



HAL
open science

Etude structurale de biomarqueurs de neuropathologies : Cas particulier de la protéine CRYM, une Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein

Isma Hachi

► **To cite this version:**

Isma Hachi. Etude structurale de biomarqueurs de neuropathologies : Cas particulier de la protéine CRYM, une Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00718112

HAL Id: tel-00718112

<https://theses.hal.science/tel-00718112>

Submitted on 16 Jul 2012

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 DE GRENOBLE



Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2010 par

Isma HACHI

**Etude structurale de biomarqueurs de
neuropathologies :**

Cas particulier de la protéine CRYM, une Cytosolic-3,3',5-
triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein

Composition du jury

Président/Examineur	M. Serge PEREZ
Rapporteur	M. David PIGNOL
Rapporteur	M. Emmanuel BROUILLET
Directeur de thèse/Examineur	M. Jean-Luc FERRER
Invité	M. Franck BOREL

Thèse dirigée par M. Jean-Luc Ferrer

UNIVERSITE DE GRENOBLE



Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2010 par

Isma HACHI

**Etude structurale de biomarqueurs de
neuropathologies :**

Cas particulier de la protéine CRYM, une Cytosolic-3,3',5-
triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein

Composition du jury

Président/Examineur	M. Serge PEREZ
Rapporteur	M. David PIGNOL
Rapporteur	M. Emmanuel BROUILLET
Directeur de thèse/Examineur	M. Jean-Luc FERRER
Invité	M. Franck BOREL

Thèse dirigée par M. Jean-Luc Ferrer

REMERCIEMENTS

Je remercie, en tout premier lieu, mon directeur de thèse, Jean-Luc FERRER pour m'avoir accueillie dans son groupe de recherche et pour sa confiance quant à la conduite de mon projet de thèse.

Je remercie également Juan Carlos FONTECILLA CAMPS pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

J'adresse tous mes remerciements aux membres du jury :

Les rapporteurs, Emmanuel BROUILLET (CEA de Fontenay-aux-roses) et David PIGNOL (CEA de Cadarache) pour leur précieuse contribution dans l'achèvement de mon manuscrit.

Je les remercie également, ainsi que les autres membres du jury : Serge PEREZ (ESRF) et Jean-Luc Ferrer (CEA-IBS Grenoble), pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer mes travaux de thèse.

J'exprime également mes remerciements à :

- Franck BOREL pour ses précieux conseils représentant une aide déterminante dans la finalisation de mon projet de thèse.

- Laurie GALVAN et à son directeur de thèse Emmanuel BROUILLET pour les échanges scientifiques que nous avons eus autour de mon projet et dont la pertinence a été une aide non négligeable quant à la poursuite de ma thèse.

Qu'Emmanuel BROUILLET trouve ici toute ma gratitude pour le temps qu'il m'a consacré durant la rédaction de mon manuscrit.

- Michel PIROCCHI pour m'avoir accompagnée dans mes premiers temps de faisceau et ses enseignements quant à l'utilisation de la ligne de lumière BM30A.

- Pierre LEGRAND, qui m'a dispensée mes premiers cours « HERCULE » de traitement de données, au synchrotron soleil, et m'a aidée pour le traitement de mon premier jeu de données lors de mon premier temps de faisceau à l'ESRF.

-Richard Kahn dont l'expertise m'a aidée à déceler le problème de mosaïcité des cristaux de la protéine mCRYM.

-Jacques JOLY, pour sa disponibilité et son aide dans la gestion de mes données synchrotron. Sans oublier Fabrice LEGER pour l'aide qu'il m'a apportée dans la résolution de mes problèmes informatiques.

-Thibaut CREPIN pour son amitié, son soutien et son aide pour l'utilisation des scripts du programme Pymol.

-Andrés PALENCIA pour son aide et ses conseils combien précieux dans l'utilisation de l'appareil ITC, dans les règles de l'art, et l'analyse des données thermodynamiques.

REMERCIEMENTS

-Jean-Pierre Andrieu pour sa contribution, combien utile et, pour déterminer le coefficient d'extinction expérimentale de la protéine mCRYM nécessaire aux expériences d'ITC.

- Adrien FAVIER, pour les expériences de RMN-1D réalisées sur la protéine Dysbindin1 et pour ses explications sur l'interprétation des profils RMN.

- Luca SIGNOR et Izabel BERARD pour les expériences de spectrométrie de masse requises par les protéines mCRYM et Dysbindin1.

- Marjolaine NOIRCLERC-SAVOYE, Benoit GALLET et Thierry Vernet, de nous avoir permis d'utiliser la plate-forme RoBioMol pour le clonage et les tests d'expression des protéines étudiées.

- Mohamed-Ali HAKIMI, de m'avoir transmis sa passion pour la recherche, lors de mes stages de Master 1 et 2 au sein de son groupe de recherche. Je le remercie également pour son soutien et ses conseils durant les épreuves difficiles que j'ai dues surmonter pendant ces trois années de thèse.

- Philippe Chinkirch, Patrick Malaureille, Pierre Andréani, François Roy, Yannick Chavent, Pascal Vallejo, Luc Barraud pour leur aide précieuse dans l'accomplissement de mon projet professionnel.

Pour leur soutien, je remercie mes ami(e)s : Cécile MORLOT, Cyril BOYAULT, Elodie DANTHON, Newelle BAHRI, Dalil HANNANI, Marion GABRIEL,... et à d'autres que j'ai sûrement oubliés.

J'exprime mon amitié et ma gratitude à tous les membres du laboratoire LCCP et de l'EMBL qui se reconnaissent.

A mes parents, mes beaux parents, mes sœurs et mon frère pour leur soutien et leur amour.

Enfin, qu'Eric, mon époux auquel je dois beaucoup. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour son soutien. Sa présence à mes côtés a été capitale pour que je finisse cette thèse d'une façon la plus sereine possible.

SOMMAIRE

Glossaire	1
Lexique	3
AVANT-PROPOS	5

<p style="text-align: center;">CHAPITRE 1</p> <p style="text-align: center;">INTRODUCTION</p>

A. ANATOMIE DU CERVEAU ET NEUROPATHOLOGIES	10
A.1. Anatomie des régions cérébrales étudiées.....	10
A.2 . Neurodégénérescence du striatum.....	13
A.2.1. Maladie d’Huntington.....	13
A.2.2. Maladie de Parkinson.....	15
B. DONNEES TRANSCRIPTOMIQUES	17
B.1. Présentation.....	18
B.2. La technique sage.....	18
B.3. Résultats et discussion.....	20
B.4. Conclusion.....	24
C. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PROTEINE mCRYM	25
C.1. CRYM : une μ -crystalline avec une fonction de CTBP.....	25
C.2. La superfamille des crystallines : un exemple original d’évoluti.....	25
C.3. Les CTBPs : fonction enzymatique et/ou fonction structurale ?.....	29
C.4. Les Hormones thyroïdiennes.....	36
C.4.1. Biosynthèse.....	36
C.4.2. Libération des THs et modulation de la biodisponibilité de la T3.....	37
C.4.3. Les diverses fonctions physiologiques des THs.....	39
C.4.4. Les modes d’action des THs.....	40
C.4.4.1. Mode d’action génomique.....	40
C.4.4.2. Mode d’action non génomique.....	47
C.5. Les transporteurs plasmiqes des THs.....	51

SOMMAIRE

C.6. Transport nucléo-cytoplasmique et régulation de la T3 dans le noyau.....	52
C.7. Les études fonctionnelles sur CRYM de mammifères.....	52
C.7.1. Implication de CRYM dans la surdité non syndromique.....	52
C.7.2. Relation entre la protéine hCRYM et le récepteur aux androgènes.....	53
C.8. Les études structurales sur CRYM de mammifères et ses homologues.....	57
C.8.1. La structure de hCRYM humaine complexée au NADPH.....	57
C.8.2. Structures cristallographiques de mCRYM apo et mCRYM/NADP(H).....	63
C.8.3. Les homologues de CRYM et la famille des μ -crystallines/OCDS.....	68
C.8.3.1. Ornithine cyclodésaminase de <i>P.putida</i>	73
C.8.3.2. Alanine déshydrogénase d' <i>A.fulgidus</i>	77

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

A. CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES SOLUBLES.....	83
A.1. Clonage et criblage de l'expression et de la solubilité des protéines.....	83
A.1.1. Compte-rendu de la plate-forme RoBioMol.....	83
A.1.2. Clonage et tests d'expression de la protéine DCLK3.....	83
A.2. Purification des protéines solubles.....	86
A.2.1. La protéine DYSBINDIN1.....	86
A.2.2. La protéine mCRYM	89
B. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE.....	90
B.1. Spectrométrie de masse dénaturante.....	90
B.1.1. La protéine Dysbindin1.....	90
B.1.2. La protéine mCRYM.....	91
B.2. Analyse par RMN-1D de la protéine DYSBINDIN1.....	92
C. CRISTALLISATION DE mCRYM COMPLEXEE AU NADPH ET A LA T3.....	94
C.1. Principe de la cristallogénèse.....	94
C.2. Techniques de cristallogénèse utilisées.....	95
C.3. Co-cristallisation de mCRYM en présence de T3 et NADPH.....	96
C.3.1. Premiers essais de cristallisation.....	96

SOMMAIRE

C.3.2. Résolution du problème de solubilité de la T3.....	97
D. OPTIMISATION DES ETAPES DE CRISTALLISATION ET DE CRYOPROTECTION.....	98
D.1. Ensemencement des germes de cristaux de mCRYM/T3/NADP(H).....	98
D.2. Cryoprotection et tests de diffraction.....	99
E. RESOLUTION DE LA STRUCTURE DE mCRYM/T3/NADP(H)	100
E.1. L'enregistrement et le traitement des données de diffraction.....	100
E.2. La validation des données de diffraction.....	101
E.3. Détermination de la phase par remplacement moléculaire.....	103
E.4. L'affinement et la construction du modèle.....	103
E.5. Problème d'affinement des données de diffraction de mCRYM/T3/NADP(H)	105
E.6. Optimisation de la cryoprotection.....	106
E.7. Résolution de la structure du complexe mCRYM/T3/NADPH.....	107
F. CARACTERISATION THERMODYNAMIQUE DE LA T3.....	110
F.1. Présentation et principe de l'ITC.....	110
F.2. Déroulement de l'expérience.....	110
F.3. Résolution du problème de solubilité de la T3.....	113

CHAPITRE 3

Etude structurale du complexe mCRYM/T3/NADPH

A. RESULTATS ET DISCUSSION	117
A.1. Présentation générale de la structure.....	117
A.1.1. La molécule T3 et la particularité des atomes d'iode.....	117
A.1.2. Structures secondaires de mCRYM/T3/NADP(H)	118
A.1.3. Structure tertiaire de mCRYM.....	119
A.1.3.1. Domaine de fixation du NADP(H)	119
A.1.3.2. Domaine de dimérisation et de fixation de la T3.....	122
A.2. Interaction de la T3 avec la protéine mCRYM et le NADPH.....	124
A.3. Comparaison des structures de mCRYMs.....	129
A.3.1. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec mCRYM apo.....	129

SOMMAIRE

A.3.2. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec mCRYM/NADP(H)	133
A.4. Comparaison de mCRYM avec hCRYM et les homologues.....	140
A.4.1. Homologie de séquence.....	140
A.4.2. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec hCRYM/NADPH.....	141
A.4.2.1. Site de fixation du NADP(H) : comparaison avec mCRYM/NADP(H)	143
A.4.2.2. Flexibilité de la boucle β 4- β 5.....	144
A.4.2.3. Site de l'ion potassium.....	145
A.4.2.4. Superposition du site de la T3 de hCRYM et mCRYM.....	146
A.4.2.5. Comparaison avec le modèle hCRYM/T3/NADPH.....	147
A.4.3. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec l'enzyme <i>AfALDH</i>	149
A.4.4. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec l'enzyme <i>PpOCD</i>	154
B. CONCLUSION	160
B.1. Présence de NADPH ou NADP ⁺ dans les structures des complexes mCRYM ?.....	160
B.1.1. Tableau de synthèse des données structurales.....	161
B.1.2. Présence du complexe mCRYM/T3/NADP ⁺ et du complexe mCRYM/NADPH.....	161
B.2. Spécificité du domaine de fixation du NAD(P) des μ -crystallines/OCDs/ <i>AfAlaDH</i>	163
B.3. Interaction avec des partenaires physiologiques.....	165
B.4. Site à ions monovalents : physiologiques ou artefacts cristallographiques ?	165

CHAPITRE 4

Etude thermodynamique de la fixation de la T3

A. RESULTATS ET DISCUSSION	168
A.1. Caractérisation thermodynamique de la fixation du NADPH et du NADP ⁺ sur mCRYM.....	168
A.1.1. Condition en présence de sels et à pH 8.....	168
A.1.2. Condition en absence de sels et à pH 8.7.....	170
A.2. Caractérisation thermodynamique de l'interaction de la T3 avec mCRYM.....	174
A.2.1. Interaction de la T3 avec mCRYM en absence des cofacteurs.....	174
A.2.2. Interaction de la T3 avec mCRYM en présence des cofacteurs.....	175
B. CONCLUSION	180

CHAPITRE 5

Conclusion et perspectives

A. Intégration des études structurale et thermodynamique.....183

B. La T3 est-elle le seul ligand physiologique de la protéine CRYM ?.....184

C. Double rôle fonctionnel de la protéine CRYM dans le cerveau ?.....186

Bibliographie.....186

Résumé

GLOSSAIRE

ADH : Alcool déshydrogénase
AF-2 : Fonction d'activation 2
AfAlaDH : Alanine déshydrogénase *Archaeoglobus fulgidus*
ALDH : aldéhyde déshydrogénase
ARE : Elément de Réponse à l'Androgène
ARs : récepteurs aux androgènes
CRABP : Cellular RA-Binding Protein
CRBP : Cellular Retinal-Binding Protein
CRYMs ou CRYM : ce terme désigne, dans le présent manuscrit, les protéines CRYM murine et humaine
CTBP : Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein
D : thyroxine-5'-désiodase ou désiodase
DBD : DNA-Binding Domain ou domaine C
Dbndd1 : annotation gène codant la protéine DYSBINDIN1
DCLK3 : Double-Cortine Like Kinase 3
DHT : DiHydroTestosterone
DO : Densité Optique
Ds : désiodinases
DTBP1 : annotation de la protéine DYSBINDIN1
DTT : Dithiothreitol
Dysbindin1 : Dystrobrévine Binding Protein 1 (annotation protéine DTBP1, annotation gène Dbndd1)
ESI-MS : ElectroSpray Ionisation-Mass Spectrometry de Masse
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
GABA : acide gamma-aminobutyrique
GP : Globus pallidus ou pallidum
GPe : Globus pallidus externe
GPi : Globus pallidus interne
GST: Gutathion-S-Transférase
hCRYM : protéine CRYM humaine
IBS : Institut de Biologie Structurale
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITC : Isothermal Titration Calorimetry
ITC : Isothermal Titration Calorimetry
KH₂PO₄ : phosphate de potassium acide
LBD : Ligand-Binding Domain ou domaine E
LIC : Ligation Independent Cloning
LRRK2 : Leucine-Rich Repeat serine/threonine-protein Kinase 2
MALDI-TOF MS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-*Time-Of-Flight mass spectrometry* Mass- Spectrometry
mCRYM : protéine CRYM murine
MH : maladie d'Hunitngton
MP : maladie de Parkinson
MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

GLOSSAIRE

NAD(H) : ce terme désigne, dans le présent manuscrit, la forme réduite NADH ou la forme oxydée NAD⁺

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NADP(H) : ce terme désigne, dans le présent manuscrit, la forme réduite NADPH ou la forme oxydée NADP⁺

NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

NaSCN : thiocyanate de sodium

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NTA : nitriloacetic acid

Pdb : Protein Data Bank

PEG : polyethylene glycol

PM : Poids Moléculaires

PMSF : Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride

PpOCD : Ornithine Cyclodésaminase de *Pseudomonas putida*

PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

qRT-PCR : quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RA : acide rétinoïque

RARs : les récepteurs à l'acide rétinoïque

RBP : Retinol-Binding Protein ;

RMN-1D : Résonance Magnétique Nucléaire 1 dimension

RMSD : Root Mean Square Deviation, écart quadratique moyen

RXR : Retinoid X receptors, récepteurs des rétinoïdes

SAGE : Serial Analysis of Gene Expression

SBMA : *Spinal and Bulbar Muscular Atrophy*

SN : substance noire

STN : noyau sous-thalamique

T3 : 3,5,3'-triiodo-L-thyronine

THBP : Thyroid Hormone-Binding Protein

THs : hormones thyroïdiennes

TR : récepteur thyroïdien,

TRH : Thyrotropin Releasing Hormone

TRIAC : 3,3',5-triiodothyroacetic acid, un dérivé de T3

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

WB : Western Blot

Astrocytes : phénotype de cellules gliales le plus nombreux. Ces cellules comblent l'espace situé entre les neurones et représentent donc l'essentiel de l'environnement où baignent les neurones. Elles participent à la régulation de la composition du milieu extracellulaire et forment une sorte d'enveloppe autour des jonctions synaptiques, contribuant au recyclage et à la diffusion des neurotransmetteurs qui ont été libérés dans l'espace extra-synaptique (Neurosciences, Beer et al., 2006).

Calréticuline : cruciale pour l'immunogénicité des cellules cancéreuses apoptotiques. Elle est responsable du stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique et joue également un rôle de protéine chaperon en cas de stress cellulaire. Cette protéine a cependant aussi été identifiée comme un marqueur cellulaire membranaire indispensable pour la phagocytose des cellules en apoptose (Apetoh et al., 2007).

Cellules gliales : différents types cellulaires de nature non neuronale, qui regroupent les astrocytes, les cellules oligodendrocyte, les tancytes, les cellules de schwann... Elles contribuent au fonctionnement cérébral, en étroite synergie avec la fonction neuronale. Par exemple, les astrocytes sont impliqués dans le recyclage du glutamate libéré dans l'espace extra-synaptique (Neurosciences, Beer et al., 2006).

