4°C .
5. Injection du surnageant sur une colonne de nickel (10mL) (Ni-NTA, Qiagen) équilibrée par trois volumes de colonne de tampon A.
6. Lavage de la colonne par environ 100mL de tampon 30mM NaCl, 60mM imidazole, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ (88% de tampon B et 12% de tampon C) tampon B 30mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ tampon C 30mM NaCl, 500mM imidazole, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$.
7. Elution de la protéine par un gradient linéaire de 60 à 500mM d'imidazole (de 12 à 100% de tampon C) sur 70mL , à $1\text{mL}/\text{min}$.
8. Analyse sur gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide) des fractions rassemblées qui composent le pic de $\text{DO}_{280\text{nm}}$ lors du gradient d'imidazole.
9. Injection sur colonne échangeuse d'anions UNOQ1 (BioRad) équilibrée avec 10mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$.
10. Lavage de la colonne par 10mL de tampon d'équilibration puis élution de His-p67-2SH3 par un gradient de 30 à 200mM NaCl.
11. Analyse sur gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide) des pics.
12. Rassemblement des fractions contenant His-p67-2SH3 ($\epsilon_{\text{héo } 280\text{nm}} = 34985,5\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et concentration sur membrane 5000Da (Millipore).
13. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C .
14. Vérification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse electrospray.

Clonage de p67-SH3NPB1 dans le vecteur pET15b

1. Amplification du gène codant pour les résidus 238 à 428 de p67^{phox} par PCR en utilisant comme matrice le vecteur pBluebac comportant l'ADNc de p67^{phox} humain.

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés□

Oligonucléotide sens□

5'-TGGTACCGGATATCCATATGGAGGCTCACCGTGTGCTATTT-3'

Oligonucléotide anti-sens□

5'-AGGCCTAGATCTGTCGACCTAGTTCTCACACCACAGAGTCAG-3'

La PCR est réalisée selon le protocole donné précédemment.

2. Analyse sur gel d'agarose 2% du fragment d'ADN amplifié
3. Purification du fragment de PCR avec le kit «PCR purification□ de Qiagen.
4. Ligation du fragment de PCR dans le vecteur commercial intermédiaire pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) qui permet de s'affranchir de la digestion du fragment d'ADN amplifié.
5. Transformation dans les cellules compétentes commerciales One Shot d'*Escherichia coli* (choc thermique à 42°C).
6. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Miniprep (kit Qiagen). L'ADN est repris par 50□L de tampon EB.
7. Vérification de la présence de l'insert en digérant 2□L de la miniprep (ADN plasmidique) par les enzymes Nde□ et Bgl□.
8. Digestion de l'ADN plasmidique pCR4Blunt-TOPO contenant l'insert par Nde□ et Bgl□ (20□L de la miniprep) pour extraire l'insert.
9. Purification de l'insert avec le kit «Quick Gel Extraction□ de Qiagen.
10. Digestion du vecteur pET15b par les enzymes de restriction Nde□ et BamH□ (Roche).
11. Purification sur gel d'agarose du vecteur pET15b doublement digéré (kit de Qiagen).
12. Ligation du fragment d'intérêt dans le vecteur pET15b comme expliqué précédemment.
13. Vérification de la présence de l'insert en digérant l'ADN plasmidique amplifié et purifié par BamH□ (site unique de l'insert) et Hind□ (site unique du vecteur).

14. Transformation dans la souche MC1061 de *E. coli* selon le protocole donné précédemment.
15. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Midiprep (kit Qiagen).
16. Vérification du clonage par séquençage.
17. Puis une nouvelle transformation est réalisée dans la souche JM109 d'*Escherichia coli* pour la production de la protéine (protocole donné précédemment).

Expression et purification de p67-SH3NPB1

1. La production se réalise comme expliqué précédemment.
2. Reprise du culot par un tampon 100mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ contenant un cocktail complet d'anti-protéases sans EDTA (Roche) et de la pepstatine ($0,7\text{g/mL}$ dilué dans du méthanol).
3. Lyse des cellules par «French press».
4. Ultracentrifugation à 40000rpm dans un rotor Beckman 45Ti, pendant 1 heure, à 4°C .
5. Injection du surnageant sur une colonne de nickel (10mL) (Ni-NTA, Qiagen) équilibrée par trois volumes de colonne de tampon de lyse.
6. Lavage de la colonne par environ 100mL de tampon 30mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ (=tampon A).
7. Elution de la protéine par un gradient linéaire de 0 à 300mM d'imidazole (de 0 à 60% de tampon B 30mM NaCl, 500mM Imidazole, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$) sur 70mL , à 1mL/min .
8. Analyse sur gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide) des fractions correspondant aux pics.
9. Rassemblement des fractions contenant His-p67-SH3NPB1 et concentration sur centriprep 10kDa (Millipore).
10. Injection sur colonne gel filtration Superdex 200 Hiload 16/60 (Pharmacia) équilibrée en 30mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$.
11. Analyse sur gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide) des pics.
12. Rassemblement des fractions contenant His-p67-SH3NPB1 ($\epsilon_{\text{hé0 } 280\text{nm}}=23539\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et concentration sur membrane 5000Da (Millipore).
13. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C .
14. Vérification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse electrospray.

Clonage de p40-Cter dans le vecteur pIVEX2.4b

1. Amplification du gène codant pour les résidus 230 à 339 de p40^{phox} par PCR en utilisant comme matrice l'ADNc de p40^{phox} humain.
La PCR est réalisée selon le protocole donné précédemment.
2. Analyse sur gel d'agarose 1% du fragment d'ADN amplifié
3. Purification du fragment de PCR avec le kit «PCR purification kit» de Qiagen.
4. Ligation du fragment de PCR dans le vecteur pIVEX2.4 comme expliqué précédemment.
5. Transformation dans la souche MC1061 de *E. coli* selon le protocole donné précédemment.
6. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Midiprep (kit Qiagen).
7. Vérification du clonage par séquençage.
8. Puis une nouvelle transformation est réalisée dans la souche C41(DE3) d'*Escherichia coli* pour la production de la protéine (selon le protocole donné précédemment).