Chromatographie : est une méthode physico-chimique qui a pour rôle de séparer les constituants d'un mélange afin d'arriver à un certain niveau de pureté. Cette séparation s'effectue grâce à une phase mobile (liquide) et à une phase stationnaire (solide). Lors du passage des constituants, ces deux phases exercent, respectivement, une force de mobilité et une force de rétention.

Cochlée : une structure anatomique de l'oreille interne. C'est un organe creux rempli d'un liquide appelé endolymphe. Elle est tapissée de cellules ciliées - des cellules sensorielles non renouvelables coiffées de structures filamenteuses, les stéréocils. Ces cellules sont disposées le long d'une membrane (la membrane basilaire) qui vient partitionner la cochlée en deux chambres. L'ensemble des cellules ciliées et des membranes qui leur sont adjointes constitue l'organe de Corti.

Excitotoxicité : terme spécifique à un phénomène neuronal lié aux neurones glutamatergiques, de type NMDA, caractérisé par un dysfonctionnement mitochondrial et à une mauvaise régulation de la concentration de calcium intracytosolique, qui aboutit à la mort neuronal par une excitation excessive des neurones. Les mécanismes à l'origine de cette excitotoxicité ne sont pas entièrement élucidés.

Les cellules ciliées externes : reçoivent les voies efférentes du cerveau et vont agir en préamplificateur du son pour une adaptation en temps réel de l'audition. Ce système permet de comprendre la parole dans le bruit.

Lignée cellulaire COS1 : cellules de reins de singe, habituellement utilisées en transfection en cellule de mammifères.

Locus coeruleus : noyau sous-cortical du cerveau, situé dans le tronc cérébral et entretenant d'étroites relations avec l'amygdale.

LEXIQUE

Maille : est le plus petit élément qui se répète par translation selon un réseau régulier pour former le cristal.

Mésencéphale : partie moyenne de l'encéphale (partie du système nerveux compris dans le crâne), étroite et située au-dessus du pont. Le pont est une région proéminente du tronc cérébral (qui fait suite à la moelle épinière) comprise entre le mésencéphale et le bulbe rachidien.

Plexus choroïdes : plexus est une structure formée par un encroisement de vaisseaux sanguins correspondant à une région des ventricules du cerveau où le liquide céphalorachidien est sécrété (Source Neuroanatomie, Crossman et al., 2004).

Récepteurs glutamatergiques de type NMDA ionotropes : il s'agit d'un types de récepteurs glutamatergiques, c'est-à-dire, utilisant le neurotransmetteur glutamate, ionotropes car il s'agit de canaux ioniques laissant rentrer des ions calcium d'une façon sélective pour initier une signalisation cellulaire. L'entrée de calcium se fait par la fixation du glutamate sur le récepteurs NMDA. Ces derniers sont très importants dans la transmission rapide excitatrice (due à la nature du neurotransmetteur) dans le système nerveux central.

Remplacement moléculaire : il s'agit d'une méthode de phasage en cristallographie qui est employée lorsqu'on dispose d'une protéine supposée structuralement proche de la protéine d'intérêt (au moins 30 % d'homologie) et dont la structure est disponible dans la PDB.

RMSD : "*Root Mean Square Deviation* », écart quadratique moyen, valeur fréquemment utilisée en cristallographie des protéines pour estimer l'écart moyen de deux structures en se basant sur la structure tertiaire de leurs chaînes principales. Il permet ainsi une estimation des différences entre plusieurs structures 3D en se basant sur cette valeur. De nombreux sites permettent le calcul de cette valeur, tel que : <http://www.ebi.ac.uk/Tools/dalilite/>

Tanicytes : phénotype cellulaire non neuronal, appartenant aux cellules gliales. Ces cellules sont capables de migrer, de faciliter la régénération et d'envelopper les axones (Neurosciences, Beer et al., 2006).

Trigone germinal : situé à proximité du corps calleux, appartient au système limbique.

Unité asymétrique : c'est la plus petite zone suffisante pour reconstruire la maille complète grâce aux operateurs de symétrie.

AVANT-PROPOS

Le projet de thèse s'inscrit dans un vaste projet de caractérisation de protéines nouvellement identifiées dont l'expression est sélective de certaines régions du cerveau. Le projet s'inscrit dans la continuité d'une étude transcriptomique qui a été menée par l'équipe du Dr. Jean-Marc Elalouf au laboratoire de PhysioGénomique à l'Institut de Biologie et Technologies de Saclay.

Cette équipe a étudié par la technique SAGE (**S**erial **A**nalysis of **G**ene **E**xpression) l'expression de gènes dans plus de dix régions cérébrales telles que le cortex moteur, le thalamus, le striatum (le noyau caudé et le putamen) et la substance noire de souris adultes sauvages et de souris modèles de deux maladies neurodégénératives : un modèle transgénique de la maladie d'Huntington (souris transgénique R6/2, surexprimant la protéine Huntingtine mutée) et un modèle phénotypique de la maladie de Parkinson (souris traitées avec une toxine mitochondriale, le 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-TetrahydroPyridine ou MPTP). Ces recherches avaient pour but de mieux caractériser la complexité moléculaire des différentes régions du cerveau et en particulier, d'identifier des gènes ayant un profil d'expression préférentiel dans une population neuronale et/ou une région particulière du cerveau. La plupart des gènes ayant ainsi été identifiés codent pour des protéines dont la fonction est inconnue au niveau cérébral (Brochier et al., 2008) et pour certaines, la fonction au niveau périphérique a déjà été décrite. Cette étude repose sur l'hypothèse que ces gènes, par leur profil d'expression préférentiel, pourraient être impliqués dans des mécanismes physiologiques propres à chaque région cérébrale. De plus, l'expression sélective de ces transcrits dans certaines régions du cerveau pourrait également intervenir dans les phénomènes de dégénérescence neuronale qui caractérisent les maladies neurodégénératives. Ils pourraient constituer de nouveaux biomarqueurs, d'une part, pour élucider les mécanismes pathologiques, au niveau moléculaire, et, d'autre part, pour faciliter le diagnostic et/ou le pronostic des maladies.

De nombreuses pathologies neurologiques sont liées à une dégénérescence lente et progressive de populations neuronales bien spécifiques. Cette mort cellulaire, résultant d'une activation anormale du processus d'apoptose et/ou d'une altération des voies de survie cellulaire, est souvent spécifique à une région et/ou à un phénotype neuronal. Les mécanismes sous-tendant cette dégénérescence restent inconnus. En particulier, la sélectivité régionale de la dégénérescence reste très mal comprise. En effet, même dans le

AVANT-PROPOS

cas des maladies neurodégénératives associées à une mutation identifiée, le profil d'expression de la protéine incriminée ne correspond pas au patron de dégénérescence. Prenons l'exemple de deux pathologies considérées dans l'étude transcriptomique de Brochier et collaborateurs (2008); les stades précoces de la maladie de Parkinson (MP) se caractérisent par une dégénérescence des neurones dopaminergiques qui sont situés dans la substance noire compacte projetant dans le striatum. L'atteinte de la voie nigrostriée, entraîne secondairement des altérations fonctionnelles des noyaux des ganglions de la base (GB), en particulier dans le striatum. Dans les cas rares de formes familiales (récessives ou dominantes), la MP est associée à des mutations au niveau de gènes codant des protéines, telles que la **Leucine-Rich Repeat serine/threonine-protein Kinase 2 (LRRK2)**, l' α -synucléine et la parkine ; dont l'expression n'est pas restreinte à la substance noire compacte. Dans la maladie d'Huntington (MH), le processus de neurodégénérescence débute initialement dans le striatum et affecte la fonction et la survie des neurones GABAergiques épineux de taille moyenne qui projettent sur différentes structures des GB, en particulier la substance noire reticulata (SNr) et le globus pallidus (GP). Pourtant, l'expression de la protéine Huntingtine mutée (mHtt), qui est responsable de la MH, est ubiquitaire dans le cerveau. Il faut donc supposer que des mécanismes "régions-spécifiques" rendent chaque région particulièrement sensible suivant les maladies neurodégénératives considérées. Une meilleure connaissance de ces facteurs "régions-spécifiques" pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la dégénérescence "locale" dans les différentes maladies neurodégénératives.

Ainsi, bien que les mécanismes moléculaires de neurodégénérescence ne soient pas encore complètement élucidés, l'utilisation d'outils permettant, à grande échelle, de caractériser les protéines dont l'expression est sélective des régions cérébrales touchées dans les maladies neurodégénératives pourrait permettre, *in fine*, d'en déduire leur fonction au niveau cérébral et leurs implications dans des mécanismes pathologiques.

Un des éléments clés pour comprendre la fonction des protéines est de déterminer leur structure tridimensionnelle. Dans le travail de thèse présenté dans le présent manuscrit, nous avons fait appel à une approche cristallographique afin de tenter d'élucider certains

AVANT-PROPOS

aspects fonctionnels de protéines nouvellement identifiées par l'analyse transcriptomique effectuée chez la souris par l'équipe du Dr. Jean-Marc Elalouf.

En accord avec l'équipe du laboratoire de PhysioGénomique, nous avons sélectionné onze transcrits (Vash2, Phactr1, Frmd6, Stac2, LOC76982, Gm705, Sh2d5, Sh2d5epi, LOC109349, Gm804, Dbnnd1) dont l'expression est sélective d'une région du cerveau afin d'effectuer une caractérisation structurale des protéines correspondantes. Le clonage dans un vecteur dédié puis les tests d'expression de ces protéines dans un système bactérien ont été confiés à la plateforme de service RoBioMol (Responsables : Dr. Marjolaine Noirclerc-Savoie et Benoit Gallet, Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale). Il s'agit d'une plateforme automatisée de Biologie Moléculaire (sur plaque 96 puits) qui permet l'amplification de gènes par PCR, le clonage rapide par la technique LIC (pour *Ligation Independent Cloning*, qui s'affranchit des enzymes de restrictions et de ligation) et la réalisation de tests d'expression et de solubilité des protéines recombinantes. Elle a permis une identification rapide de candidats solubles pour débiter le criblage de conditions de cristallisation (Annexe).

Ces tests ont mis en évidence une seule protéine soluble, la protéine DYSBINDIN1 (**DYS**trobrévine-**BINDING** Protein 1, DTBP1, numéro d'accès **Q91WZ8**), exprimée dans le cerveau et les tissus périphériques d'une manière ubiquitaire. Pour les dix autres protéines, cinq protéines étaient totalement insolubles (Frmd6, LOC109349, Gm804, LOC76982, Phactr1) et les cinq autres protéines (Vash2, Stac2, Sh2d5, Sh2d5epi, Gm705) sont faiblement solubles (protéines visibles sur western blot mais pas sur gel SDS-PAGE, Annexe). Ainsi pour des raisons pratiques nous avons initié l'étude de la Dysbindin1 (ou DTBP1) qui est la protéine la plus soluble parmi la liste de protéines. Cette dernière avait un rendement d'expression suffisant pour atteindre les quantités de protéines nécessaires aux tests de cristallisation.

A la fin de ma première année de thèse, aucune des onze protéines n'a permis l'obtention de cristaux exploitables pour la cristallographie. Par conséquent, nous nous sommes orientés vers l'analyse structurale de CRYM murine (mCRYM), une protéine qui pourrait potentiellement être un nouveau biomarqueur sélectif du noyau accumbens et du striatum (Brochier et al., 2008). Avant mon arrivée, Marie-Claude Gaillard, ingénieur CEA du laboratoire de physiogénomique, a exprimé et purifié la protéine mCRYM pour un criblage

AVANT-PROPOS

au robot de cristallisation de l'IBS. Après une étape de gel filtration (réalisée par le Dr. Franck Borel, chercheur CEA en charge du projet avant mon arrivée), ces tests ont abouti à des cristaux exploitables. La qualité de diffraction des cristaux a été améliorée, ce qui a abouti à la structure de la forme apo de mCRYM (mCRYM apo) et de la forme complexée avec le cofacteur NADPH (mCRYM/NADPH). J'ai résolu la structure cristallographique de la protéine mCRYM complexée à son ligand (Résolution 1,75 Å) : l'hormone thyroïdienne T3 et à son cofacteur : le NADPH (mCRYM/T3/NADPH). De ce fait, le travail réalisé sur mCRYM constituera la partie la plus développée du présent manuscrit.

A la fin de ma deuxième année de thèse, j'ai pu établir des échanges scientifiques avec le Dr. Emmanuel Brouillet (URA CEA-CNRS2210/MIRCen CEA Fontenay-aux-Roses) et sa doctorante Laurie Galvan dont les travaux de thèse portent sur l'aspect fonctionnel des protéines exprimées sélectivement dans le striatum, dans le cadre de la MH. En parallèle de nos études, ce groupe s'est intéressé à la protéine mCRYM et à une autre protéine de fonction inconnue, la kinase DCLK3 (Double-Cortine Like Kinase 3). Laurie Galvan a pu montrer que la présence de DCLK3 dans les neurones du striatum conférait à ces cellules une sensibilité particulière vis-à-vis de la protéine mHtt. Bien que DCLK3 ne faisait pas parti des gènes sélectionnés initialement pour la caractérisation structurale, j'ai néanmoins tenté d'en effectuer une caractérisation structurale. Malheureusement, le projet n'a pas pu aboutir du fait de la faible expression de DCLK3 en système bactérien et par le manque de temps pour l'exploration d'autres systèmes d'expression.

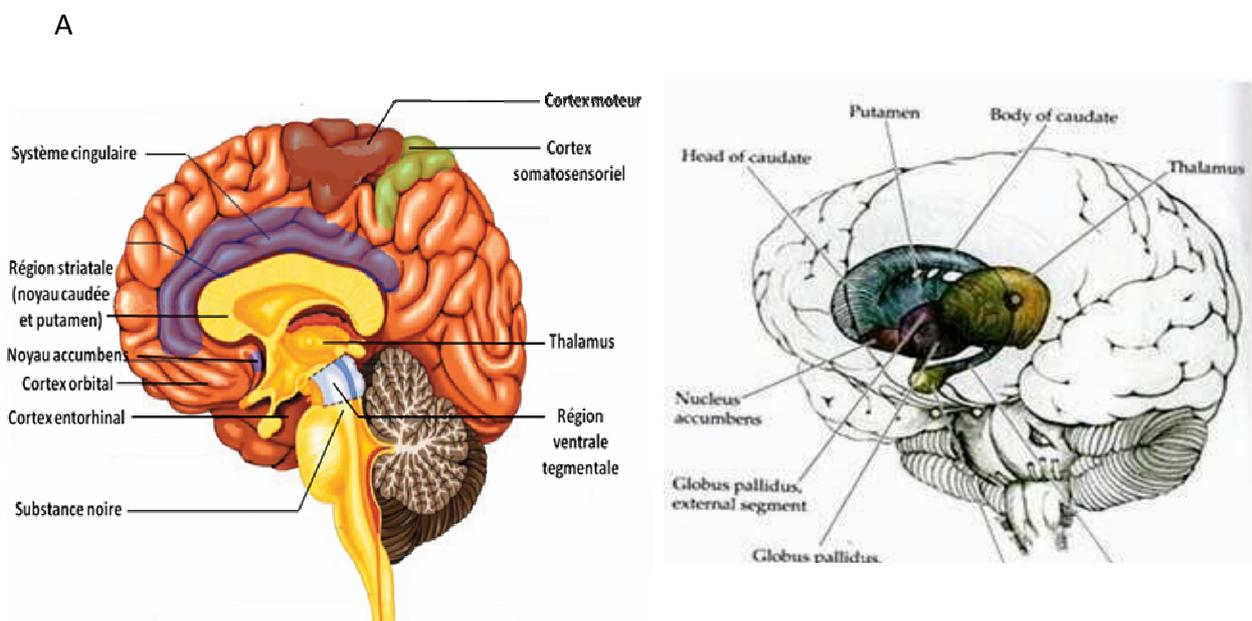
CHAPITRE 1

INTRODUCTION

A. ANATOMIE DU CERVEAU ET NEUROPATHOLOGIES

A.1. Anatomie des régions cérébrales étudiées

Le point commun des 11 régions étudiées, est leur lien anatomique ou leur appartenance aux GB, appelés également noyaux gris centraux (Figure 1). Les GB sont l'ensemble des noyaux siégeant en profondeur dans le cerveau antérieur, comprenant le striatum (le noyau caudé et le putamen), le globus pallidus (externe et interne), le noyau sous-thalamiques et la substance noire (pars reticulata). Son organisation paraît complexe à la fois par la multiplicité des connexions et par la diversité des neurotransmetteurs impliqués (la dopamine, le GABA, l'acétylcholine, le glutamate).



B

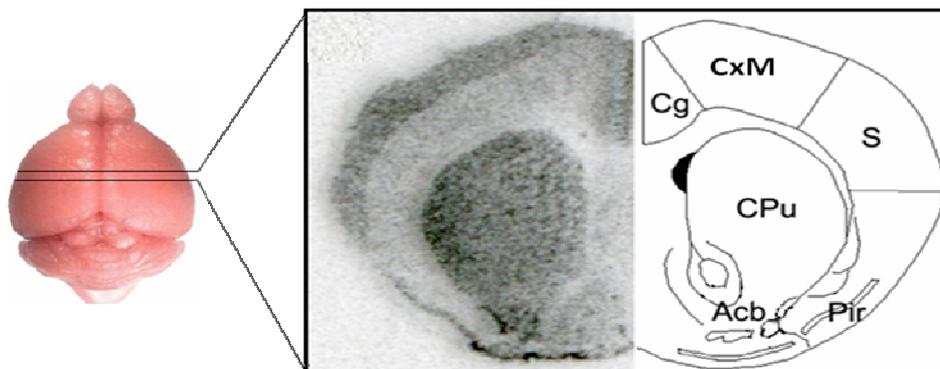


Figure 1 : Représentation de l'anatomie des ganglions de la base et des structures associées du cerveau humain (A) et de souris (B). Dans le cerveau humain, le schéma de droite permet de localiser les onze régions cérébrales étudiées et le schéma de gauche représente le putamen et le noyau caudé (forme de croissant : tête, corps et queue, indiqués en bleu). La jonction entre le striatum (putamen et noyau caudé) et le noyau accumbens est représentée en rouge. Le globus pallidus, segments externe et interne, est représenté en mauve. D'après Blumenfeld 2002. Dans le cerveau de souris, il n'existe pas de structure anatomique caractéristique du putamen et du noyau caudé, le striatum représente une structure anatomique unique. Les abréviations correspondent à : (S) cortex somatosensoriel, (CPu) caudate-putamen, le striatum, (Cg) Cortex cingulaire, (CxM) cortex moteur, (Pir) cortex pyriforme (région olfactive), (Acb) noyau accumbens. Tirée d'une communication scientifique de Laurie Galvan, 2010 et du site web : <http://mouse.brain-map.org>.

Les GB sont impliqués dans des aspects supérieurs, cognitifs et émotionnels, du contrôle moteur par la planification des stratégies motrices en relation avec l'état interne du sujet. Par conséquent, il fait intervenir différentes régions provenant de trois principaux circuits qualifiés de : sensori-moteur (le thalamus, le cortex moteur et somatosensoriel), associatif (le striatum, la substance noire, cortex enthorinal, orbital) et limbique (cortex cingulaire, cortex prélimbique, noyau accumbens, région ventrale tegmentale). Pour la plupart, ces circuits ne sont pas strictement associés à la motricité, mais sont impliqués dans la mémorisation des habilités motrices (Striatum), dans les processus émotionnels (région limbique) et dans le traitement des processus cognitifs (cortex associatifs).

Toutes ces connexions constituent une « boucle motrice » qui est présentée d'une façon simplifiée (Figure 2), c'est-à-dire n'impliquant que les connexions et les neurotransmetteurs qui sont à l'origine des dysfonctionnements pathologiques d'Huntington et de Parkinson.

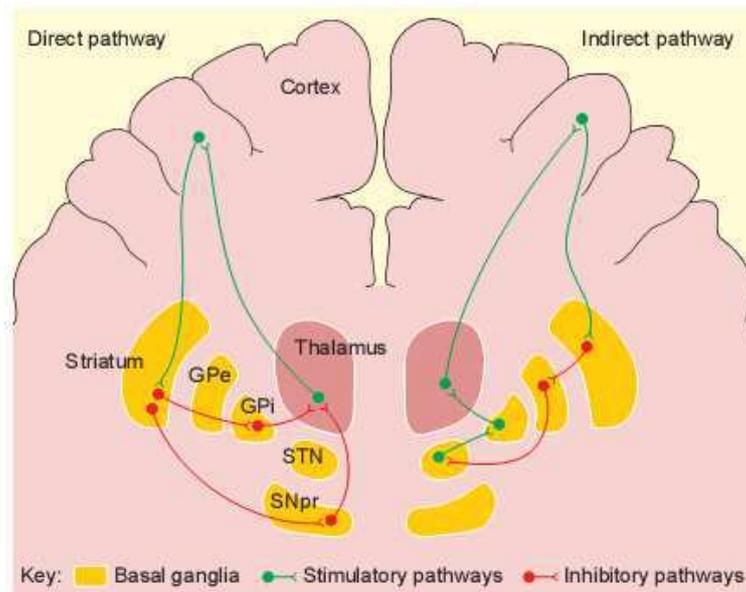


Figure 2 : Schéma d'une coupe frontale du cerveau humain représentant les connexions de la boucle motrice au sein des ganglions de la base. Deux voies sont possibles dans cette « boucle motrice », une voie qualifiée de « directe » et une voie dite « indirecte ». SNpr : substance noire pars reticulata, GPe : Globus pallidus externe, GPI : Globus pallidus interne, STN : noyau sous-thalamique. D'après Andrews et al., 1998

Sur le plan fonctionnel, la boucle motrice débute depuis le cortex vers les GB, où le striatum constitue la voie d'entrée tandis que le globus pallidus (externe et interne) et la zone réticulée de la substance noire constituent les noyaux de sortie ; les influx issus du striatum gagnent, *via* le globus pallidus, le thalamus et, de là, reviennent au cortex. Une région particulièrement importante dans ce phénomène de canalisation des informations est le striatum. Il est situé à un point stratégique de la « boucle motrice » car il reçoit des informations de différentes aires du cortex cérébral et il les restitue (par l'intermédiaire du globus pallidus et de la substance noire) aux noyaux thalamiques et aux aires motrices corticales impliquées dans l'exécution des mouvements.

Le striatum reçoit des projections dopaminergiques à partir de la partie compacte de la substance noire. Il est sous la dépendance directe du néocortex et intervient dans des opérations relatives à l'habileté motrice. De ce fait, le striatum représente une structure critique pour la mémoire procédurale impliquée dans la formation des habiletés motrices. A côté de cela, le striatum est également impliqué dans des processus émotionnels (cortex limbique) et cognitifs (cortex associatif) par l'intermédiaire de projections glutamatergiques

provenant de ces régions. De plus, le striatum constitue la première région atteinte de neurodégénérescence dans la MH et de dysfonctionnement dans la MP.

A.2. Neurodégénérescence du striatum

A.2.1. Maladie d'Huntington

La MH est une anomalie neurodégénérative héréditaire, autosomale-dominante qui fait parti des 14 maladies dites à expansion du trinuéclotide CAG (codant pour le résidu glutamine) dont l'amyotrophie bulbo-spinale (SBMA pour *Spinal and Bulbar Muscular Atrophy*), due à une mutation du gène codant pour le récepteur androgène qui comporte également une expansion anormale du trinuéclotide CAG (Banno et al., 2009). L'origine moléculaire de la MH est une mutation dominante sur un gène qui code pour une protéine de haut poids moléculaire (350 kDa), dénommée Huntingtine (Htt). Cette mutation est localisée au niveau de l'exon 1 du gène codant pour la protéine Huntingtine mutée (mHtt). La conséquence est une répétition anormale du trinuéclotide CAG codant pour au moins quarante résidus glutamines (expansion polyQ localisée à l'extrémité N-terminale de la Htt), alors que la protéine normale possède entre 10 et 34 résidus glutamines.

Les symptômes de la MH sont des mouvements et des postures involontaires et anormaux (chorée, dyskinésie et dystonie), de la jambe, du torse et de la face. Des troubles du langage (dysarthrie) sont souvent observés. Les autres symptômes de démences correspondent à des troubles psychiatriques et de l'humeur, ainsi que des déficits cognitifs. Ces troubles sont caractérisés par des atteintes de la planification et de l'adaptation ainsi qu'une atteinte de la perception de l'environnement par le malade. Avec la progression de la maladie, la rigidité motrice et la démence prédominent. La maladie est fatale entre 15 et 20 ans après l'apparition des premiers symptômes.

La Htt sauvage est une protéine ubiquitaire présente dans de nombreuses régions cérébrales et dans de nombreux tissus périphériques et cette distribution n'est pas modifiée en présence d'Huntingtine mutée (Aronin et al., 1995). La fonction physiologique de la protéine n'est pas totalement connue, mais de nombreux arguments suggèrent qu'elle joue un rôle prépondérant dans les voies de survie cellulaire. La perte d'un allèle sauvage chez les patients pourrait ainsi créer, par "perte de fonction", un effet délétère ou du moins

fragilisant sur les neurones. Néanmoins, son expression ubiquitaire n'explique pas l'atteinte sélective de la région striatale, en particulier, les neurones GABAergiques du putamen projetant vers le globus pallidus (Figure 3).

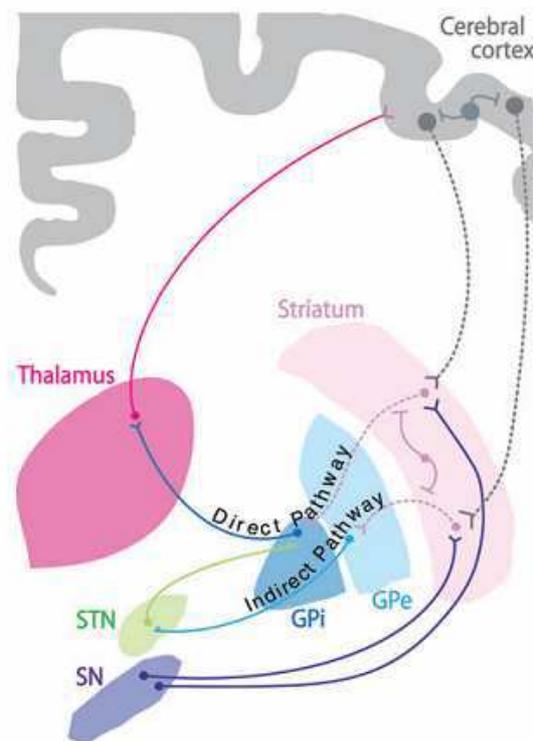


Figure 3 : Principales connexions GABAergiques du putamen projetant dans le GPe et GPi (indication en pointillé mauve) et glutamatergiques du cortex projetant dans le striatum (indication en pointillé gris) de la boucle motrice chez des patients atteints de la MH. Abréviations : (SN) substance noire, (GPe) Globus pallidus externe, (GPi) Globus pallidus interne, (STN) noyau sous-thalamique. D'après Han et al., 2010

Le profil d'expression de mHtt n'est pas corrélé avec l'augmentation de la vulnérabilité d'une population neuronale spécifique du striatum et du cortex moteur. Cette perte sélective d'une population neuronale est suggérée comme le résultat d'une vulnérabilité sélective de ces cellules par un gain d'une fonction toxique associée à l'expansion polyQ anormale dans la protéine mHtt. La mutation de la Htt génère des changements de conformation et une propension à l'agrégation (par la nature relativement hydrophobe du segment polyQ). La présence d'inclusion intranucléaire et d'agrégats cytoplasmiques sont des caractéristiques importantes de la MH. Néanmoins le rôle de ces inclusions et agrégats reste mal compris. Les polymères d'Htt mutée, relativement solubles seraient les espèces moléculaires toxiques pour les cellules. Les mécanismes physiopathologiques de la MH sont souvent considérés

comme "multifactoriels". En effet de nombreuses fonctions cellulaires sont altérées par la Htt mutée, comme la transcription, le métabolisme énergétique, l'homéostasie du calcium, le transport axonal et la machinerie de la neurotransmission (Damiano et al., 2009). Pourtant, l'effet toxique de l'expansion polyQ de mHtt n'est pas restreint à une population neuronale. Les mécanismes incriminés ne peuvent expliquer à eux seuls la vulnérabilité préférentielle du striatum. L'hypothèse serait que les caractéristiques moléculaires de la population neuronale du striatum pourraient être à l'origine de l'augmentation de sa vulnérabilité associée à la toxicité de mHtt (Han et al., 2010).

A.2.2. Maladie de Parkinson

La MP est associée à une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la région nigrostriatale (liant la substance noire au putamen). Ces fibres nerveuses qui se projettent de la substance noire vers le putamen et le noyau caudé (striatum) sont directement affectées par la diminution du taux de dopamine produit par ces neurones dopaminergiques. Cette diminution de dopamine est à l'origine de la perte du contrôle moteur (Figure 4).

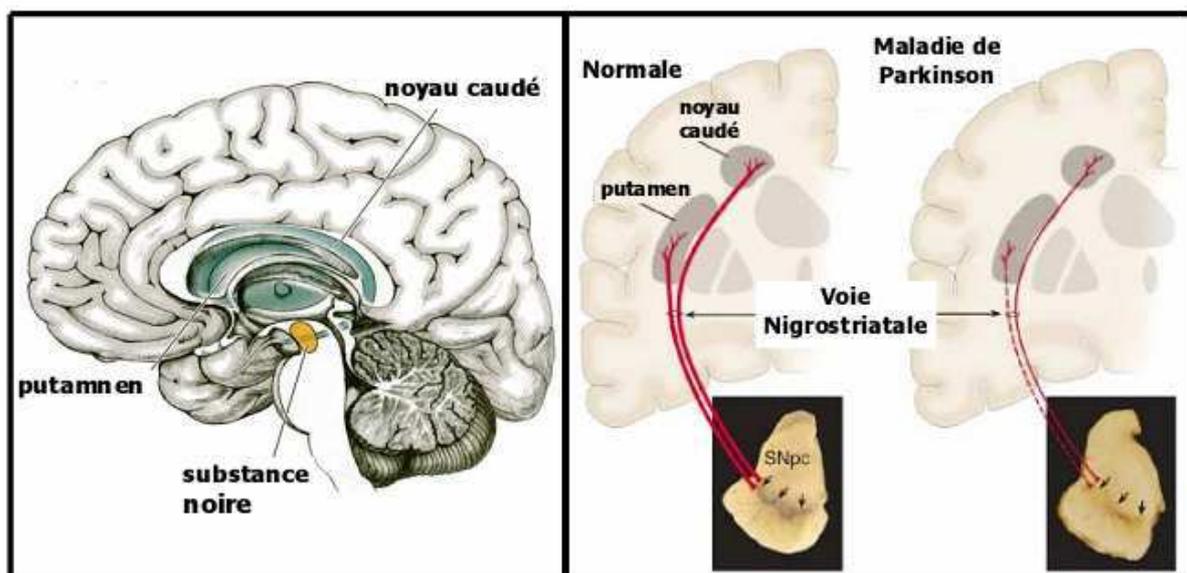


Figure 4 : Représentation schématique de la voie nigrostriatale dans un cas normal et parkinsonien. (A) les différents noyaux qui composent la voie nigrostriatale. (B) fibres dopaminergiques reliant la substance noire (pars compacta, noté SNpc), le putamen et le noyau caudé (striatum). Les photos de la SNpc en condition normale et pathologique montrent la perte de pigmentation de la SNpc dans la MP par l'absence de production

de neuromélanine par les neurones dopaminergiques. Il s'agit d'une des marques histopathologiques de la MP. D'après Dauer et al., 2003.

Dans la majorité des cas, la maladie se déclare d'une façon sporadique, autour de 60 ans. Il existe des formes héréditaires de la maladie qui ne représentent que 5% des cas. Cette lésion de la voie nigrostriée débouche sur la triade symptomatique qui définit le tableau Parkinsonien : l'hypokinésie qui est une réduction considérable de la capacité à réaliser les mouvements, la bradykinésie qui est un ralentissement moteur et l'akinésie qui est une augmentation du tonus musculaire. La manifestation clinique la plus caractéristique de la MP est l'akinésie, une posture voûtée, une rigidité et un tremblement au repos.

Au niveau histopathologique, cette dégénérescence neuronale est caractérisée par la formation d'inclusions cytoplasmiques, dénommées les corps de Lewy. Ces derniers sont principalement localisés dans la substance noire et sont constitués de protéines agrégées, comme cela est le cas dans les autres neuropathologies constituées d'inclusions telles que les maladies à prions et la MH.

Plus de 70 protéines agrégées ont été identifiées dans les corps de Lewy ([Wakabayashi et al., 2007](#)). Parmi ces protéines, on retrouve des protéines mutées dans les formes héréditaires, dites familiales. L'étude de ces formes familiales de la MP est donc essentielle pour comprendre le rôle des protéines mutées dans le développement de la pathologie. Ces protéines semblent être impliquées dans le processus d'activation de l'apoptose en induisant des modifications et des dysfonctionnements moléculaires. Parmi ces protéines, on peut citer l' α -synucléine, LRRK2 et la parkine.

Les traitements actuels pour la MP et la MH, ainsi que pour toutes les autres neuropathologies, sont uniquement palliatifs et ne protègent en aucun cas contre la neurodégénérescence neuronale. La plupart des protéines, impliquées dans ces mécanismes pathologiques, ne sont pas identifiées. La recherche et l'étude de ces protéines, en particulier celles qui sont exprimées au niveau des GB, reste l'une des stratégies les plus prometteuses pour élucider les aspects moléculaires afin de développer des thérapies curatives.

B. DONNEES TRANSCRIPTOMIQUES

La plupart des données transcriptomiques présentées ci-dessous proviennent de l'étude du laboratoire de physiogénomique qui a été publiée par Brochier et al., en février 2008 dans le journal *Physiological genomics*.

B.1. Présentation

L'objectif de cette étude était d'établir un profil quantitatif d'expression de transcrits ARNm enrichis dans différentes régions cérébrales de souris. Cette étude a révélé différents transcrits conservés chez l'Homme et affectés chez des modèles murins d'Huntington et de Parkinson. L'implication de ces transcrits dans des mécanismes pathologiques pourrait constituer une bonne piste pour l'identification de nouveaux biomarqueurs pour ces neuropathologies. Grâce à la technique SAGE, l'équipe de Saclay a collecté des données quantitatives de transcriptomique pour onze régions cérébrales de souris sauvages adultes qui sont ; les cortex - orbital, prélimbique, cingulaire, moteur, somatosensoriel, entorhinal - le noyau caudé et le putamen (striatum), le noyau accumbens, le thalamus, la substance noire et la région ventrale tegmentale. Certaines de ces régions, telles que la région striatale et la substance noire compacte, sont les premières touchées dans les neuropathologies. D'autres régions sont rarement prélevées car il s'agit de régions de petite taille. Néanmoins, elles sont impliquées dans des processus émotionnels et cognitifs indispensables à la planification du mouvement, par exemple, la région du cortex cingulaire, le noyau accumbens et la région ventrale tegmentale.

L'étude a abouti à plus de 1,2 million de tags ADNc séquencés. La plus grande partie de ces transcrits sont très peu caractérisés et 20 % n'ont aucune annotation fonctionnelle dans la littérature. Par conséquent, ces données constituent de précieuses ressources pour explorer les fonctions cérébrales à l'état physiologique et pathologique.