Expression et purification de p40-Cter

1. La production se réalise comme expliqué précédemment.
2. Reprise du culot par un tampon 150mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ contenant un cocktail complet d'anti-protéases sans EDTA (Roche).
3. Lyse des cellules par «French press».
4. Ajout d'une pointe spatule de DNase 20 minutes dans la glace
5. Ultracentrifugation à 40000rpm dans un rotor Beckman 45Ti, pendant 1 heure, à 4°C .
6. Injection du surnageant sur une colonne de nickel (10mL) (Ni-NTA, Qiagen) équilibrée avec le tampon de lyse.
7. Lavage de la colonne par environ 100mL de tampon 150mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$ (=tampon A).
8. Elution de la protéine par un gradient linéaire de 100mL de 0 à 300mM d'imidazole (de 0 à 100% de tampon B 150mM NaCl, 300mM Imidazole, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$), à $1\text{mL}/\text{min}$.
9. Analyse sur gel SDS-PAGE (15% d'acrylamide) des fractions correspondant aux pics.
10. Rassemblement des fractions contenant His-p40-Cter ($\lambda_{\text{héo } 280\text{nm}} \approx 9060\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).
11. Dilution de l'échantillon pour que les concentrations en NaCl et imidazole soient inférieures à 250mM , concentrations qui inhibent l'activité du facteur Xa.
12. Clivage de l'étiquette poly-histidine de His-p40-Cter par 0,1 unité de facteur Xa (Novagen) pour $25\mu\text{g}$ de protéine. La coupure se fait sur la nuit à 4°C et avec agitation.
13. Vérification de la coupure de l'étiquette poly-histidine de p40-Cter sur gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide.
14. Concentration de p40-Cter sur cellule Diaflo avec une membrane possédant un seuil de coupure de 10kDa (Millipore).
15. Injection sur colonne gel filtration Superdex 75 Hiload 16/60 (Pharmacia) équilibrée en 30mM NaCl, 50mM Hepes, $\text{pH}7,5$.
16. Analyse sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide) des pics.
17. Rassemblement des fractions contenant p40-Cter ($\lambda_{\text{héo } 280\text{nm}} \approx 9060\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et concentration sur membrane 10kDa (Millipore).
18. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C .
19. Vérification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse electrospray.

Formation et purification du complexe His-p67-SH3NPB1/p40-Cter

1. Formation du complexe p40-Cter/His-p67-SH3NPB1 dans un rapport 2:1, soit 1,08 μ mol de p40-Cter et 0,54 μ mol de His-p67-SH3NPB1. Le volume du mélange est de 1,5 μ L.
2. Injection du mélange sur colonne gel filtration Superdex 200 Hiload 16/60 (Pharmacia) équilibrée en 100 μ M NaCl, 50 μ M Hepes, 2 μ M DTT, pH 8.
3. Analyse sur gel SDS-PAGE 15% des fractions correspondant au pic de DO_{280nm} obtenu.
4. Rassemblement des fractions contenant le complexe et concentration sur membrane de 10 μ Da (Millipore).
5. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C.
6. La stœchiométrie du complexe formé entre p40-Cter et His-p67-SH3NPB1 est déterminée par une analyse en acides aminés.

Clonage de PB1^{p67} dans le vecteur pET15b

1. Amplification du gène codant pour les résidus 238 à 428 de p67^{phox} par PCR en utilisant comme matrice le vecteur pBluebac comportant l'ADNc de p67^{phox} humain.

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés□

Oligonucléotide sens□

5'-TGGTACCGGATATCCATATGAAGCTCAGTGTCCCATGCCC -3'

Oligonucléotide anti-sens□

5'-AGGCCTAGATCTGTCGACCTAGTTCTCACACCACAGAGTCAG -3'

La PCR est réalisée selon le protocole donné précédemment.

2. Analyse sur gel d'agarose 2% du fragment d'ADN amplifié
3. Purification du fragment de PCR avec le kit «PCR purification□ de Qiagen.
4. Ligation du fragment de PCR dans le vecteur commercial intermédiaire pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) qui permet de s'affranchir de la digestion du fragment d'ADN amplifié.
5. Transformation dans les cellules compétentes commerciales One Shot d'*Escherichia coli* (choc thermique à 42°C).
6. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Miniprep (kit Qiagen). L'ADN plasmidique est élué avec 50□L de tampon EB.
7. Vérification de la présence de l'insert par digestion de 2□L de miniprep (ADN plasmidique) par les enzymes Nde□ et Bgl□.
8. Digestion de l'ADN plasmidique pCR4Blunt-TOPO contenant l'insert par Nde□ et Bgl□ (20□L de miniprep) pour extraire l'insert.
9. Purification de l'insert avec le kit «Quick Gel Extraction□ de Qiagen.
10. Digestion du vecteur pET15b par les enzymes de restriction Nde□ et BamH□ (Roche).
11. Purification sur gel d'agarose du vecteur pET15b doublement digéré (kit de Qiagen).
12. Ligation du fragment d'intérêt dans le vecteur pET15b comme expliqué précédemment.
13. Vérification de la présence de l'insert en digérant l'ADN plasmidique amplifié et purifié par Sma□ (site unique de l'insert) et EcoR□ (site unique du vecteur).
14. Transformation dans la souche MC1061 de *E. coli* selon le protocole donné précédemment.

15. Amplification et purification de l'ADN plasmidique par Midiprep (kit Qiagen).
16. Vérification du clonage par séquençage□il y a une délétion d'un nucléotide qui décale la phase de lecture.