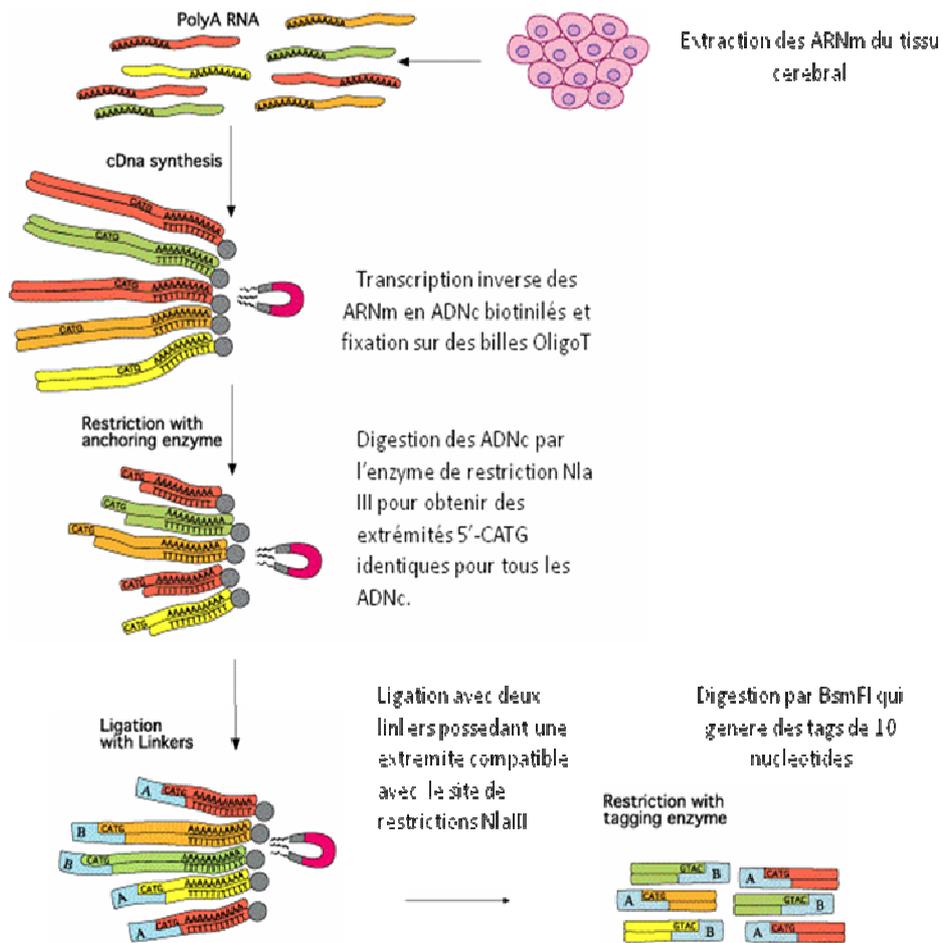
Les résultats de l'étude concernant les gènes suivants : *Vash2*, *Frmd6*, *Stac2*, *Gm705*, *Sh2d5*, *Dbn1*, *Dcl3*, *Crym*, sont présentés ci-dessous. Ils font parti de la liste de gènes sélectionnés pour mon projet de thèse. Pour une meilleure compréhension des résultats, je présente brièvement le principe de la technique SAGE.

B.2. La technique SAGE

Les études transcriptomiques permettent une étude comparative de profils d'expression génique de régions cérébrales entre des malades et des individus sains ou des animaux modèles et contrôle. Il y a quelques années, l'émergence de nombreuses investigations à grande échelle, telles que le séquençage du génome, ont été bénéfiques pour l'exploration des profils d'expression de régions cérébrales de souris adultes. Des stratégies variées ont été développées, comme l'analyse par biopuces de régions cérébrales, les techniques d'imagerie telle que l'IRM fonctionnelle, l'hybridation *in situ* à haut débit, la qRT-PCR, la transfection de gène par vecteurs viraux dans des régions cérébrales données, etc...

La technique SAGE fait parti de ces moyens techniques d'exploration des profils d'expression génique afin d'en déduire les fonctions moléculaires du cerveau. Elle permet l'analyse quantitative de la fréquence d'expression des ARNm d'une région cérébrale. Le niveau de sensibilité de cette technique permet l'analyse de tous les transcrits sans sélection préalable de gènes connus. Ce qui permet de découvrir des gènes inconnus.

Le principe de cette méthode repose sur le séquençage d'un court fragment d'oligonucléotides (appelé étiquette ou « tag ») de chacun des transcrits obtenus à partir du tissu d'origine. Les détails du principe de cette technique sont schématisés ci-dessous (Figure 5).



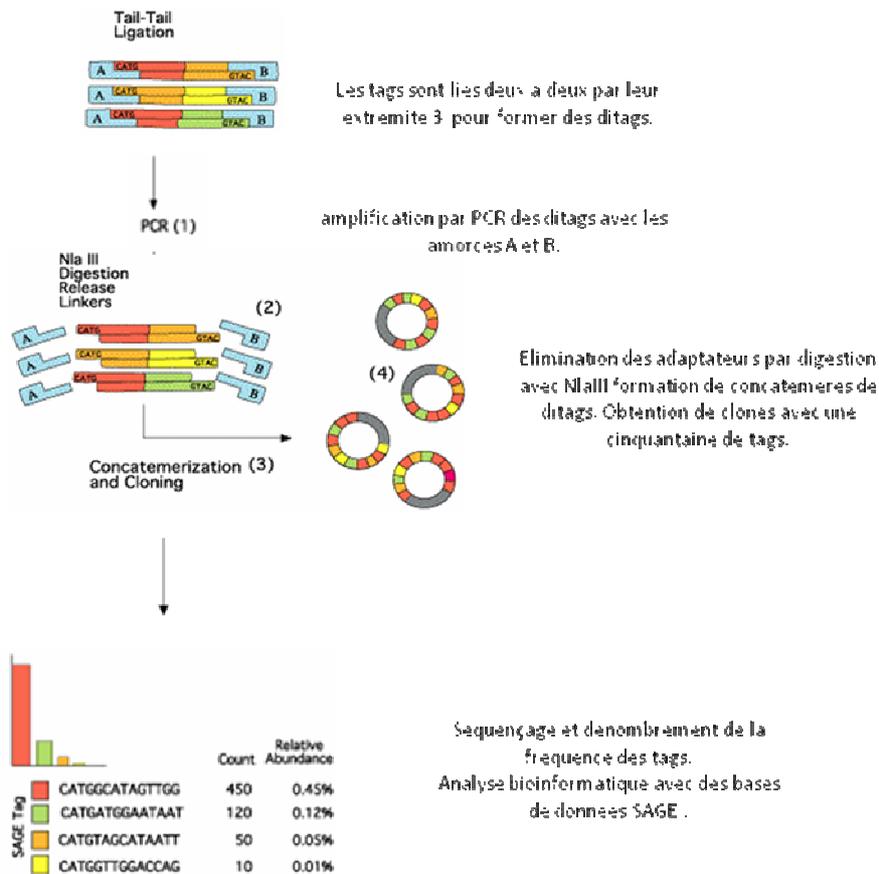


Figure 5 : Synthèse du principe de la technique SAGE. Adapté à partir de Velculescu et al., 1995 et du site web : http://sciencepark.mdanderson.org/labs/ggeg/SAGE_technique.htm.

La technique SAGE a pour avantage d’apporter une quantification relative de chaque transcrit détecté dans les librairies d’une même banque SAGE. Elle constitue, par conséquent, une excellente approche pour une comparaison dynamique du profil d’expression des différents transcrits d’une même banque. Elle permet également de comparer les niveaux d’expression entre des transcrits extrêmement exprimés (par exemple les transcrits codant pour les protéines du métabolisme énergétique) et des transcrits très peu présents dans les cellules étudiées. Enfin, elle offre la possibilité de réaliser un criblage à haut débit de transcrits qui ne sont pas encore annotés voir même référencés.

B.3. Résultats et discussion

Cette étude a généré un total de douze librairies. Chacune correspond au cerveau entier et aux 11 régions cérébrales prélevées chez des souris adultes sauvages. Dans chaque librairie, plus de 60 000 transcrits (ou tags) ont été séquencés, ce qui fait un total de 1 269 681

transcrits pour toutes les librairies. Les auteurs de cette étude ont identifié les transcrits, enrichis dans chaque région étudiée, à l'aide de critères calibrés à partir de marqueurs déjà connus pour ces régions. Au total, 315 transcrits valident ces critères. Cette liste contient 20% de transcrits dont les processus biologiques et la fonction moléculaire ne sont pas connus au niveau du cerveau. Une proportion importante des autres transcrits sont connus pour être des marqueurs, ce qui constitue un bon contrôle pour valider les résultats SAGE. Un grand nombre de ces gènes sont impliqués dans des signaux de transcription de certaines régions cérébrales. Par exemple, des gènes associés à un comportement locomoteur sont significativement surexprimés dans le striatum (le noyau caudé et le putamen), le noyau accumbens, la substance noire et la région ventrale tegmentale, par comparaison avec le génome entier. Le tableau 1 présente 10 transcrits. Huit de ces transcrits font partie des gènes sélectionnés pour mon projet de thèse (Stac2, Sh2d5, Gm705, Dclk3, Crym, Vash2, Dbn1, Gm804) dont la fonction au niveau du cerveau est inconnue. Les deux autres transcrits, la tyrosine hydroxylase (Th) et le récepteur dopaminergique D1A (Drd1a), sont présentés à titre d'exemple de marqueurs connus pour un phénotype de neurones dopaminergiques.

Nom gène	Symbole gène	Nombre de Tags SAGE												Référence
		Cerveau entier	Cortex orbital	Cortex prélimbique	Cortex cingulaire	Cortex moteur	Cortex somato-sensoriel	Cortex entorhinal	Noyau caudé et putamen	Noyau accumbens	Thalamus	Substance noire	Région ventrale tegmentale	
<u>Th</u>	<u>tyrosine hydroxylase</u>	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	28	174*	Georgievska et al., 2002
<u>Drd1a</u>	<u>dopamine receptor D1A</u>	0	0	0	0	0	0	1	7*	4	0	0	0	Gerhard et al., 2004
<i>Stac2</i>	SH3 and cysteine rich domain 2	5	8*	5	5	5	0	0	0	0	0	3	0	Rossner et al., 2003
<i>Sh2d5</i>	SH2 domain containing 5	1	3	2	5	3	16	4	38*	16	7	2	2	Trinidad et al., 2006
<i>Gm705</i>	gene model 705, (NCBI)	2	0	0	0	0	0	0	11*	4	0	1	0	/
<i>Dclk3</i>	doublecortin-like kinase 3	1	0	0	1	1	5	0	8*	5	0	0	1	Ohmae et al., 2006
<i>Crym</i>	crystallin, mu	10	5	19	16	3	4	22	26	45*	0	0	1	Sperbeck et al., 1997
<i>Vash2</i>	vasohibin 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8*	0	1	Carninci et al., 2005
<i>Dbndd1</i>	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1	2	0	1	1	1	0	0	0	1	7*	4	0	Carninci et al., 2005
<i>Gm804</i>	gene model 804, (NCBI)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5*	0	0	/

Tableau 1. Exemples de 10 transcrits enrichis dans des régions cérébrales, détectés par SAGE. Nombre de tags dans le cerveau entier et dans 11 régions cérébrales pour 8 gènes dont la fonction est inconnue et 2 gènes connus comme des marqueurs spécifiques des neurones dopaminergiques (soulignés). Le nombre de tags le plus élevé pour chaque gène est indiqué par une étoile. Adapté à partir de Brochier et al., 2008.

Parmi ces huit gènes inconnus, on distingue trois types de profils d'expression. Des gènes exprimés dans toutes les régions mais avec une expression significativement élevée dans une région comparée aux autres, tels que les gènes *Crym* et *Sh2d5* qui sont, respectivement, surexprimés dans le noyau accumbens et le striatum. Un deuxième groupe de gènes est exprimé dans une ou deux régions. C'est le cas du gène *Gm804* qui est uniquement exprimé dans le thalamus et le gène *Vash2*, dont l'expression est huit fois plus importante dans le thalamus que dans la région ventrale tegmentale. Ils pourraient constituer d'excellents marqueurs thérapeutiques du fait de leur bonne spécificité pour la région thalamique. Enfin, un troisième groupe de gènes qui s'exprime dans plus de deux régions, comme *Dbn1d1* qui s'exprime dans le thalamus et la substance noire mais aussi dans les cortex - prélimbique, cingulaire, moteur - et le noyau accumbens, dans une proportion plus faible.

Pour ces gènes dont le profil d'expression est proche de celui des biomarqueurs connus, des études supplémentaires par hybridation *in situ* et par qRT-PCR ont conforté les résultats obtenus par SAGE. Il a également été montré, par qRT-PCR, que certains des ARNm transcrits tels que *Dclk3*, *Stac2* et *Sh2d5* sont également enrichis dans des régions équivalentes chez l'Homme.

Cette même analyse qRT-PCR a été réalisée chez des souris modèles de la MH (R6/2) et de la MP afin de comparer le profil d'expression de ces gènes inconnus dans des cas pathologiques et sains.

La quantification des ARNm par qRT-PCR chez les souris R6/2 en comparaison avec des souris contrôle a mis en évidence une diminution du nombre de transcrits *Crym*, *Dclk3* chez les souris R6/2 et ce profil transcriptomique est principalement observé dans le striatum qui constitue, au niveau histopathologique, la région la plus touchée dans cette pathologie. Au total, 56 % des transcrits enrichis dans le striatum sont significativement dérégulés dans les souris R6/2 par rapport aux animaux témoins.

Parmi ces gènes, *Gm705* et *Crym* ont été décrits comme étant régulés négativement dans le noyau caudé chez des patients atteints de la MH (Hodges et al., 2006), ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus dans cette étude. Une étude plus récente confirme le

profil d'expression différentiel du gène *Crym* dans les neurones épineux de taille moyenne de la région nigrostriatale (Heiman et al., 2008).

La même analyse comparative de qRT-PCR avec des souris modèles de la MP a montré que 45 % des transcrits analysés dans le striatum ont leur profil d'expression dérégulé en comparaison avec des souris du groupe témoin. Les résultats ont mis en évidence une régulation positive du gène *Dclk3*, 24 heures après intoxication, des souris avec la toxine MPTP. Quant aux gènes, *Crym*, *Sh2d5* et *Gm705*, le traitement au MPTP n'a pas affecté leur profil d'expression.

B.4. Conclusion

Sur les six librairies SAGE de régions cérébrales de souris sauvages, plus de 50 transcrits, non caractérisés auparavant, sont préférentiellement exprimés dans certaines régions cérébrales et pourraient donc constituer de bon marqueurs de ces régions étudiées. Parmi ces gènes, huit (*Stac2*, *Sh2d5*, *Gm705*, *Dclk3*, *Crym*, *Vash2*, *Dbn1*, *Gm804*) font parti des gènes sélectionnés pour ce projet de thèse. Les gènes *Sh2d5* et *Dclk3* pourraient être des marqueurs de la région striatale, *Crym* du noyau accumbens, *Gm804*, *Vash2* et *Dbn1* de la région thalamique et *Stac2* du cortex orbital. Les gènes *Dclk3*, *Stac2*, *Sh2d5*, sont également enrichis dans les régions équivalentes chez l'Homme. Enfin, près de 50 % des transcrits enrichis dans la région striatale (résultats de qRT-PCR chez les souris R6/2 et MPTP) ont leur expression dérégulée dans les deux pathologies. Ceci est en corrélation avec la caractérisation histopathologique qui montre que le striatum est la première région atteinte par les symptômes cliniques caractéristiques de ces deux pathologies.

Ces protéines, à l'origine de cette étude structurale réalisée durant mes travaux de thèse, constituent un potentiel important pour la compréhension des mécanismes moléculaires de ces maladies neurodégénératives et, dans un deuxième temps, dans le développement de stratégies thérapeutiques. L'approche structurale représente l'un des moyens choisis pour la caractérisation moléculaire de ces protéines.

C. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PROTEINE mCRYM

C.1. CRYM : une μ -crystalline avec une fonction de CTBP

La protéine CRYM des mammifères appartient à la famille des μ -crystallines par sa forte homologie de séquence (86%) avec la première μ -crystalline identifiée chez le kangourou. Cette dernière a été identifiée comme une protéine structurale majeure du cristallin chez de nombreux marsupiaux diurnes d'Australie (Wistow et al., 1991). Elle est majoritairement exprimée dans le cristallin et à un niveau plus faible dans la rétine et le cerveau (Kim et al., 1992). L'expression de la μ -crystalline humaine (nommée plus communément hCRYM) a été localisée dans la rétine mais aussi dans le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les reins et dans une proportion plus faible, dans le foie et les poumons. Cette protéine a été identifiée comme étant une Cytosolic T3-Binding Protein (CTBP).

Il a été proposé que la fonction de la protéine CRYM des mammifères (CRYM) serait proche de celle des CTBPs (Kobayashi et al., 1991) dont la fonction est de réguler la concentration intracellulaire de l'hormone 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine libre, T3, la forme active des hormones thyroïdiennes (THs). Néanmoins, aucune activité enzymatique n'a été formellement détectée pour les protéines hCRYM et mCRYM. Par ailleurs, la famille des μ -crystallines appartient également à une superfamille de protéines appelée : les crystallines.

C.2. La superfamille des crystallines : un exemple original d'évolution

La classe taxonomique des crystallines représente un exemple remarquable d'évolution par le recrutement de leurs gènes pour diverses fonctions métaboliques de protéines du stress oxydatif. La caractéristique particulière des crystallines est l'acquisition, pour la plupart, d'une activité enzymatique tout en maintenant leur taxon spécifique de crystallines. Les protéines crystallines représentent 80-90% des protéines structurales solubles du cristallin. Ces différentes crystallines sont impliquées dans les propriétés optiques du cristallin d'espèces terriennes diurnes. Elles regroupent un taxon spécifique de protéines crystallines qui diffèrent d'une espèce à une autre par leur expression (dans le cristallin mais aussi dans d'autres organes comme le foie, les reins, le cerveau, la rétine...) et leurs fonctions, par exemple, les protéines déshydrogénase/ ϵ -crystalline et α -enolase/ τ -crystalline sont chacune

codées par une copie unique de gènes. Ces derniers codent des enzymes qui ont acquis la fonction de cristallines sans perdre leur activité catalytique.

Les protéines cristallines contribuent à la transparence du cristallin et affecte la réfraction de la lumière en formant un gradient de concentration uniforme, avec une forte concentration localisée au centre du cristallin. Certaines cristallines semblent également séquestrer le cofacteur NADPH dans le cristallin, d'espèces diurnes, pour éviter l'oxydation du cristallin et pour filtrer les radiations UV. La structure et la fonction du cristallin est sensiblement similaire pour la plupart des espèces. Cependant, des études comparatives ont révélé des hétérogénéités et une diversité parmi les protéines cristallines qui composent le cristallin (Wistow and Piatigorsky 1988). En effet, de nombreuses espèces expriment différentes protéines cristallines dans leur cristallin. Ces cristallines ont subi une divergence d'évolution qui a conduit à des protéines avec une perte de leur fonction structurale au niveau du cristallin due à leur localisation hors du cristallin, et ceci, tout en conservant leur taxon spécifique de cristallines. Cette évolution a parfois conduit à l'acquisition d'une activité enzymatique comme déjà évoqué (tableau 2). Les mécanismes génétiques à l'origine de cette diversité ne sont pas encore connus et représentent un exemple intéressant d'évolution.

Crystalline	Organismes	[apparentée] ou Identique
<u>Crystallines ubiquitaires du stress</u>		
α	tous les vertébrés	Petites protéines du choc thermique (αB) [Antigène de <i>Schistosoma mansoni</i>]
β	tous les vertébrés	[Protéine 5 de <i>Myxococcus xanthus</i>]
γ		[Sphérulline 3a de <i>Physarum polycephalum</i>]
<u>Enzymes ayant conservées le taxon-spécifique des cristallines</u>		
δ	la plupart des oiseaux, reptiles	Argininosuccinate lyase (δ2)
ϵ	crocodiles, certains oiseaux	Lactate déshydrogénase B
ζ	Cochon, chameau, lama	NADPH : quinone oxydoréductase
η	Musaraigne-éléphant	Aldéhyde déshydrogénase I
λ	Lapins, lièvres	[Hydroxyacyl CoA déshydrogénase]
μ	Kangourou	[Ornithine cyclodésaminase] [Alanine déshydrogénase d' <i>Archaeoglobus fulgidus</i>]
ρ	Grenouille Rana	[Réductase NADPH-dépendante]
τ	Lamproie, tortue, modérément abondante dans la plupart des vertébrés	α-Enolase
S	Céphalopodes	[Glutathion-S-transférase]
Ω	Pieuvre	[ALDH]
J	Méduse Cubomedusae	?

Tableau 2 : La famille des cristallines et leurs relations ou appartenances à des enzymes. La plupart de ces enzymes sont des protéines du stress oxydatif. D'après Wistow 1993.

L'arbre phylogénétique de certaines familles de cristallines montre une divergence importante entre la famille des μ -cristallines et les autres familles de cristallines. En effet, les μ -cristallines sont apparues à la fin du jurassique-début du crétacé, d'une manière plus précoce que les autres familles de cristallines (η , γ , λ , ζ) qui sont apparues à la fin du crétacé (Figure 6). Parmi ces familles, certaines, comme les η -cristallines, sont des enzymes du type Aldéhydes déshydrogénases de classe I. C'est également le cas des ζ -cristallines qui sont des NADPH quinones déshydrogénases. A l'inverse, des cristallines, provenant du même embranchement (ancêtre commun), ne possèdent pas de fonction enzymatique bien qu'elles possèdent une homologie avec certaines enzymes de la famille des λ -cristallines qui sont proches des Hydroxyacyl CoA déshydrogénases. Enfin, d'autres cristallines ne possèdent pas de lien avec des enzymes comme la famille des γ -cristallines ou bien les α -cristallines qui ont été identifiées comme des protéines du choc thermique (Tableau 2). Par conséquent, l'évolution de la superfamille des cristallines a abouti à la fois à des enzymes mais également à des protéines sans activité enzymatique ayant davantage une fonction structurale comme celle décrite pour les protéines cristallines constitutives du cristallin.

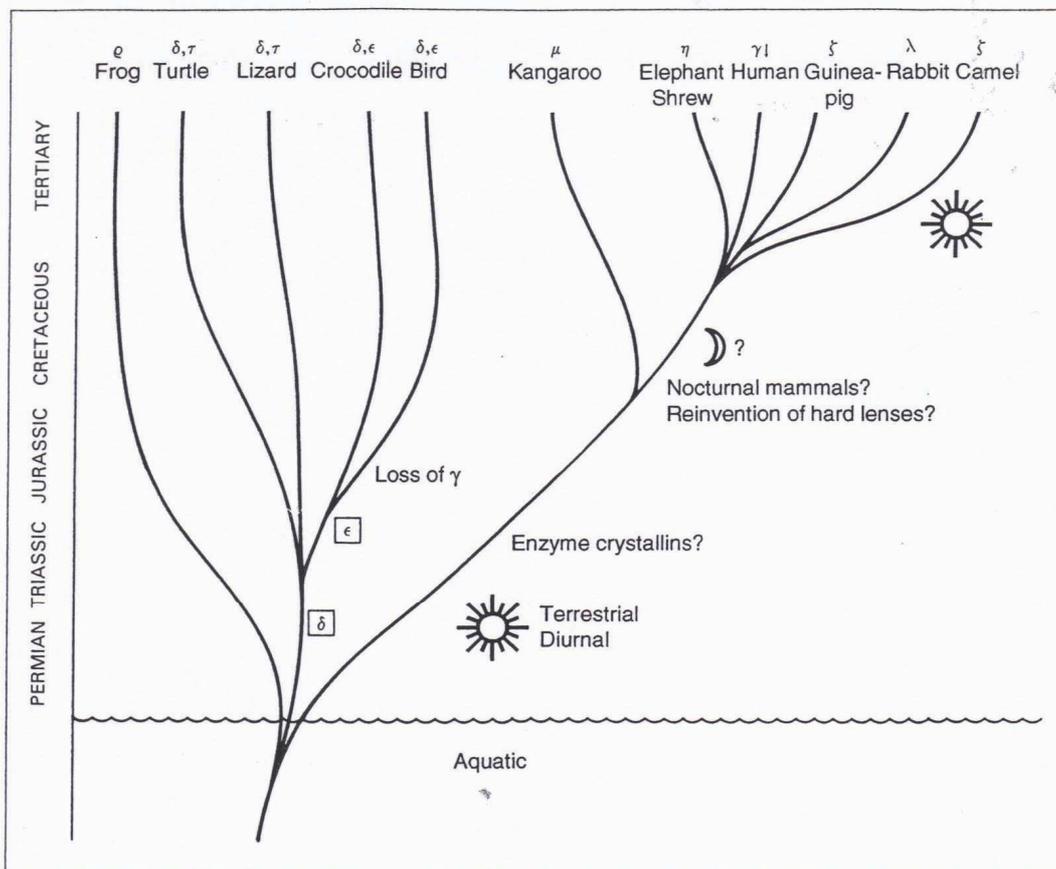


Figure 6 : arbre phylogénétique de la famille des crystallines. L'échelle de temps avec les grandes périodes géologiques est représentée verticalement, la période actuelle est présente en haut. Pour chaque lignée de vertébrés, il est indiqué les changements de l'environnement visuel : aquatique, diurne, nocturne. D'après Wistow 1993.

Le recrutement des gènes crystallines pour de nouvelles fonctions enzymatiques ou structurales est à l'origine de cette grande diversité de fonctions, mais aussi de localisation et autres caractéristiques, au sein de cette superfamille. Les protéines μ -crystallines constituent l'une des familles des crystallines qui reflètent bien cette diversité.

C.3. Les CTBPs : fonction enzymatique et/ou fonction structurale ?

Les Cytosolic-Thyroid-Hormone-Binding Proteins (CTBPs) ont de multiples caractéristiques dépendantes des espèces et des tissus. Elles diffèrent par leur taille, leurs propriétés de fixation des THs et leurs localisations (Tableau 3).

Espèces/tissus	Poids moléculaire (kDa)	Kd (nM)	Ka ($\times 10^9$ M ⁻¹)	Autres caractéristiques	Références bibliographiques
Mammifères					
Homme /globule rouge	200	~1	~1	Sensible au froid	Fanjul et al., 1991
	200	~0.1	~10	Sensible au froid	Fanjul et al., 1991
	60	~1	~1	Sensible au froid	Fanjul et al., 1991
	25	~10	~0.1	Sensible au -SH bloquant	Fanjul et al., 1991
Homme /carcinome de la thyroïde	58 (monomère)	17	0,05	Pyruvate kinase de sous-type M2	Kitagawa et al., 1987 Kato et al., 1989
Homme/ reins	70 (dimère)	0,5	2	hCRYM NADPH dépendante	Vie et al., 1997
Chien /foie Reins	70	0,5 et 11*	2 et 0,09*	/	Davis et al., 1974
		43	0,02	/	Davis et al., 1974
Rat /cerveau	~70	12*	0,08*	Fortement exprimée à la naissance	Lennon et al., 1980
	~58 (monomère)	0,6	1,7	NADPH dépendante	Lennon et al., 1992
Rat /cerveau de fœtus	—	0,7 et 10	1,4 et 0,1	/	Francon et al., 1985
Rat/foie	50 (dimère)	0,8-5	1,25-0,2	Glutathion-S-transférase	Ishigaki et al., 1989
	76 (dimère)	0,4	2,5	CRYM NADPH dépendante	Kobayashi et al., 1991
Rat/reins	58 (monomère)	0,4	2,5	NADPH dépendante	Hashizume et al., 1989
Amphibiens					
Grenouille taureau /têtard	60	140	0,007	Dépendante d'ion métallique	Yoshizato et al., 1975 Jaffe 1978
Xenopus /foie	59 (monomère)	4-9	0,25-0,10	Sensible au NAD ⁺ et -SH bloquant Aldéhyde déshydrogénase de classe 1	Yamauchi et al., 1999 Yamauchi et al., 2001

Tableau 3 : Caractéristiques des CTBPs décrites dans les différentes espèces. Les valeurs de K_d et K_a marquées par * sont celles de la T4 et les autres valeurs sont celles de la T3. Les CTBPs NADPH dépendantes nécessitent la présence de NADPH pour la fixation de la T3. Adapté de Yamauchi et al., 2001.

Les poids moléculaires (PM) des CTBPs des différentes espèces varient entre 25 et 200 kDa et les constantes d'affinité (K_a) pour la T3 sont très variables, entre 10^{10} et 10^7 M^{-1} . Chez une même espèce, on peut trouver différentes CTBPs. Par exemple, chez l'Homme, la protéine CTBP identifiée dans le carcinome de la thyroïde est un monomère ayant une activité pyruvate kinase de sous-type M2 alors que dans les reins, on retrouve la protéine hCRYM, homologue à la μ -crystalline de kangourou. Dans la fraction cytosolique du foie de rat, deux types de CTBPs de PMs de 50 et 76 kDa ont été identifiées indépendamment. La CTBP de 50 kDa est une glutathion-S-transférase et celle de 76 kDa est la protéine hCRYM, qui semble être une CTBP-NADPH dépendante. Une autre CTBP-NADPH dépendante, de 58 kDa a été identifiée dans les reins de rat. Pour la plupart de ces protéines CTBPs-NADPH dépendantes, aucune activité enzymatique n'a été mise en avant. Hashizume et collaborateurs (1989) ont proposé un modèle de mécanisme d'action pour ces CTBPs-NADPH dépendantes qui a été confirmé par d'autres études (Vie et al., 1997 ; Lennon et al., 1992). Ce modèle, illustré sur la figure 7, propose une régulation et un transport nucléaire de la T3 libre par l'intermédiaire des cofacteurs NADPH et NADP^+ . La forme cytoplasmique de ce type de CTBPs est un complexe de NADPH et T3 et constitue la forme active qui est capable de fixer la T3 et donc d'inhiber son action nucléaire en la séquestrant dans le cytoplasme. Contrairement aux protéines plasmatiques des mammifères qui fixent les THs (TH-Binding Proteins, THBPs), les CTBPs ont généralement une plus forte affinité pour la forme active T3 que pour la forme circulante T4. Par conséquent, la forme active des THs, la T3, sera préférentiellement fixées par les CTBPs. Ces dernières sont capables de transporter la T3 au niveau du noyau. Il a été suggéré (Hashizume et al., 1989) que la forme nucléaire des CTBPs NADPH-dépendante correspond à la forme inactive, qui fixe préférentiellement le NADP^+ . Cette forme inactive n'est pas capable de fixer la T3, ce qui permet sa libération, au niveau du noyau, et sa fixation au niveau des récepteurs thyroïdiens (TRs). Ce mécanisme d'action suggère un double rôle des CTBPs : de stockage de la T3 au niveau du cytoplasme et de transport du cytoplasme vers le noyau (Figure 7). Cependant, le mécanisme de transport actif vers le noyau ainsi que la conversion du NADPH en NADP^+ ne sont pas encore élucidés.

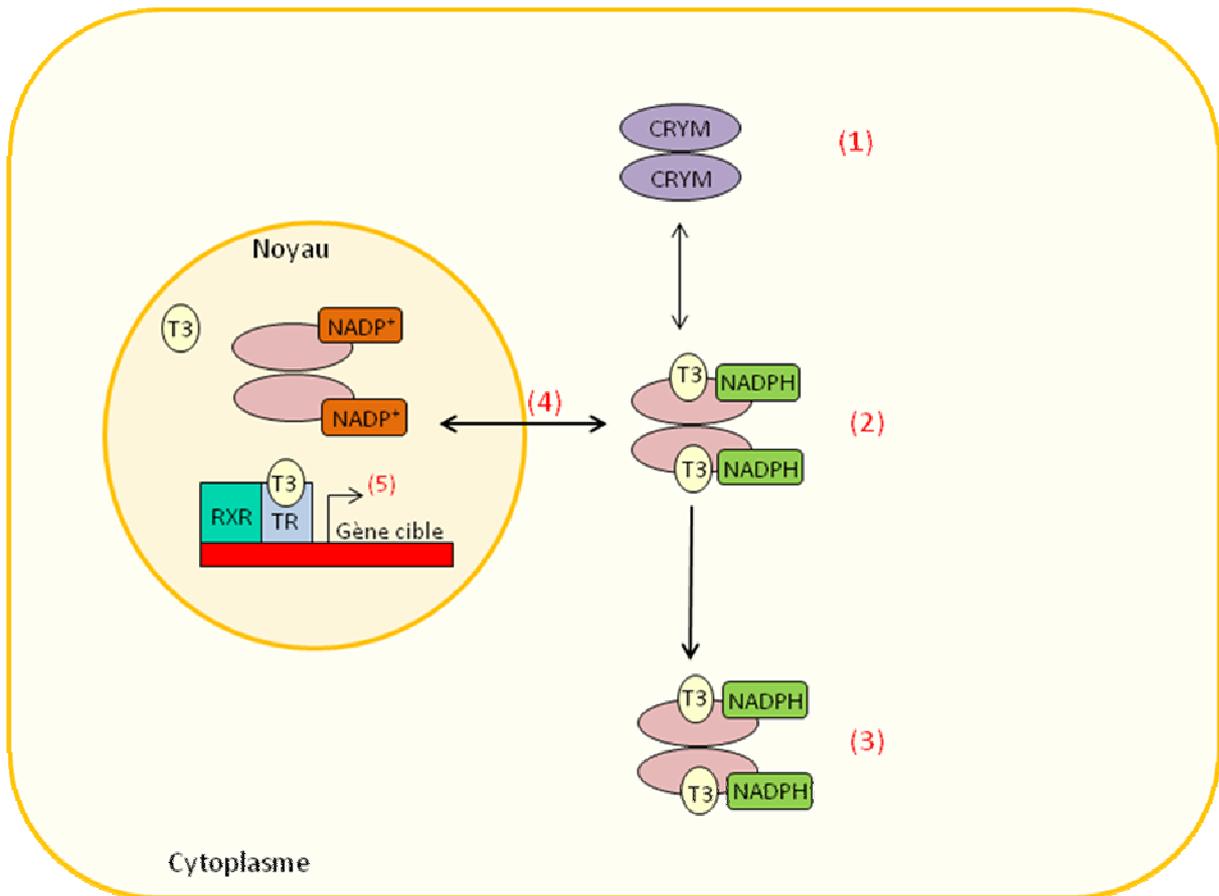


Figure 7 : Schéma représentant la forme cytoplasmique (active) et nucléaire (inactive) des CTBPs-NADPH dépendantes. (1) Dimère CRYM, forme apo ; (2) Dimère CRYM, forme active, complexée au NADPH et à la T3 ; (3) Inhibition de l'action nucléaire de la T3 par son stockage dans le cytoplasme ; (4) Transport actif de la T3 du cytoplasme vers le noyau ; (5) Libération de la T3 dans le noyau par la forme inactive de CRYM correspond au dimère CRYM complexé au NADP⁺. Cette forme inactive de CRYM libère la T3 qui se fixe sur les récepteurs thyroïdiens (TRs). Ces derniers forment un hétérodimère avec les récepteurs des rétinoïdes (RXR) qui permettent l'activation de la transcription des gènes sous le contrôle de ces facteurs de transcription. D'après Hashizume et al., 1989.

Chez les amphibiens, une CTBP- ion métallique dépendante, de 60 kDa a été identifiée chez la grenouille taureau. Une autre CTBP, celle du Xénope, possède une activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH, appelée ALDH/CTBP). Cette dernière est capable, d'une part, de catalyser l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque et, d'autre part, de réguler la concentration intracellulaire de T3 libre, de la même façon que ses homologues chez les mammifères, les aldéhydes déshydrogénases de classe I et VI (Yoshida et al., 1998). Yamauchi et collaborateurs (2001) proposent un modèle qui présente un mécanisme

commun entre les voies de signalisation des THs et des rétinoïdes, impliquant l'ALDH/CTBP du Xénope dans ces deux voies de régulation. Ces dernières présentent des caractéristiques communes. Les THs et les rétinoïdes sont des molécules hydrophobes, bien qu'il y ait des différences fondamentales entre les deux molécules ; les THs sont synthétisées dans les glandes thyroïdes comme des hormones, alors que les rétinoïdes sont des provitamines (issus de la vitamine A). Les deux molécules sont transportées, dans la circulation sanguine, par des protéines, THBPs pour les THs (Bartalena et al., 1992) et Retinol-Binding Protein (RBP) pour les rétinoïdes (Berni et al., 1993). De plus, ces deux molécules possèdent des précurseurs, la T4 et le rétinal, qui sont, respectivement, biologiquement moins actifs que la T3 et l'acide rétinoïque (RAR). Dans le cytoplasme, chaque précurseur est activé par des enzymes, les désiodinases (DIs) pour les THs (St. Germain 1994 et 1999) et les alcools déshydrogénases (ADHs) et les aldéhydes déshydrogénases pour les rétinoïdes (Napoli 2000 et 1996). La régulation intracellulaire des THs et des rétinoïdes s'effectue, respectivement, par les Cytosolics T3-Binding Proteins (CTBPs) et les Cellular RA-Binding Proteins (CRABPs) ou Cellular Retinol-Binding Proteins (CRBPs). Certaines études suggèrent une coopération entre ces deux types de protéines régulatrices des THs (CTBPs) et des rétinoïdes libre dans le cytoplasme (CRABPs ou CRBPs). Cette hypothèse est confortée par la CTBP/ALDH1 du Xénope qui interagit avec une protéine CRBP et l'interaction entre ces deux protéines semblent influencer la concentration de RA et T3 libre dans le cytoplasme. Une fois que la T3 et le RA sont adressés au niveau du noyau, ces molécules se fixent sur, respectivement, les récepteurs thyroïdiens (TRs) et les récepteurs d'acide rétinoïque (RARs). Puis, ces deux types de récepteurs interagissent ensemble pour former un facteur de transcription hétérodimérique-ligand dépendant. Les deux types de récepteurs appartiennent à la même superfamille de récepteurs nucléaires, incluant les récepteurs stéroïdiens et de la vitamine D (Figure 8).