Pour remédier à cette mutation, nous avons fait de la mutagenèse dirigée sur le plasmide pET15b contenant l'insert, avec l'oligonucléotide suivant□

5'- TGA CTCTGTGGTGTG **A** GAACTAGGTCGACGGATCCGGCTGCTA-3'

correction de la mutation

Nous avons suivi le protocole du kit de mutagenèse dirigée de Stratagene.

La mutagenèse est vérifiée par coupure avec l'enzyme SalI dont le site est introduit par l'oligonucléotide de mutagenèse.

17. Nouvelle vérification du clonage par séquençage.
18. Puis une nouvelle transformation dans la souche C41(DE3) d'*Escherichia coli* pour la production de la protéine (selon le protocole donné précédemment).

Expression et purification de PB1^{p67}

1. La production se réalise comme expliqué précédemment.
2. Reprise du culot par un tampon de lyse \square 100 \square hM NaCl, 50 \square hM Hepes, pH \square ,5 contenant un cocktail complet d'anti-protéases sans EDTA (Roche).
3. Lyse des cellules par «French press».
4. Ajout d'une pointe spatule de DNase \square 20 minutes dans la glace
5. Ultracentrifugation à 40000 \square pm dans un rotor Beckman 45Ti, pendant 1 heure, à 4°C.
6. Injection du surnageant sur une colonne de nickel (10 \square hL) (Ni-NTA, Qiagen) équilibrée avec le tampon de lyse.
7. Lavage de la colonne par environ 100 \square hL de tampon 100 \square hM NaCl, 50 \square hM Hepes, pH \square ,5 (=tampon A).
8. Elution de la protéine par un gradient linéaire de 100 \square hL de 0 à 350 \square hM d'imidazole (de 0 à 70% de tampon B \square 100 \square hM NaCl, 500 \square hM Imidazole, 50 \square hM Hepes, pH \square ,5), à 1 \square hL/min.
9. Analyse sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide) des fractions correspondant aux pics.
10. Rassemblement des fractions contenant His-PB1^{p67} et concentration sur membrane de 5 \square Da (Millipore).
11. Injection sur colonne gel filtration Superdex 75 Hiload 16/60 (Pharmacia) équilibrée en 100 \square hM NaCl, 2 \square hM DTT, 50 \square hM Hepes, pH \square .5.
12. Analyse sur gel SDS-PAGE (17% d'acrylamide) des pics.
13. Rassemblement des fractions contenant His-PB1^{p67} et concentration sur membrane 5 \square Da (Millipore).
14. Aliquots congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C.
15. Vérification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse electrospray.
16. Pour les essais de cristallisation de PB1^{p67} par le robot (Tecan), l'étiquette poly-histidine a été clivée en fin de purification \square 0,025 unité de thrombine (Sigma) est utilisée pour 10 \square g de protéine. La réaction se fait sur la nuit, à 4°C et sous agitation. Puis, le mélange de réaction est injecté sur colonne gel filtration Superdex 200 Hiload 16/60 (Pharmacia) équilibrée en 100 \square hM NaCl, 2 \square hM DTT, 50 \square hM Hepes, pH 7,5. Les fractions sont testées sur gel SDS-PAGE puis concentrées. La masse moléculaire est vérifiée par spectrométrie de masse electrospray.

Cristallogenèse

Les essais manuels de cristallogenèse sont réalisés en utilisant le principe de la diffusion en phase vapeur avec la technique de la goutte suspendue dans des boîtes 24 puits. Le plus souvent, les gouttes sont composées de 200L de solution protéique plus 200L de réservoir. Les boîtes sont ensuite stockées à 20°C ou à 8°C.

Les essais de cristallisation par le robot Tecan, disponible à l'institut, utilisent le principe de la diffusion en phase vapeur mais avec la technique de la goutte assise. Les gouttes sont réalisées sur des plaques de 96 puits et sont composées de 100L de solution protéique + 100L de réservoir. Les boîtes sont ensuite stockées à 20°C.

Les solutions commerciales de cristallisation utilisées sont de la marque Hampton. Les kits et la composition des différentes conditions sont disponibles sur le site internet de Hampton <http://www.hamptonresearch.com>.

Protéolyse ménagée par la trypsine

Le rapport massique $\frac{\text{trypsine}}{\text{protéine}} = \frac{1}{60}$.

La trypsine est à 0,1 mg/mL dans 30 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH7,5.

Environ 56 µg de PB1^{p67} et 42 µg de p40-Cter sont digérés. A t=0, 15 min, 30 min et 60 min, 6 µg de protéines sont prélevés (soit 1,4 µL de mélange de réaction pour PB1^{p67} et 2,4 µL de mélange de réaction pour p40-Cter).

Les échantillons migrent ensuite sur gel SDS-PAGE à 17% d'acrylamide.

Puis les protéines séparées sur gel SDS-PAGE migrent sur membrane PVDF. La migration se fait dans un tampon 50% méthanol, 50% CAPS 100 mM, pH11 (=tampon de transfert), sur la nuit, à 4°C (V=15 volt et I=100 mA).

Avant transfert * les membranes de PVDF sont plongées dans

- le méthanol (5 sec)
- le tampon de transfert (30 min)

* les 2 tampons mousse, les 2 papiers filtres et le gel sont mis 30 min dans le tampon de transfert.

Le schéma de montage est le suivant de la cathode à l'anode

- 1 tampon mousse
- 1 filtre papier
- le gel
- la membrane de PVDF
- le filtre papier
- le tampon mousse

Après transfert, les membranes PVDF sont plongées dans

- l'eau distillée (rinçage)
- le méthanol pur (1 min)
- le colorant (0,1% de bleu de coomassie R, 40% de méthanol et 1% d'acide acétique) (1 min)
- le décolorant (méthanol 50%) (1 à 5 min)
- l'eau (rinçage abondant)

Les membranes PVDF sont séchées.

Les bandes sont ensuite découpées et la séquence des protéines est déterminée par séquençage N-terminal.

Production de protéines marquées ^{15}N et/ou ^{13}C

1. Préculture en milieu riche LB (500 mL) (contenant 100 µg/mL d'ampicilline) ensemencée à partir d'une colonie ou d'un stock glycérol 20%. La nuit à 37°C, 220 rpm.
2. Préparation du milieu pauvre M9 pour marquer les protéines en ^{15}N et/ou en ^{13}C

Pour 1 litre de culture

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	10g
KH_2PO_4	3g
NaCl	0,5g
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	1g

- A compléter à 1 litre et ajuster le pH à 7,2

- Le milieu est autoclavé.

- Après autoclave, un mélange ci-dessous doit être ajouté pour 1 litre de milieu M9

glucose marqué ^{13}C ou non	2g
MgSO_4	1 mL à 1M
CaCl_2	0,1 mL à 1M
Thiamine	2 mL à 1 µg/mL
Ampicilline	1 mL à 100 µg/mL

Ce mélange est dilué avec 30 mL d'eau environ, puis filtré à 0,2 µm. Il est ajouté stérilement au litre de milieu M9 autoclavé.

3. Préculture en milieu M9

Prélever 40 mL du litre de milieu M9. Les ensemencer avec 400 µL de préculture LB et laisser à 37°C, sur la nuit, 220 rpm.

4. Culture en milieu M9

Ensemencer le litre de milieu M9 avec la préculture M9 entière. Laisser à 37°C, 220 rpm jusqu'à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,6. Puis induire les cellules avec 0,5 mM d'IPTG et placer la culture sur la nuit à 16°C.

5. La purification des protéines est réalisée avec les mêmes protocoles que ceux utilisés pour la protéine non marquée.

Formation du complexe PB1^{p67}/p40-Cter → détermination de la stoechiométrie

1- Une colonne gel filtration Superdex 75 analytique (240 mL) est étalonnée avec un mélange de protéines de masse moléculaire connue :

- 1 mg de Bleu dextran (2000 kDa) → détermination du volume mort (V_0)
- 2 mg de BSA (Bovin Serum Albumin) (68 kDa)
- 2 mg de Déoxyribonucléase (31 kDa)
- 30 µL de solution de Cytochrome c (14 kDa)
- 1 mg de FAD (Flavin Adénine Dinucléotide) (829,5 Da) → détermination du volume total (V_t)

L'ensemble des protéines est dissout dans un volume total de 250 µL de tampon 100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,5.

Le mélange est injecté sur la colonne équilibré par 2 volumes de colonne de tampon 100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,5.

Pour chaque protéine, le volume d'éluion V_e est mesuré et le K_{av} est calculé :

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

La courbe d'étalonnage log (masse moléculaire) en fonction du K_{av} est tracée.

2- Un échantillon de chaque protéine (150 µL de PB1^{p67} à 145 µM et 220 µL de p40-Cter à 350 µM) et un mélange PB1^{p67}/p40-Cter formé dans les proportions 1,5 (100 µL de p40-Cter à 350 µM et 40 µL à 1,3 µM) sont injectés sur colonne gel filtration Superdex 75 analytique (Pharmacia) équilibrée avec un tampon 100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,5.

Le volume d'éluion est mesuré pour chaque protéine seule et en complexe.

Les K_{av} sont calculés et la masse moléculaire correspondante en est déduite.

3- Un échantillon (~1 µg) des fractions correspondant au pic de DO_{280nm} est déposé sur gel SDS-PAGE 17% d'acrylamide.

Préparation des échantillons protéiques pour les expériences RMN

Préparation des échantillons de PB1^{p67} :

La protéine p67-PB1 est en solution dans un tampon 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 50 mM Hepes, pH 7,5 suite à la purification décrite précédemment.

Les tubes RMN de PB1^{p67} marqué ¹⁵N ou ¹⁵N/¹³C contiennent

420 μ L d'échantillon protéique

30 μ L de D₂O

Le tube est mis sous argon, pour éviter l'oxydation de la protéine, puis il est scellé à la flamme.

La concentration finale en protéine est de 1,2 μ M pour ¹⁵N-PB1^{p67} et 1,1 μ M pour ¹⁵N/¹³C-PB1^{p67}.

Préparations des échantillons de p40-Cter

La protéine p40-Cter est en solution dans un tampon 30 mM NaCl, 2 mM DTT, 50 mM Hepes, pH 7,5, suite à la purification décrite précédemment.

Etant donnée l'instabilité de p40-Cter en solution, la protéine est concentrée au maximum à 5 mg/mL soit 350 μ M. Les échantillons doivent également être re préparés souvent (toutes les 48h), ce qui consomme beaucoup de protéine. Pour limiter la consommation trop rapide des stocks de p40-Cter, les tubes RMN utilisés sont des tubes SHIGEMI qui permettent d'utiliser des volumes plus petits (300 μ L).

Les tubes RMN SHIGEMI de p40-Cter marqué ¹⁵N ou ¹⁵N/¹³C contiennent :

300 μ L d'échantillon protéique

30 μ L de D₂O

La concentration finale de ¹⁵N-p40-Cter ou ¹⁵N/¹³C-p40-Cter est au maximum de 350 μ M.

Préparation des complexes PB1^{p67}/p40-Cter étude RMN

Pour l'étude des domaines PB1 en complexe, les mélanges entre PB1^{p67} marqué ¹⁵N/¹³C et p40-Cter non marqué et *vice versa* ont été formés dans les proportions 1:2. Les mélanges sont préparés dans un tampon contenant entre 30 et 100 μ M NaCl, 50 μ M Hepes, pH7,5.

Les tubes RMN des complexes contiennent□

420□L d'échantillon protéique

30□L de D₂O

Le tube est scellé à la flamme.

La concentration finale de la protéine marquée dans le complexe est de 200 à 300□M pour les deux complexes.