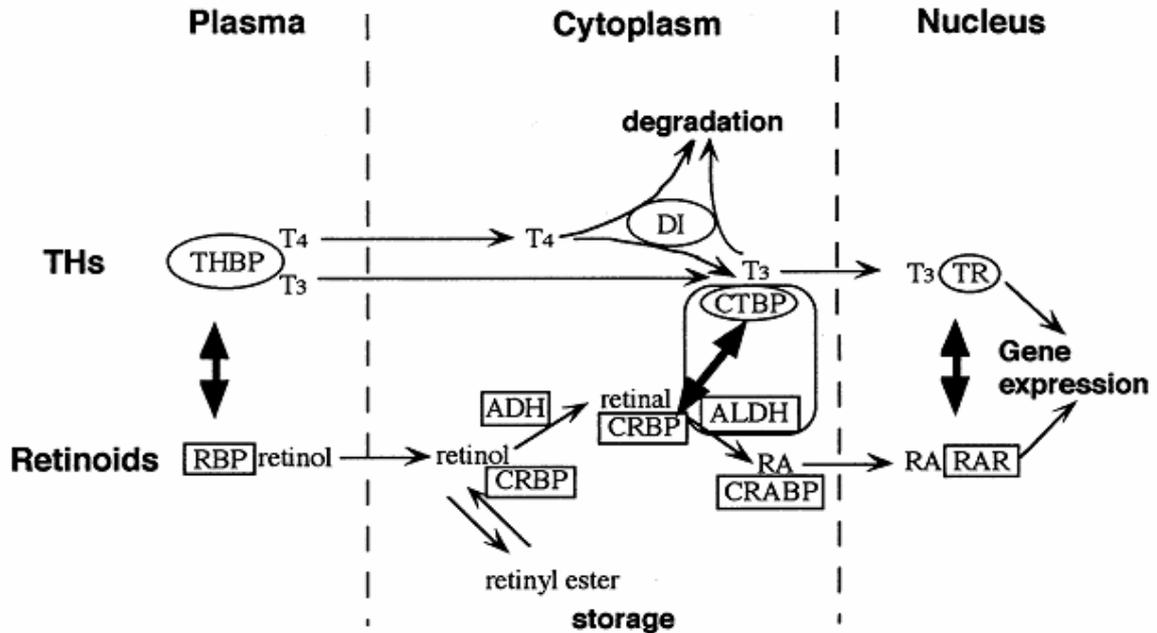


Figure 8 : Voies de signalisation des THs et des rétinoïdes. Les protéines impliquées dans les voies de signalisation des THs et des rétinoïdes (indiquées par des flèches en gras) sont localisées dans le milieu extracellulaire (plasma) et le milieu intracellulaire (le cytoplasme et le noyau). La présence de CRBPs, CRABPs et CTBPs dans une même cellule est possible pour certains cas. THs, hormones thyroïdiennes ; THBP, Thyroid Hormone-Binding Protein ; RBP, Retinol-Binding Protein ; DI, désiodinase ; CTBP, Cytosolic TH-Binding Protein ; RA, acide rétinoïque ; CRBP, Cellular Retinal-Binding Protein ; CRABP, Cellular RA-Binding Protein ; ADH, Alcool déshydrogénase ; ALDH, aldéhyde déshydrogénase ; TR, récepteur thyroïdien, RAR, récepteur à l'acide rétinoïque. D'après Yamauchi et al., 2001.

La protéine CTBP/ALDH du Xénope a besoin de fixer le NAD^+ pour avoir l'activité d'aldéhyde déshydrogénase et la fixation du NAD^+ inhibe la fixation de la T3 sur cette protéine. Inversement, lorsque la protéine fixe la T3, ceci induit l'inhibition de l'activité ALDH. Par conséquent, la protéine CTBP/ALDH est capable soit d'avoir son rôle de CTBP (en fixant la T3 sans le NAD^+), soit d'avoir son rôle d'ALDH (en fixant le NAD^+ et le rétinal). La concentration intracellulaire en NAD^+ est donc un facteur important pour moduler les deux fonctions de cette protéine.

L'extrême diversité des CTBPs, dans leur PM, la valeur de K_a pour la T3 et la T4, indique que les CTBPs des différentes espèces n'ont pas toujours de lien entre elles. Encore plus surprenant, certaines espèces, possèdent différents types de CTBPs dans un même tissu. Cette diversité des CTBPs rend difficile la distinction entre elles.

Cette classification des caractéristiques moléculaires et de régulation de la T3 par ces CTBPs permet une distinction de quatre principales classes de CTBPs qui sont les suivantes :

- Les CTBPs-NADPH dépendantes (Hashizume et al., 1989) qui ne semblent pas posséder d'activité enzymatique et dont le mécanisme d'action fait intervenir une forme active, localisée dans le cytoplasme, (CTBPs complexées au NADPH et à la T3) et une forme inactive, localisée dans le noyau (CTBPs complexées au NADP⁺).
- Les CTBPs avec une activité pyruvate kinase de sous-type M₂. Cette sous-unité est un monomère (p58-M²) capable de fixer la T3 mais dès que cette sous-unité s'oligomérise en tétramère (PKM²), elle n'est plus capable de fixer la T3. La régulation de l'interconversion monomère- tétramère s'effectue par le glucose via le fructose 1,6-bisphosphate. La diminution de glucose favorise la forme monomérique qui fixe la T3, la forme favorable à l'action nucléaire de la T3 (Ashizawa et al., 1992).
- Les CTBPs qui possèdent une activité glutathion-S-transférase (GST). L'activité GST est inhibée par la fixation de la T3 (Ishigaki et al., 1989).
- Les CTBPs avec une activité aldéhyde déshydrogénase. L'ALDH/CTBP du Xénope (Yamauchi et al., 1999) présente une forte homologie de séquence avec les enzymes ALDH1 et ALDH6 des mammifères. Cette ALDH/CTBP du Xénope possède une double fonction (non simultanée), d'une part, la fixation de la T3 (en absence de NAD⁺) et, d'autre part, une activité aldéhyde déshydrogénase, qui est capable de convertir le rétinol en acide rétinoïque (en présence de NAD⁺).

Ces classes de CTBPs ne présentent aucune homologie de séquences primaires entre elles. Pourtant, la plupart ont un point commun, la fixation d'un substrat, dérivé d'un acide aminé, et d'un cofacteur redox : NADPH ou NAD⁺. La protéine CRYM de mammifères semble appartenir à la classe des CTBPs-NADPH dépendantes (Vie et al., 1997), pour laquelle aucune protéine ne semble posséder d'activité enzymatique.

Ainsi une question importante se pose au regard de la localisation préférentielle de la protéine mCRYM dans le striatum au niveau du système nerveux central : La protéine mCRYM a-t-elle les mêmes propriétés de fixation de la T3 que son homologue hCRYM exprimée au niveau des reins ?

C.4. Les Hormones thyroïdiennes

C.4.1. Biosynthèse

La biosynthèse des THs s'effectue au niveau des glandes thyroïdes. Ces dernières produisent deux hormones peptidiques dérivées de la tyrosine (Figure 9) : la 3,5,3'-triiodothyronine (T3) et la 3,5,3',5'-tétraïodothyronine (T4 ou thyroxine). Les hormones thyroïdiennes iodées sont des hormones apolaires synthétisées à partir d'ions iodures et de résidus tyrosines de la protéine thyroglobuline.

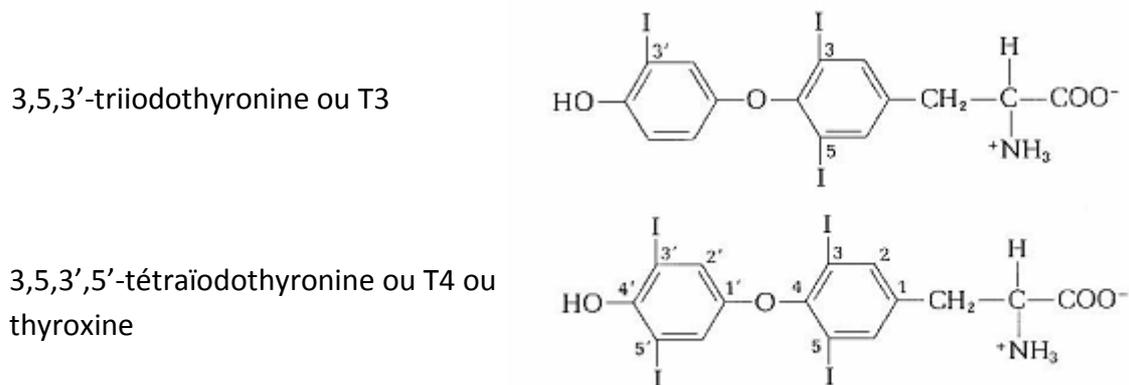


Figure 9 : Structure chimique des hormones thyroïdiennes : la 3,5,3'-triiodothyronine ou T3, la forme active, et la 3,5,3',5'-tétraïodothyronine ou T4 ou thyroxine, la forme circulante.

Les thyroïdes sont des glandes endocrines bilobées, situées sur la face ventrale du larynx et constituées de deux types de cellules sécrétrices : les cellules à calcitonine et les cellules folliculaires ou thyrocytes, qui sécrètent les hormones thyroïdiennes. Les thyrocytes accumulent activement l'iode d'origine alimentaire. Ils produisent une macromolécule, la thyroglobuline, dont les résidus tyrosines sont iodés par l'enzyme thyroperoxydase, avant son stockage dans la lumière des follicules où elle forme le colloïde. La thyroglobuline est ensuite réinternalisée dans les thyrocytes par endocytose. Chez l'homme, la glande thyroïde est fonctionnelle dès 10-12 semaines de vie embryonnaire et il existe un pic de sécrétion de T4 entre 18 et 20 semaines de vie post-natale. Chez les souris, qui naissent très immatures, le pic de T4 se situe entre la première et la troisième semaine de vie post-natale. A 15 jours de vie post-natale, le niveau de T3 dans le sang est 200 fois plus élevé qu'à la naissance

(Hadj-Sahraoui et al., 2000) puis il diminue pour rester à un niveau constant pendant la vie adulte. La modulation de la biodisponibilité des THs est donc dépendante du stade de développement embryonnaire et post-natal.

Ces THs sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, tels que la régulation du métabolisme général, le développement, la différenciation tissulaire, la croissance etc... (Détailés ultérieurement).

C.4.2. Libération des THs et modulation de la biodisponibilité de la T3

Dans les lysosomes des thyrocytes, la protéolyse de la thyroglobuline iodée aboutit à la libération dans la circulation sanguine des THs en majorité sous la forme de T4, et en plus faible quantité sous forme de T3 (Lauberg 1984).

La conversion de la T4 en T3 se fait dans de nombreux organes grâce à la thyroxine-5'-désiodase (ou désiodase, D) qui est une enzyme catalysant la réaction de 5'-monodésiodation de la T4 en T3. La T4 est ainsi considérée comme la forme circulante des hormones thyroïdiennes iodées et la T3 la forme biologiquement active.

Dans le sang, la proportion de T4 libre est très faible (0.02%). La majorité de la T4 circulante est liée aux Thyroïd Hormone-Binding Protein (THBP). Ce transport s'effectue essentiellement par la Thyroxine Binding Globuline (68%), la Transthyrétine (11%) et l'Albumine (20%). Les formes libres et liées des THs sont en équilibre. Seules les formes libres peuvent être captées par les cellules cibles. 80% de la T3 circulante est produite, à partir de la T4, dans les tissus périphériques, majoritairement par le foie. A la surface des cellules cibles et des cellules hépatiques, des enzymes membranaires vont capter la T4. Elle va être désiodée par les désiodases D1 (Foie) ou D3 (autres tissus) en T3, la forme active (Figure 10). Le foie est également l'organe le plus actif dans la dégradation et l'élimination des hormones thyroïdiennes iodées. Dans tous les tissus, le catabolisme de la T4 et de la T3 aboutit aux dérivés triiodés (rT3) diiodés (T2) notamment par la D3 (Kaplan et al., 1984). Au niveau du cerveau, la barrière hémato-encéphalique est peu perméable à la T3 circulante. C'est donc majoritairement la T4 qui franchit cette barrière qui est transportée du sang vers le liquide céphalo-rachidien, via les plexus choroïdes*. La T4 est ensuite converti en T3 par la

D2, une enzyme principalement exprimée dans le système nerveux, en particulier dans l'hypophyse (Guadano-Ferraz et al., 1999).

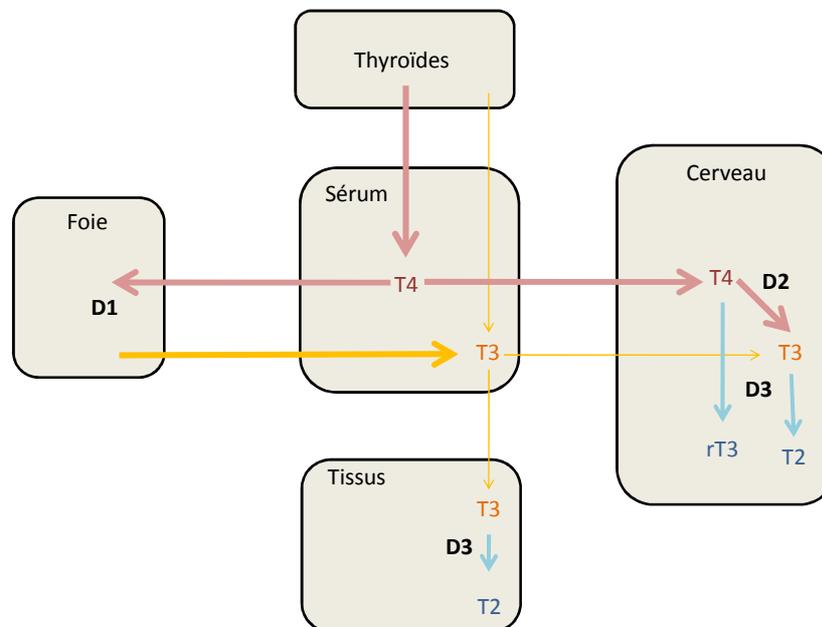


Figure 10 : Distribution et métabolisme des THs par les enzymes désiodases. Les glandes thyroïdes libèrent essentiellement la T4 et une faible quantité de T3 dans la circulation sanguine.

La régulation de la synthèse et de la sécrétion des THs s'effectue par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 11). La synthèse de T4 dans les thyroïdes est activée par l'hormone hypophysaire, Thyroïd Stimulating Hormone (TSH) (Shupnik et al., 1985). La production de TSH est elle-même régulée par la Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) d'origine hypothalamique (Koller et al., 1987). De plus, la T4 et la T3 circulantes exercent un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse en réprimant l'expression des gènes codant pour les deux sous-unités (α et β) de la TSH, ainsi que du gène codant pour la TRH. Cette dernière est également régulée par différents stimuli extérieurs comme le stress, le froid et est soumise à un rythme circadien. Cependant, le rétrocontrôle négatif exercé par les THs sur l'hypophyse semble avoir une importance prépondérante pour freiner la sécrétion lors d'élévations brutales des concentrations de THs (Degroot et al., 1989).

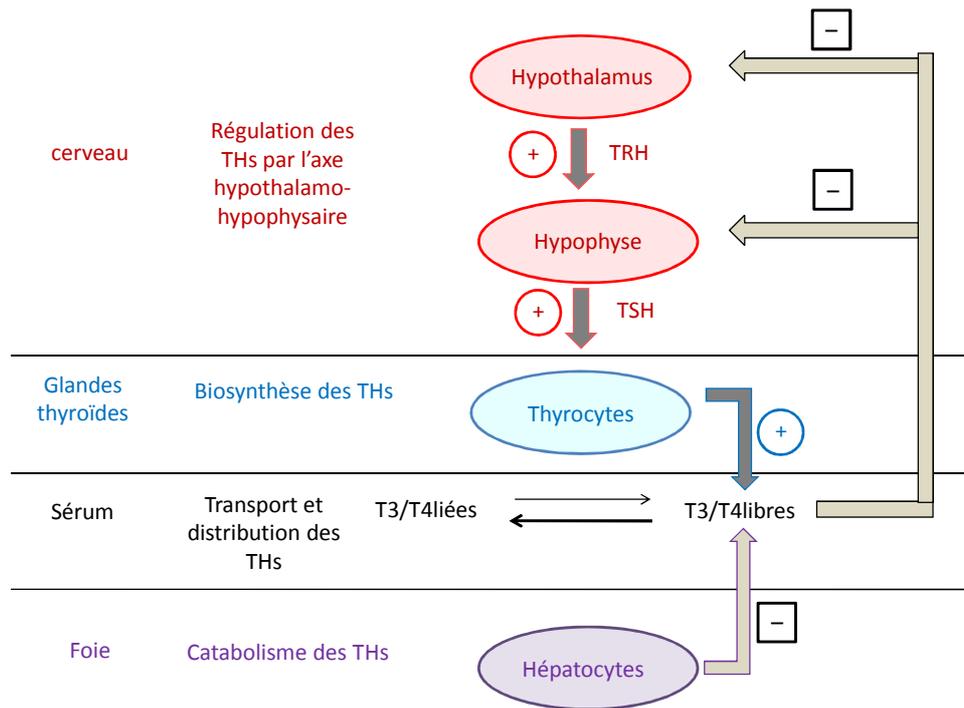


Figure 11 : Régulation de la production des THs par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

C.4.3. Les diverses fonctions physiologiques des THs

Les THs sont indispensables pour le fonctionnement du métabolisme général. Elles sont impliquées dans diverses fonctions clés dont certaines ne sont pas encore totalement élucidées. Les THs participent au développement, à la croissance, à la fertilité et à la reproduction. Elles sont particulièrement importantes dans le développement du système nerveux. Le déficit en hormones thyroïdiennes conduit à de très sévères retards mentaux chez l'Homme. Dans les régions naturellement pauvres en iode, la déficience en hormones thyroïdiennes du fœtus est responsable de l'apparition de retard mental connu sous le nom de crétinisme, découvert en 1977 par Leloup et Buscaglia. Durant l'enfance, un manque en hormones thyroïdiennes provoque des retards de croissance. Chez l'adulte, il provoque plus généralement une hypothyroïdie qui se traduit par une diminution du métabolisme général (Larsen 1998).