Echanges H/D

- 1- Un échantillon de protéines PB1^{p67} et p40-Cter marquées ¹⁵N, en solution dans leur tampon respectif, sont lyophilisés sur la nuit.
- 2- Les protéines sont ensuite remises en solution dans du D₂O à 99%.
¹⁵N- PB1^{p67} est à une concentration finale de 130 μM
¹⁵N-p40-Cter est à une concentration finale de 220 μM
- 3- Les échantillons sont ensuite placés immédiatement dans le spectromètre Varian INOVA 600, à 25°C.
Un spectre 2D-HSQC (¹H, ¹⁵N) est réalisé à t₀, t₂₀ minutes et t₂₄ heures.

Enregistrement des spectres RMN pour l'attribution

Toutes les expériences RMN ont été enregistrées sur spectromètre Varian INOVA 600 et INOVA 800. Ces deux appareils sont équipés d'une sonde triple résonance ^1H , ^{15}N , ^{13}C .

Les expériences sont réalisées à température fixe $=25^\circ\text{C}$.

Le traitement des données et le « pic picking » sont réalisés en utilisant le programme Felix version 2000 (Accelrys).

Mobilité du squelette de PB1^{p67}

Les expériences $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE ont été enregistrées sur le spectromètre INOVA 600, à 25°C.

La protéine PB1^{p67} seule, marquée $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, est à $\sim 0,5 \mu\text{M}$.

Le complexe est formé avec la protéine p40-Cter non marquée avec un rapport molaire PB1^{p67}/p40-Cter $\approx 1,2$. La protéine $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ est alors concentrée à $\sim 0,2 \mu\text{M}$.

Les expériences ont été doublées.

Références bibliographiques

A

Abbas AK, Lichtman AH: **Cellular and Molecular Immunology**, fifth edition, Saunders edn; 2003.

Abo A, Boyhan A, West I, Thrasher AJ, Segal AW: **Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245.** *J Biol Chem* 1992, **267**(24):16767-16770.

Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW: **Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane.** *Biochem J* 1994, **298 Pt 3**:585-591.

Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H: **Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase.** *J Biol Chem* 1999, **274**(47):33644-33653.

Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H: **Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(8):4474-4479.

B

Babior BM: **NADPH Oxidase: An Update.** *Blood* 1999, **93**(5):1464-1476.

Babior BM: **NADPH oxidase.** *Curr Opin Immunol* 2004, **16**(1):42-47.

Bersch B, Rossy E, Coves J, Brutscher B: **Optimized set of two-dimensional experiments for fast sequential assignment, secondary structure determination, and backbone fold validation of ¹³C/¹⁵N-labelled proteins.** *J Biomol NMR* 2003, **27**(1):57-67.

Bokoch GM: **Chemoattractant signaling and leukocyte activation.** *Blood* 1995, **86**(5):1649-1660.

Bokoch GM, Diebold BA: **Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase.** *Blood* 2002, **100**(8):2692-2696.

Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA: **Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation.** *J Cell Biol* 1983, **97**(1):52-61.

Boulay F, Naik N, Giannini E, Tardif M, Brouchon L: **Phagocyte chemoattractant receptors.** *Ann N Y Acad Sci* 1997, **832**:69-84.

Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, Butler PJ, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT *et al*: **The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate.** *Mol Cell* 2001, **8**(4):829-839.

Brown GE, Stewart MQ, Liu H, Ha VL, Yaffe MB: **A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase.** *Mol Cell* 2003, **11**(1):35-47.

Brutscher B, Simorre JP, Caffrey MS, Marion D: **Design of a complete set of two-dimensional triple-resonance experiments for assigning labeled proteins.** *J Magn Reson* 1994, **B105**:77-82.

Brutscher B: **DEPT spectral editing in HCONH-type experiments. Application to fast protein backbone and side chain assignment.** *J Magn Reson* 2004, **167**(2):178-184.

C

Callis PR: **La and Lb Transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins.** In: *Methods in enzymology: fluorescence spectroscopy*. Edited by Press A, vol. 278: Ludwig Brand and Michael L. Johnson; 1997: 113-115.

Cornilescu G, Delaglio F, Bax A: **Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology.** *J Biomol NMR* 1999, **13**(3):289-302.

Cross AR: **p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558).** *Biochem J* 2000, **349**(Pt 1):113-117.

D

Dang P M, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Perianin A: **Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst.** *J Immunol* 2001, **166**(2):1206-13.

Davis AR, Mascolo PL, Bunger PL, Sipes KM, Quinn MT: **Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences.** *J Leukoc Biol* 1998, **64**(1):114-123.

de Mendez I, Homayounpour N, Leto TL: **Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(4):2177-2185.

DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT: **Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries.** *Proc Natl Acad Sci U S A*

Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J: **The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils.** *J Immunol* 2000, **165**(9):5238-5244.

Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J: **TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.** *J Immunol* 2003, **171**(8):4392-8.

Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A: **Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity.** *Science* 1994, **265**(5171):531-533.

Dorseuil O, Reibel L, Bokoch GM, Camonis J, Gacon G: **The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1.** *J Biol Chem* 1996, **271**(1):83-88.

Dusi S, Donini M, Rossi F: **Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox.** *Biochem J* 1996, **314**(Pt 2):409-412.

E

Eftink MR: **Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions.** In: *Methods in enzymology: fluorescence spectroscopy.* Edited by Press A, vol. 278: Ludwig Brand and Michael L. Johnson; 1997: 221-224.

El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM: **Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase.** *J Biol Chem* 1996, **271**(11):6374-6378.

Etienne-Manneville S, Hall A: **Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**(1):67-72.

F

Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ: **The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis.** *J Clin Invest* 1995, **96**(3):1499-1505.

Finan P, Shimizu Y, Gout I, Hsuan J, Truong O, Butcher C, Bennett P, Waterfield MD, Kellie S: **An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex.** *J Biol Chem* 1994, **269**(19):13752-13755.

Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, El-Benna J: **Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation.** *Biochemistry* 2002, **41**(24):7743-7750.

Freeman JL, Lambeth JD: **NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro.** *J Biol Chem* 1996, **271**(37):22578-22582.

Fuchs A, Dagher MC, Jouan A, Vignais PV: **Activation of the O₂(-)-generating NADPH oxidase in a semi-recombinant cell-free system. Assessment of the function of Rac in the activation.** *Eur J Biochem* 1994, **226**(2):587-595.

Fuchs A, Dagher MC, Vignais PV: **Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system.** *J Biol Chem* 1995, **270**(11):5695-5697.

Fuchs A, Dagher MC, Faure J, Vignais PV: **Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH-oxidase. Pinpointing the sites of interaction between p47phox, p67phox and p40phox using the two-hybrid system.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1312**(1):39-47.

G

Genetet N: **Immunologie, 3ème édition;** 1997.

Goldblatt D, Thrasher AJ: **Chronic granulomatous disease.** *Clin Exp Immunol* 2000, **122**(1):1-9.

Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O, Pick E: **Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly.** *J Biol Chem* 2000, **275**(51):40073-40081.

Grandvaux N, Elsen S, Vignais PV: **Oxidant-dependent phosphorylation of p40phox in B lymphocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **287**(4):1009-1016.

Grizot S: **Etude des relations structure-fonction des facteurs cytosoliques du complexe de la NADPH Oxydase.** Grenoble: Université Joseph Fourier; 2001.

Grizot S, Fieschi F, Dagher MC, Pebay-Peyroula E: **The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease.** *J Biol Chem* 2001, **276**(24):21627-21631.

Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K: **Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase.** *Cell* 2003, **113**(3):343-355.

Grogan A, Reeves E, Keep N, Wientjes F, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ, Segal AW: **Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 24):3071-3081.

H

Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD: **Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox).** *J Biol Chem* 1998, **273**(27):16663-16668.

Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H, Clark RA: **Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558.** *J Clin Invest* 1991, **87**(1):352-356.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT: **Chronic granulomatous disease.** *Curr Opin Immunol* 2003, **15**(5):578-584.

Hirano Y, Yoshinaga S, Ogura K, Yokochi M, Noda Y, Sumimoto H, Inagaki F: **Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5.** *J Biol Chem* 2004, **279**(30):31883-31890.

Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H, Kohda D: **Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**(6):526-530.

Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME: **Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558.** *Biochemistry* 1995, **34**(51):16753-16757.

I

Inanami O, Johnson JL, McAdara JK, Benna JE, Faust LR, Newburger PE, Babior BM: **Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47phox on serine 303 or 304.** *J Biol Chem* 1998, **273**(16):9539-9543.

Ito T, Nakamura R, Sumimoto H, Takeshige K, Sakaki Y: **An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p40phox and p47phox.** *FEBS Lett* 1996, **385**(3):229-232.

Ito T, Matsui Y, Ago T, Ota K, Sumimoto H: **Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions.** *EMBO J* 2001, **20**(15):3938-3946.

J

Janin J, Delepierre M: **Biologie structurale: principes et méthodes biophysiques**, Hermann éditeurs des sciences et des arts edn; 1994.

Johansson A, Jesaitis AJ, Lundqvist H, Magnusson KE, Sjölin C, Karlsson A, Dahlgren C: **Different subcellular localization of cytochrome b and the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: effect on the production of reactive oxygen species during phagocytosis.** *Cell Immunol* 1995, **161**(1):61-71.

Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM: **Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity.** *J Biol Chem* 1998, **273**(52):35147-35152.

Jurkowska M, Bernatowska E, Bal J: **Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004, **52**(2):113-120.

K

Kami K, Takeya R, Sumimoto H, Kohda D: **Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p.** *EMBO J* 2002, **21**(16):4268-4276.

Karathanassis D, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W, Williams RL: **Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction.** *EMBO J* 2002, **21**(19):5057-5068.

Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD: **Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor.** *Nature* 1998, **395**(6703):713-716.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H: **Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase.** *J Biol Chem* 1999, **274**(35):25051-25060.

Kume A, Dinauer MC: **Gene therapy for chronic granulomatous disease.** *J Lab Clin Med* 2000, **135**(2):122-128.

Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H: **The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase.** *EMBO J* 2002, **21**(23):6312-6320.

L

Lamark T, Perander M, Outzen H, Kristiansen K, Overvatn A, Michaelsen E, Bjorkoy G, Johansen T: **Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins.** *J Biol Chem* 2003, **278**(36):34568-34581.

Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K: **Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox.** *J Biol Chem* 2002, **277**(12):10121-10128.

Leto TL, Adams AG, de Mendez I: **Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(22):10650-10654.

Leusen JH, Fluiter K, Hilarius PM, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG: **Interactions between the cytosolic components p47phox and p67phox of the human neutrophil NADPH oxidase that are not required for activation in the cell-free system.** *J Biol Chem* 1995, **270**(19):11216-11221.

Ligeti E, Doussiere J, Vignais PV: **Activation of the O₂(-)-generating oxidase in plasma membrane from bovine polymorphonuclear neutrophils by arachidonic acid, a cytosolic factor of protein nature, and nonhydrolyzable analogues of GTP.** *Biochemistry* 1988, **27**(1):193-200.

Lim WA, Richards FM, Fox RO: **Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains.** *Nature* 1994, **372**(6504):375-379.

Lopes LR, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A, Babior BM: **Phosphorylated p40phox as a negative regulator of NADPH oxidase.** *Biochemistry* 2004, **43**(12):3723-3730.

M

Madden K, Snyder M: **Cell polarity and morphogenesis in budding yeast.** *Annu Rev Microbiol* 1998, **52**:687-744.

Mayer BJ: **SH3 domains: complexity in moderation.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 7):1253-1263.

McPhail LC: **SH3-dependent assembly of the phagocyte NADPH oxidase.** *J Exp Med* 1994, **180**(6):2011-2015.

Morel F, Boulay F, Doussi re J, Vignais PV: **Bases mol culaires de la granulomatose septique chronique.** *M decine/Sciences* 1992, **8**:912-920.