Une autre fonction essentielle des THs est de favoriser la calorigénèse, pour l'essentiel en augmentant la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP dans de nombreux organes, notamment dans le foie et les muscles. Cette régulation par les THs est dose-dépendante et est observée pour des concentrations physiologiques (Degroot et al., 1989).

C.4.4. Les modes d'action des THs

La T3, la forme active des THs, est communément connue comme le ligand nucléaire d'un type de récepteurs nucléaires, les récepteurs thyroïdiens (TRs). Il s'agit du mode d'action génomique de la T3. Il existe un mode d'action de la T3 non génomique, moins bien connu, où la T3 intervient dans certaines voies de signalisation cytoplasmiques. Ces deux modes d'action sont décrits ci-dessous. Malgré le rôle des CTBPs, de transporteur de T3 dans le noyau (action génomique de la T3), ces protéines sont répertoriées dans la littérature comme des protéines impliquées dans l'action non génomique de la T3 par leurs localisations majoritairement cytoplasmiques. Cette classification suggère un rôle supplémentaire des CTBPs qui supplémente le rôle de stockage et de transport nucléaire de la T3. Il rappelle le double rôle identifié pour une des CTBPs décrite précédemment, la protéine ALDH/CTBP du Xénope (Yamauchi et al., 1999). Ce rôle des CTBPs sera illustré dans la partie « mode d'action non génomique ». Cette voie de la T3 est très peu documentée comparée à la voie génomique au niveau des récepteurs TRs qui est également présentée ci-dessous.

C.4.4.1. Mode d'action génomique

La T3 est le ligand des récepteurs thyroïdiens (TRs), des récepteurs nucléaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs des stéroïdes. Les TRs sont des facteurs de transcription inductibles par la T3. Ils sont codés par deux gènes localisés sur deux chromosomes différents. Le gène TR β , localisé sur le chromosome 3, code pour trois isoformes TR β s. Ces TRs possèdent trois principaux domaines fonctionnels (Figure 12.A) : le domaine A/B à l'extrémité N-terminale qui a une fonction de transactivation indépendante de la T3, le domaine C, qui est le domaine de fixation à l'ADN et le domaine D/E, qui est le domaine de fixation de la T3 et qui possède une fonction de transactivation dépendante de la T3.

Les isoformes TR β s présentent une forte homologie de séquence pour les domaines C et D/E, respectivement, de fixation à l'ADN et à la T3. Ils diffèrent au niveau de la taille du domaine A/B, correspondant à la fonction de transactivation indépendante de la T3 (Figure 12.B). L'isoforme TR β 3 possède une forme tronquée appelée TR $\Delta\beta$ 3 (produit à partir du

promoteur interne) qui ne possède pas le domaine A/B ainsi que le domaine de fixation à l'ADN. Le gène TR α , localisé au niveau du chromosome 17, code pour un récepteur TR α 1 et deux variants issus d'épissages alternatifs (TR α 2 et TR α 3). Ces variants diffèrent de TR α 1 au niveau du domaine D/E. Par conséquent, ces variants, TR α 2 et TR α 3, possèdent un domaine de fixation de la T3 non fonctionnel. Ils possèdent chacun une forme tronquée appelée, respectivement, TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2. Ces formes tronquées ne possèdent pas le domaine A/B et le domaine C mais conserve la partie fonctionnelle du domaine D/E (Cheng et al., 2010).

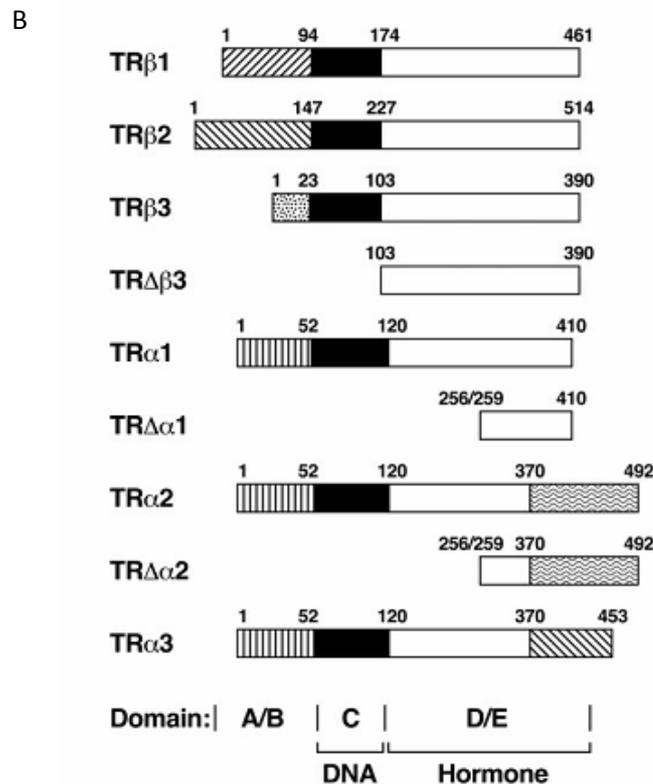
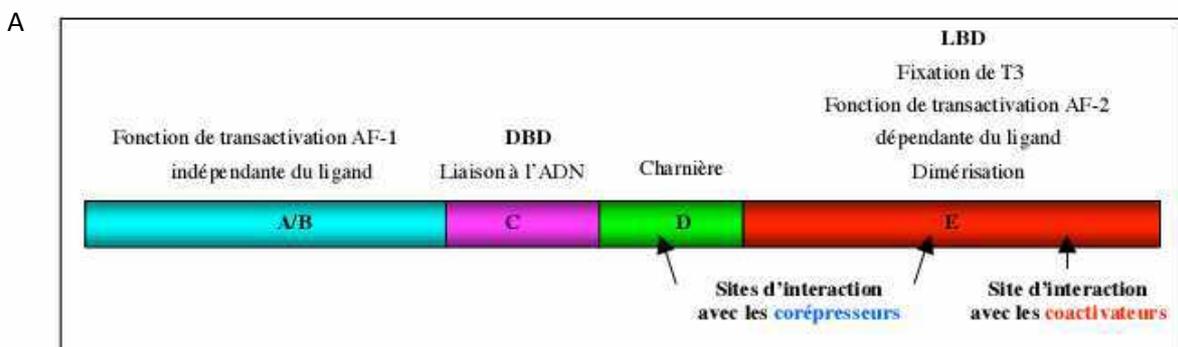


Figure 12 : (A) Représentation de l'organisation des domaines des TRs et de leurs fonctions. La plupart des TRs sont composés de quatre domaines : un domaine C qui lie l'ADN (appelé DBD pour DNA-Binding Domain), un domaine E qui lie la T3 (appelé LBD pour Ligand-Binding Domain). Les sites d'interaction TR/cofacteurs sont essentiellement localisés dans le domaine LBD. Il existe également au niveau de ce domaine, un domaine de transactivation dépendante du ligand, appelé AF-2 (Fonction d'activation 2). Une même fonction d'activation existe au niveau du domaine DBD, AF-1 mais qui est indépendante du ligand. Adapté de Darimont et al., 1998. (B) Représentation schématique des isoformes TRs. L'épissage alternatif des transcrits primaires (TR β 1, TR β 2, TR β 3, TR α 1, TR α 2 et TR α 3) est à l'origine de quatre autres isoformes. Les TRs présentent une forte homologie de séquence pour le domaine de fixation à l'ADN (appelé domaine C, représenté en noir) et à la T3 (domaine D/E, représenté en blanc). Le domaine A/B varie en longueur et en séquence d'acides aminés (indiqué par différents symboles). D'après Cheng et al., 2010.

Les TRs s'organisent en simple ou double chaîne polypeptidique, de la même manière que les autres récepteurs qui sont membres de la superfamille des récepteurs stéroïdes. Les structures tridimensionnelles de certains TRs ont été résolues, telle que la structure cristallographique du récepteur TR β 1 humain (Figure 13).

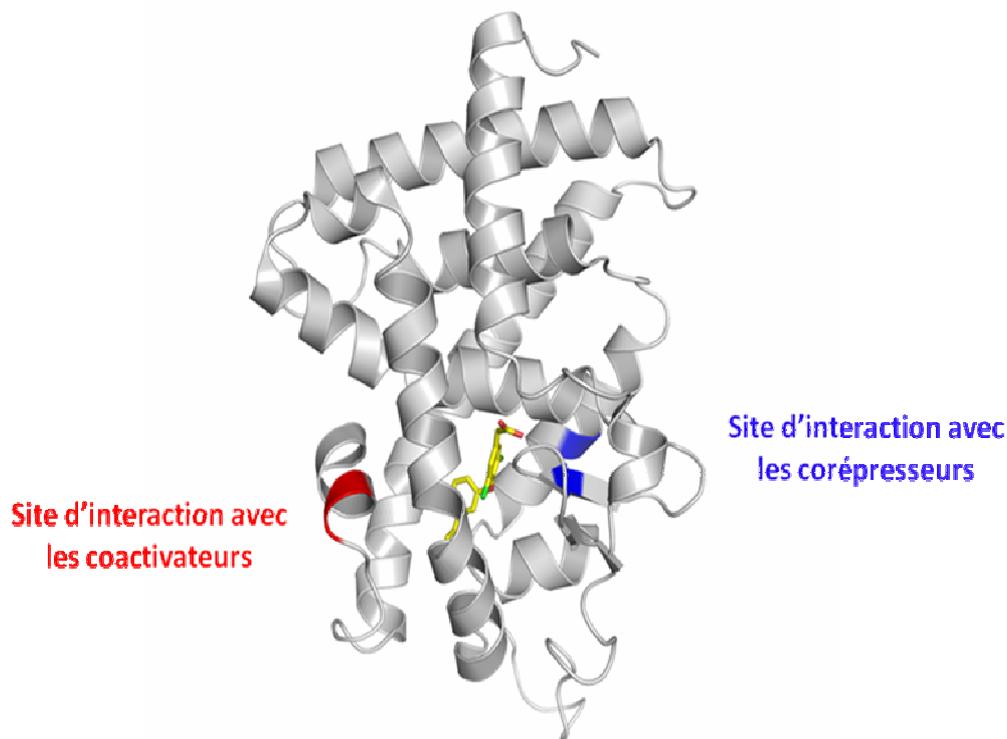


Figure 13 : Représentation de la structure cristallographique (PDB 1NAX) de TR β 1 complexé à la T3 (en jaune). Indication du domaine de fixation des co-activateurs (en rouge) et des co-répresseurs (en bleu).

Au niveau du domaine de liaison à l'ADN, les TRs interagissent sur l'élément de réponse à l'hormone thyroïdienne, appelé TREs (Thyroid hormone Response Element) des gènes cibles de la T3. Contrairement à l'extrémité N-terminale (domaine A/B), le domaine C, de fixation de la T3 (appelé également LBD pour Ligand-Binding domain) présente une forte homologie de séquences entre les différents isoformes de TRs. Ce domaine LBD n'a pas uniquement un rôle de fixation de la T3 mais aussi un rôle d'interaction avec les protéines co-répressives (CoRs) ou co-activatrices (CoAs), connues sous le nom de récepteurs co-régulateurs (Leonard et al., 1990). Il est également impliqué dans l'homodimérisation des TRs sur l'ADN et leurs hétérodimérisations avec les autres récepteurs nucléaires de la même superfamille, tels que les récepteurs X rétinoïdes (RXRs). L'analyse structurale du domaine LBD montre que la fixation du ligand induit des changements structuraux importants qui facilitent la dissociation des répresseurs et l'association des activateurs (Wagner et al., 1995).

Les TRs se fixent sur les éléments de réponse à l'hormone thyroïdienne (TREs) pas uniquement en tant que homodimère mais aussi comme hétérodimère avec d'autres récepteurs nucléaires, tels que les RXRs, récepteur à la vitamine D et tous les autres sous-types de récepteurs rétinoïdes. La dimérisation avec RXR augmente significativement la fixation des TRs sur les TREs en favorisant la fixation de la T3 et l'activation de la transcription (Zhang et al. 1993).

Les TRs peuvent également se fixer sur les éléments de réponse d'autres récepteurs nucléaires. Par exemple, ils sont impliqués dans la voie de signalisation du métabolisme lipidique connue sous le nom de peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Le récepteur PPAR γ régule ses gènes cibles par la fixation de l'hétérodimère TR β /RXR sur l'élément de réponse de PPAR (Araki et al. 2005).

Enfin, certaines régulations croisées des TRs n'impliquent pas d'interaction directe entre les deux récepteurs TR/RXR. Par exemple, les TRs influencent la voie du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) en régulant l'expression de la protéine CRABP1 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1). Cette protéine cytoplasmique fait parti de la famille des CRABPs, décrite précédemment dans ce manuscrit. Elle module, de la même manière que les CTBPs pour la T3, la concentration d'acide rétinoïque libre dans la cellule (Wei et al., 1999). Si une telle

coopérativité existe entre les TRs et les CRABPs, alors, il est possible d'imaginer un tel mécanisme de régulation entre les CTBPs et les TRs ou entre CTBPs/RAR.

Ces exemples de régulations croisées montrent que l'action des TRs s'inscrit dans un véritable réseau transcriptionnel de récepteurs nucléaires. De tels réseaux seraient impliqués dans de grandes fonctions physiologiques. Bookout et collaborateurs (2006) ont tenté d'intégrer ces voies de signalisation dans une échelle supérieure, afin d'élucider les acteurs et les fonctions associées. La compréhension de ces actions croisées des récepteurs nucléaires pourrait permettre d'élucider le rôle des acteurs protéiques de la voie de signalisation des THs, comme les CTBPs et en particulier la protéine CRYM de mammifères qui a été étudiée dans ce projet de thèse.

Par ailleurs, l'expression des isoformes TRs est tissu-dépendante (Tableau 4) et la régulation s'effectue en fonction du stade de développement. Par exemple, le TR α 1 est exprimé durant le stade précoce embryonnaire alors que les TR β s sont exprimés durant le stade tardif du développement.

TRs isoformes	Tissus Forte expression	Tissus Faible expression	Tissus Absence d'expressi ons	références
TR β 1	Reins, foie, cerveau, cœur, thyroïdes	Muscle squelettique, rate	testicules	Cheng 2000 Williams 2000 Ying et al., 2003
TR β 2	Cerveau, rétines, oreille interne	Poumons, cœur	Autres tissus	Williams 2000 Jones et al., 2007
TR β 3	Reins, foie, poumons	Muscles squelettique, rate, cerveau, cœur	testicules	Williams 2000
TR α 1 et TR α 2	cerveau	Reins, muscles squelettique, poumons, cœur, foie	testicules	Williams 2000

Tableau 4 : Localisation tissulaire de l'expression des TRs. Adapté à partir de Cheng et al., 2010.

Cette expression différentielle explique la diversité des isoformes TRs qui semblent avoir des fonctions physiologiques différentes selon les tissus où ils sont exprimés. Cette hypothèse est confortée par les différents profils d'expression spatio-temporels des isoformes de TRs dans le système nerveux aux stades embryonnaire et post-natal (Bradley et al., 1992). L'expression des transcrits de TR α 1 et TR α 2 est enrichie dans la couche néocorticale du fœtus qui correspond au site de différenciation des neurones corticaux. Quant aux transcrits TR β 1, ils sont préférentiellement exprimés dans les zones de prolifération des neuroblastes (cellules souches nerveuses), tels que la couche cortico-ventriculaire et le trigone germinal*.

Les transcrits TR β 2 sont exprimés au cours du développement de l'hippocampe et du striatum. Cette expression spatio-temporelle différentielle suggère que les isoformes TRs pourraient jouer des fonctions différentes durant le développement. Cette hypothèse est confortée par les expériences d'inactivation des TRs chez la souris qui montrent une fonction spécifique et coopérative entre les TRs. Par exemple, l'inactivation du gène TR β chez la souris provoque un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire et un déficit de développement des fonctions auditive et oculaire (Jones et al., 2007, Forrest et al., 1996). La délétion simultanée de TR α 1 et TR α 2 induit un problème de développement post-natal et diminue l'espérance de vie.

La biodisponibilité locale de la T3 est un facteur majeur de régulation des TRs. Ce mécanisme de régulation de l'expression des TRs par la biodisponibilité de la T3 a été démontré au niveau du cerveau. La distribution de T3 dans le cerveau a été déterminée par différentes techniques, parmi elles, l'injection de [¹²⁵I]T3 ou de [¹²⁵I]T4, suivie d'un autoradiogramme sur coupes de cerveau (Pinna et al., 2002). Cette étude a montré que l'entrée de T3 et de T4 dans le cerveau est hétérogène. Chez le rat, un dosage biochimique de T3 et de T4 dans différentes régions cérébrales montre des variations de 1 pmol/g dans le cervelet à 2,8 pmol/g dans le mésencéphale*. La concentration de T3 est aussi soumise à des variations circadiennes. Par exemple, la concentration de T3 est plus élevée (1,6 fois) en période diurne qu'en période nocturne chez le rat. Un immunomarquage anti-T3 (Rozanov and Dratman, 1996) a permis de visualiser l'hétérogénéité de la distribution de la T3 directement sur des coupes histologiques de cerveau. La région striatale, la substance noire compacte et le globus pallidum présentent un marquage de la T3 proéminent en comparaison avec les autres régions du cortex frontal. Par ailleurs, la cochlée, un tissu de l'oreille interne, présente les mêmes caractéristiques de marquage de la T3 que la région striatale, le SNC et le GP. Cette enrichissement de la T3 dans ces régions cérébrales suggère un lien avec la protéine mCRYM dont l'expression est sélective dans le striatum et la cochlée (Brochier et al., 2008 ; Abe et al., 2003). En outre, l'étude laisse supposer que la distribution de la T3 dans le cerveau est hétérogène (Rozanov and Dratman, 1996). De nombreuses études sont menées sur les spécificités du métabolisme cérébral de la T3 pour comprendre cette distribution hétérogène.