Moscat J, Diaz-Meco MT: **The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters.** *EMBO Rep* 2000, **1**(5):399-403.

N

Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y, Ito T: **The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase.** *Eur J Biochem* 1998, **251**(3):583-589.

Nakamura K, Johnson GL: **PB1 Domains of MEKK2 and MEKK3 Interact with the MEK5 PB1 Domain for Activation of the ERK5 Pathway.** *J Biol Chem* 2003, **278**(39):36989-36992.

Nisimoto Y, Otsuka-Murakami H, Lambeth DJ: **Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme.** *J Biol Chem* 1995, **270**(27):16428-16434.

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD: **The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558).** *J Biol Chem* 1999, **274**(33):22999-23005.

Noack D, Rae J, Cross AR, Munoz J, Salmen S, Mendoza JA, Rossi N, Curnutte JT, Heyworth PG: **Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by novel mutations in NCF-2, the gene encoding the p67-phox component of phagocyte NADPH oxidase.** *Hum Genet* 1999, **105**(5):460-467.

Noda Y, Kohjima M, Izaki T, Ota K, Yoshinaga S, Inagaki F, Ito T, Sumimoto H: **Molecular recognition in dimerization between PB1 domains.** *J Biol Chem* 2003, **278**(44):43516-43524.

O

Okamura N, Babior BM, Mayo LA, Peveri P, Smith RM, Curnutte JT: **The p67-phox cytosolic peptide of the respiratory burst oxidase from human neutrophils. Functional aspects.** *J Clin Invest* 1990, **85**(5):1583-1587.

P

Paclat MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, Dagher MC: **Localization of NOX2 N-terminus using polyclonal anti-peptide antibodies.** *Biochem J* 2004, **2**.

Park JB: **Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages.** *Exp Mol Med* 2003, **35**(5):325-335.

Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, Curnutte JT: **Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox.** *Blood* 1999, **94**(7):2505-2514.

Pawson T: **Protein modules and signalling networks.** *Nature* 1995, **373**(6515):573-580.

Ponting CP: **Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains?** *Protein Sci* 1996, **5**(11):2353-2357.

Ponting CP, Ito T, Moscat J, Diaz-Meco MT, Inagaki F, Sumimoto H: **OPR, PC and AID: all in the PB1 family.** *Trends Biochem Sci* 2002, **27**(1):10.

Prescott, Harley, Klein: **Microbiologie**, DeBoeck Université edn; 1995.

Q

Quinn MT, Gauss KA: **Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases.** *J Leukoc Biol* 2004.

R

Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D: **Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site.** *Science* 1993, **259**(5098):1157-1161.

Revillard JP: **Immunologie, 3ème édition.** 1998.

Roitt I: **Immunologie**, éditions pradel edn; 1990.

Roitt, Brostoff, Male: **Immunology, fifth edition:** Mosby; 1998.

Rothenberg ME, Mishra A, Brandt EB, Hogan SP: **Gastrointestinal eosinophils in health and disease.** *Adv Immunol* 2001, **78**:291-328.

S

Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J: **The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation.** *EMBO J* 1999, **18**(11):3044-3053.

Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J: **The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway.** *EMBO J* 2000, **19**(7):1576-1586.

Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL: **p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain.** *J Biol Chem* 1997, **272**(14):9141-9146.

Scita G, Tenca P, Frittoli E, Tocchetti A, Innocenti M, Giardina G, Di Fiore PP: **Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs.** *Embo J* 2000, **19**(11):2393-2398.

Segal AW, Garcia R, Goldstone H, Cross AR, Jones OT: **Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils.** *Biochem J* 1981, **196**(1):363-367.

Sheehan D: **Physical Biochemistry: principles and applications**, Wiley edn; 2000.

Simorre JP, Brutscher B, Caffrey MS, Marion D: **Assignment of NMR spectra of proteins using triple-resonance two-dimensional experiments.** *J Biomol NMR* 1994, **4**(3):325-333.

Smith RM, Connor JA, Chen LM, Babior BM: **The cytosolic subunit p67phox contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase.** *J Clin Invest* 1996, **98**(4):977-983.

Someya A, Nagaoka I, Yamashita T: **Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils.** *FEBS Lett* 1993, **330**(2):215-218.

Stahelin RV, Burian A, Bruzik KS, Murray D, Cho W: **Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox.** *J Biol Chem* 2003, **278**(16):14469-14479.

Sumimoto H, Kage Y, Nunoi H, Sasaki H, Nose T, Fukumaki Y, Ohno M, Minakami S, Takeshige K: **Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(12):5345-5349.

Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M, Takeshige K: **Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase.** *J Biol Chem* 1996, **271**(36):22152-22158.

Szyperski T, Wider G, Bushweller JH, Wuthrich K: **3D 13C-15N-heteronuclear two-spin coherence spectroscopy for polypeptide backbone assignments in 13C-15N-double-labeled proteins.** *J Biomol NMR* 1993, **3**(1):127-132.

T

Terasawa H, Noda Y, Ito T, Hatanaka H, Ichikawa S, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F: **Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif.** *EMBO J* 2001, **20**(15):3947-3956.

Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T: **A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **199**(3):1378-1387.

Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H: **Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox.** *J Exp Med* 1996, **184**(3):893-902.

U

Uhlinger DJ, Tyagi SR, Inge KL, Lambeth JD: **The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system.** *J Biol Chem* 1993, **268**(12):8624-8631.

V

van Drogen-Petit A, Zwahlen C, Peter M, Bonvin AM: **Insight into molecular interactions between two PB1 domains.** *J Mol Biol* 2004, **336**(5):1195-1210.

Vergnaud S, Paclet MH, El Benna J, Pocard MA, Morel F: **Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction.** *Eur J Biochem* 2000, **267**(4):1059-1067.

Vignais PV: **The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(9):1428-1459.

Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ: **Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution.** *J Mol Biol* 1987, **194**(3):531-544.

W

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW: **p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains.** *Biochem J* 1993, **296**(Pt 3):557-561.

Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW: **Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox.** *Biochem J* 1996, **317**(Pt 3):919-924.

Wientjes FB, Reeves EP, Soskic V, Furthmayr H, Segal AW: **The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **289**(2):382-388.

Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Derrow CW, Harris C *et al*: **Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency.** *Blood* 2000, **96**(5):1646-1654.

Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL: **PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62.** *Mol Cell* 2003, **12**(1):39-50.

Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P *et al*: **Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients.** *Medicine (Baltimore)* 2000, **79**(3):155-169.

Wishart DS, Sykes BD: **The 13C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using 13C chemical-shift data.** *J Biomol NMR* 1994, **4**(2):171-180.

Y

Yaffe MB: **The p47phox PX domain: two heads are better than one!** *Structure (Camb)* 2002, **10**(10):1288-1290.

Yoshinaga S, Kohjima M, Ogura K, Yokochi M, Takeya R, Ito T, Sumimoto H, Inagaki F: **The PB1 domain and the PC motif-containing region are structurally similar protein binding modules.** *Embo J* 2003, **22**(19):4888-4897.

Yuzawa S, Ogura K, Horiuchi M, Suzuki NN, Fujioka Y, Kataoka M, Sumimoto H, Inagaki F: **Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form.** *J Biol Chem* 2004, **279**(28):29752-29760.

Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F: **A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase.** *Genes Cells* 2004, **9**(5):443-456.

Z

Zwahlen C, Gardner KH, Sarma SP, Horita DA, Byrd RA, Kay LE: **An NMR experiment for measuring methyl-methyl NOEs in 13C-labeled proteins with high resolution.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**(30):7617-7625.

Communications scientifiques

Publication dans «The Journal of Biological Chemistry»

Claire Massenet[#], **Sylvie Chenavas**[#], Claudine Cohen-Addad, Marie-Claire Dagher, Gérard Brandolin, Eva Pebay-Peyroula and Franck Fieschi

([#] indiquent une contribution équivalente des auteurs)

Consequences of p47^{phox} C-terminus phosphorylations on binding towards p40^{phox} and p67^{phox} structure and function comparison study of p40^{phox} and p67^{phox} SH3 domains.

Publication en préparation

Sylvie Chenavas, Jean-Pierre Simorre, Virginie Dubosclard, Eva Pebay-Peyroula, Pierre Gans, Bernhard Brutscher, Franck Fieschi

NMR characterization of a heterodimer of p67^{phox}-p40^{phox} PB1 modules in solution.

Communication orale et publication d'actes de congrès

Sylvie Chenavas, Bernard Brutscher, Pierre Gans, Jean-Pierre Simorre, Eva Pebay-Peyroula, Franck Fieschi

Etude structurale en solution du complexe PB1^{p67phox}/PB1^{p40phox} de la NADPH Oxydase, Congrès international de Biochimie, mai 2004, Marrakech, Maroc, pages 118 à 122.

RESUME

Lors de la phagocytose d'un micro-organisme, le complexe de la NADPH Oxydase des neutrophiles est activé. Il permet alors la production d'espèces réactives de l'oxygène qui contribuent à la destruction du pathogène. Ce complexe est constitué de facteurs cytosoliques (p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}), d'une petite protéine G Rac et du flavocytochrome b₅₅₈ membranaire, lui-même composé de p22^{phox} et gp91^{phox}. Des mutations dans les gènes codant pour certaines de ces protéines conduisent à une maladie génétique rare mais grave □ la granulomatose septique chronique (CGD).

Au sein du complexe ternaire formé par les facteurs cytosoliques, il existe des interactions de type domaine SH3/motif polyproline et une interaction entre domaines PB1. Par Résonance Magnétique Nucléaire, nous avons caractérisé d'un point de vue structural l'interaction entre les domaines PB1 de p67^{phox} et p40^{phox}. Nous avons également étudié les conséquences de l'activation sur les interactions entre le motif polyproline C-terminal de p47^{phox} et ses domaines SH3 partenaires. Ainsi, nous avons combiné l'analyse des structures des domaines SH3 de p40^{phox} et SH3 C-terminal de p67^{phox}, en complexe avec le polyproline C-terminal de p47^{phox}, avec nos mesures d'affinité entre ces partenaires à différents stades de l'activation. Ces données ont été obtenues par fluorescence intrinsèque du tryptophane présent au sein des domaines SH3.

Mots-clefs: complexe de la NADPH Oxydase, CGD, protéines modulaires, RMN, domaine PB1, interaction SH3/polyproline, activation, fluorescence intrinsèque du tryptophane.

SUMMARY

During phagocytosis of a micro-organism, the NADPH Oxidase complex of neutrophils is activated. Reactive oxygen species are then produced and contribute to pathogen destruction. This complex comprises cytosolic factors (p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}), a small G protein Rac and a flavocytochrome b₅₅₈ composed of p22^{phox} and gp91^{phox}. Mutations within the genes encoding some of these proteins lead to a rare but serious disease termed chronic granulomatous disease (CGD).

The formation of the ternary complex constituted by the cytosolic factors implies several SH3 domain/polyproline interactions and also an interaction PB1 domain interaction. We structurally characterized by Nuclear Magnetic Resonance the interaction between PB1 domains of p67^{phox} and p40^{phox}. We also studied the consequences of activation on the interactions involving p47^{phox} C-terminal polyproline motif and its SH3 domain partners. Thus, we combined the analysis of the structures of p40^{phox} SH3 domain and p67^{phox} C-terminal SH3 domain, in complex with p47^{phox} C-terminal polyproline, with our affinity measures between these partners at various stages of activation. These data were obtained by intrinsic fluorescence of tryptophan present within SH3 domains.

Keywords □ NADPH Oxidase complex, CGD, modular proteins, NMR, PB1 domain, SH3/polyproline interaction, activation, intrinsic fluorescence of tryptophan.