*Cf. Lexique page 3

Par ailleurs, le cerveau est protégé de fluctuations importantes de la concentration en T3 par l'intermédiaire des désiodases. Lorsque l'expression de la D2 augmente, la quantité de T4 diminue, ce qui permet de préserver une concentration normale de T3 (Guadano-Ferraz et al., 1999). Au contraire, de fortes concentrations de T3 et T4 stimulent l'expression locale de la D3, qui code pour l'enzyme qui est responsable du catabolisme de la T4 et T3 (en T2 et rT3). Cette régulation par les désiodases est possible car ces enzymes possèdent une activité locale due à un profil d'expression restreint. Par exemple, la D3 est fortement exprimée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les cellules granulaires du gyrus dentelé et les couches II et VI du cortex cérébral (Tu et al., 1999). La D2 est exprimée essentiellement dans trois types cellulaires : les cellules gliales*, les tanicytes* borbant le troisième ventricule et les astrocytes* dans tout le cerveau (Guadano-Ferraz et al., 1997). Le niveau d'expression des désiodases n'est pas exactement corrélé à leur activité enzymatique : la D2 a une activité 4 fois plus élevée dans le cortex frontal que dans le mésencéphale, alors que son expression est plus forte dans le mésencéphale. Toutefois le métabolisme de la T3, par l'intermédiaire des désiodases, ne peut pas expliquer à lui seul la distribution hétérogène de T3 dans le milieu extracellulaire cérébral. Le transport de l'hormone le long des axones des neurones pourrait aussi influencer sa concentration locale (Gordon et al., 1999). En effet, une lésion du locus coeruleus* diminue la quantité de T3 dans les corps cellulaires et les axones des neurones noradrénergiques de l'hippocampe et du cortex cérébral. L'hypothèse serait que la T3 est accumulée dans le locus coeruleus et distribuée aux cibles post-synaptiques via des transports dont les CTBPs en font probablement parti.

C.4.4.2. Mode d'action non génomique

Le mode d'action non génomique de la T3 regroupe toutes les actions de la T3 qui ne font pas intervenir une activation transcriptionnelle médiée par les TRs. Ces mécanismes de régulation de la T3 débutent dans le compartiment cytoplasmique et font intervenir différentes voies de signalisation (Figure 14).

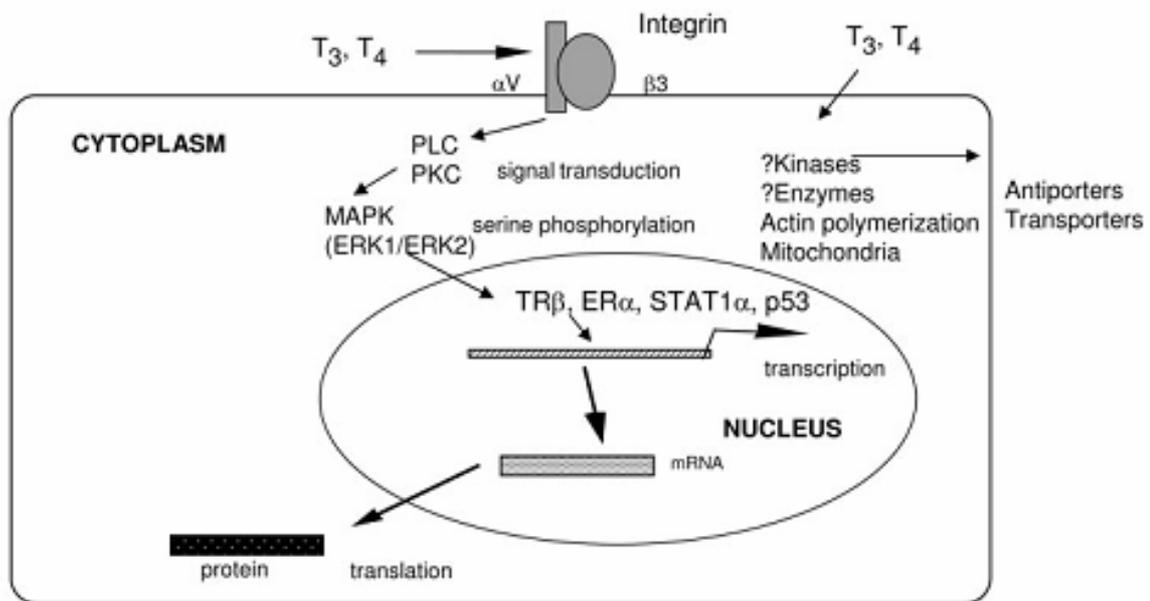


Figure 14 : Actions non génomiques de la T₃. Par exemple, les THs se fixent sur un récepteur membranaire, l'intégrine αVβ₃, et activent la voie des Kinases MAPK. Il est également possible que cette action non génomique soit associée à une action génomique par phosphorylation des TRs qui résulte de l'activation de la transcription de gènes cibles. D'après Yen, 2006.

Les principaux exemples d'actions non génomiques de la T₃ identifiés sont répertoriés dans le tableau 5. Les protéines cytoplasmiques impliquées sont soit des récepteurs nucléaires (par exemple les TRs comme navette nucléo-cytoplasmique que nous verrons plus en détails dans la partie qui suivra) qui résident provisoirement dans le cytoplasme, soit des protéines qui résident largement mais non exclusivement dans le cytoplasme telles que les CTBPs.

Les CTBPs-NADPH dépendantes sont des protéines cytoplasmiques, par leur rôle de stockage de la T₃ et nucléaires, par leur rôle de transporteur nucléaire de la T₃. Les CTBPs sont classées comme des acteurs du mode non génomiques de la T₃ (Cheng et al., 2010). Pour le moment, de telles implications des CTBPs-NADPH dépendantes n'ont pas été clairement démontrées mais il ne serait pas surprenant que les CTBPs-NADPH dépendantes aient un double rôle comme cela a été identifié pour deux CTBPs : les pyruvates kinases, p58 PKM, de sous-unité M₁ et M₂ (p58 PKM₂ et p58 PKM₁). L'action de la CTBPs/kinase p58 PKM₂ a été décrite dans la partie C.3 de ce présent manuscrit. Cette protéine a un double rôle, d'une part, en présence de T₃, elle a un rôle de CTBPs, par le transfert de la T₃ dans le noyau, et, d'autre part, en absence de T₃, son activité kinase est restaurée. Cependant, les voies de

signalisation dans lesquelles ces pyruvates kinases interviennent ne sont pas encore connues.

Action des THs	caractéristiques	THs impliqués	Concentrations des THs	Références
Activité Ca ²⁺ -ATPase membrane	Régulation de l'ATPase <i>via</i> la calmoduline	T4	10 ⁻¹⁰ M	Davis et al., 1983
Transport 2-Désoxyglucose	La T3 augmente la capture de glucose par les myocytes et les adipocytes.	T3	10 ⁻⁹ M	Sega et al., 1989
Activité Na,K-ATPase	Régulation de l'homéostasie du K ⁺ et du Na ⁺	T3	10 ⁻⁹ M	Lai et al., 2003
Myocardiocytes : gradient Na ⁺	Stimulation l'échange Na ⁺ /Ca ²⁺	T4, T3	5 x10 ⁻⁹ M	Craelius et al., 1990
Neurones sensoriels : gradient Na ⁺	Rôle de la T4 comme une hormone par sa fixation sur le récepteur de l'intégrine αβ3	T4	3 x 10 ⁻⁸ M	Yonkers et al., 2009
Echange Na ⁺ /H ⁺	<i>Via</i> l'augmentation de la [Ca ²⁺] par l'échange Na ⁺ /Ca ²⁺	T3	10 ⁻¹⁰ M	Incerpi et al., 1999
Prolifération des cellules cancéreuses	Activation de la voie de la MAPKinase par fixation de la T3 sur le récepteur de l'intégrine αβ3	T4	10 ⁻¹⁰ M libre	Davis et al., 2006
Angiogenèse	Activation de la voie de la MAPKinase	T4	10 ⁻¹⁰ M libre	Bergh et al., 2005
TR : navette nucleo-cytoplasmique	Régulation par le complexe T3/TR sans activation transcriptionnelle	T4	10 ⁻¹⁰ M libre	Cao et al., 2009
Initiation de la transcription du gène HIF1α	Activation de HIF1α par l'intermédiaire de la voie PI3Kinase	T3	10 ⁻⁹ M	Lin et al., 2009
Inhibition de l'activité Kinase de PKM ₂	Fixation de la T3 sur p58 PKM ₂ et p58 PKM ₁ qui inhibe l'activité kinase de ces enzymes/CTBPs. L'activité Kinase est liée au métabolisme du glucose.	T3	—	Kato et al., 1989 Parkinson et al., 1991

Tableau 5 : Principaux exemples des actions non génomiques de la T3 impliquant des protéines cytoplasmiques. Adapté de Cheng et al., 2010

Tout comme les THs, les mitochondries sont tissu-spécifiques. Elles ont en commun 60% de leurs protéosomes, les 40% restant sont des protéines mitochondriales spécifiques aux types cellulaires où elles sont localisées, donc un profil protéomique spécifique au tissu d'origine (Pagliarini et al., 2008). Les THs sont également impliquées dans différentes fonctions mitochondriales : génération d'ATP (Brand et al., 2005), de chaleur (Brand et al., 2005), mitochondriogénèse (Garstka et al., 1994) et activation de gènes mitochondriaux (Wrutniak et al., 1995). Quelques exemples sont rapidement présentés ci-dessous pour illustrer ce rôle mitochondrial, non génomique, des THs qui est dans certains cas TRs-dépendant :

- Pour la génération d'ATP, les THs agissent au niveau des mitochondries en favorisant le découplage des phosphorylations oxydatives (Palacios-Romero et al., 1979 et Cheng et al., 2010).
- La génération de chaleur est induite par une fuite de proton médiée par la superfamille de transporteurs mitochondriaux UCPs (UnCoupling Proteins). Dans les mitochondries des tissus adipeux bruns de souris, l'expression d'UCP1 est régulée par les THs et les catécholamines (des dérivés de tyrosine), (Cadenas et al., 2002).
- Les THs sont également connues pour augmenter le nombre de mitochondries dans une cellule. Deux facteurs de transcription mitochondriaux exprimés par des gènes nucléaires, le coactivateur-1 PPAR (appelé aussi PGC-1), (Wu et al., 1999) et le facteur de transcription mitochondrial A (Fisher et al., 1992 et Marin-Garcia et al., 2000) sont TH-dépendants. Les THs peuvent également affectées la transcription de gènes mitochondriaux à travers les TRs, localisés dans les mitochondries. Ces TRs ne possèdent pas le domaine A/B qui est indispensable pour la fonction de transactivation au niveau du noyau. Cette absence du domaine A/B démontre que l'action du complexe TR/T3 n'est pas sous le contrôle d'un mécanisme d'activation de la transcription au niveau du génome nucléaire. Par exemple, l'expression du TR α Δ 1 chez le Xénope et les mammifères conduit à un phénotype particulier de la matrice mitochondriale par une augmentation du gradient de protons et une inhibition de la libération du cytochrome c d'une manière TH-dépendante.

Des mécanismes similaires induits par d'autres transporteurs de T3 comme les TRs ne sont pas encore connus mais il est possible d'imaginer une régulation des fonctions mitochondriales par des CTBPs, notamment les CTBPs NADPH-dépendantes.

C.5. Les transporteurs plasmiques des THs

Il a été longtemps considéré que les THs sont internalisées dans les cellules cibles par diffusion passive, en raison de leur caractère lipophile. L'identification de transporteurs transmembranaires a réfuté cette idée (Hennemann 2005). Il existe différents transporteurs plasmiques de la T3 qui appartiennent à différentes familles, tels que les polypeptidiques cotransporteurs de Na⁺/taurocholate (appelés NTCP pour Na⁺-taurocholate co-Transporting Polypeptide), les transporteurs d'anions organiques (appelés OATP pour Anion Transporting Polypeptide) et les transporteurs des L-acides aminés (appelés LAT1 et LAT2 pour L-type Amino acids Transporters). L'ensemble de ces transporteurs a été identifié comme des régulateurs du passage de la T3 à travers la membrane plasmique (Jansen et al., 2005). Le transporteur OATPC1 a une forte affinité et spécificité pour la T4. De plus, il est fortement exprimé dans les capillaires du cerveau (Pizzagalli et al., 2002). Ces deux caractéristiques font que le transporteur OATPC1 pourrait être impliqué dans le transport de la T4 à travers la barrière hémato-encéphalique.

Le transporteur d'acide MonoCarboxiliques 8 (MCT8) de la T3 est fortement exprimé dans le foie et le cerveau, en particulier dans les neurones sensibles à l'hormone thyroïdienne (Heuer et al., 2005). Chez l'Homme, des mutations du gène MCT8 ont été associées à un retard mental sévère et à une concentration élevée de T3 dans le sérum (Jansen et al., 2005 et 2007). Friesema et collaborateurs (2008) ont montré par cotransfection de CRYM et MCT8 dans des cellules mammifères que la protéine CRYM a une influence sur l'activité de MCT8, en augmentant la capacité de ce transporteur à internaliser la T3 et la T4. Ces résultats montrent qu'il existe une coopérativité entre les transporteurs plasmiques (MCT8) et les transporteurs intracellulaires (CRYM) pour la régulation de la concentration intracellulaire en THs.

C.6. Transport nucléo-cytoplasmique et régulation de la T3 dans le noyau

La disponibilité intracellulaire de l'hormone peut être régulée par différents mécanismes. Chez le Xénope, il a été montré que la T3 induit l'expression de TR β pendant la métamorphose (Buchholz et al., 2005). Les TRs sont connus pour leur rôle de récepteurs nucléaires. Pourtant, Baumann et collaborateurs (2001) ont montré que les récepteurs TRs se déplacent en permanence entre le noyau et le cytoplasme. Des inhibiteurs génériques de transporteurs, au niveau de la membrane nucléaire, n'affectent pas leur entrée dans le noyau, suggérant ainsi qu'ils peuvent franchir la membrane nucléaire par diffusion passive. A l'opposé, leur transport nucléo-cytoplasmique est abolit dans des cellules privées d'ATP. Ce qui montre qu'une étape requiert un transport actif (Bunn et al., 2001). Cette hypothèse est confortée par Shank et collaborateurs (2005) qui proposent la calréticuline* comme protéine d'export nucléaire des TRs.

En absence de T3, la localisation nucléaire des TRs est favorisée par la coexpression de son partenaire d'hétérodimérisation RXR (Baumann et al., 2001). La localisation nucléaire des TRs dépend également de sa phosphorylation dans le domaine de liaison à l'ADN. Par exemple, dans le Xénope, TR α 1 phosphorylé est détecté dans le noyau, tandis que TR α 1 non phosphorylé est détecté dans le cytoplasme (Nicoll et al., 2003). L'état de phosphorylation de TR α 1 change rapidement et sa phosphorylation s'effectue dans le noyau, ce qui suggère que son trafic et donc son activité seraient régulés par des kinases nucléaires.

Pour le moment, aucune étude ne permet d'estimer le niveau de régulation de la T3 par les CTBPs et par les TRs. Les CTBPs sont-elles indispensables pour la régulation de la concentration de T3 dans la cellule ? Pour l'adressage de la T3 dans le noyau ? Quelles sont les particularités fonctionnelles des CTBPs ?

C.7. Les études fonctionnelles sur CRYM de mammifères

C.7.1. Implication de CRYM dans la surdité non syndromique

La protéine hCRYM sauvage est fortement exprimée dans les fibroblastes de la cochlée*. Lorsqu'elle est mutée, la protéine hCRYM est responsable d'une pathologie auditive qui est connue sous le nom de surdité non syndromique. Les surdités non syndromiques peuvent

être causées par des facteurs environnementaux et/ou génétiques. Abe et collaborateurs (2003) ont étudié les mutations du gène hCRYM chez 192 patients atteints d'une surdité non syndromique. L'analyse a mis en évidence deux polymorphismes génétiques dans ce groupe de patients. Une mutation dans l'exon 8, d'origine héréditaire, qui est causée par une substitution ponctuelle du résidu Lys314 en thréonine (K314T). L'autre mutation est causée par l'addition d'un résidu tyrosine à l'extrémité C-terminale (X315Y). Cette mutation X315Y, contrairement à la mutation K314T, a une origine sporadique. Par conséquent, elle pourrait être causée par un facteur environnemental.

Cette même équipe a étudié la localisation cellulaire des deux formes de protéines hCRYM mutées par transfection de hCRYM mutées fusionnées à un tag HA dans les cellules COS-7* (d'une manière isolée). 72h et 96h après transfection, les protéines hCRYM mutées présentent un profil d'expression avec une localisation hétérogène ; hCRYM K314T présente une localisation périnucléaire alors que hCRYM X315Y, une localisation cytoplasmique, caractérisée par un motif vacuolaire. Cette localisation aberrante n'est observée dans aucun des clones cellulaires exprimant la protéine hCRYM sauvage qui présente une localisation diffuse, principalement, dans le cytoplasme. L'origine de cette perturbation de localisation de hCRYM mutées n'est pas encore connue.

C.7.2. Relation entre la protéine hCRYM et le récepteur aux androgènes

Une autre étude a montré une implication de la protéine hCRYM dans le cancer de la prostate androgène-dépendant (Malinowska et al., 2009). Cette étude montre que l'expression de hCRYM est régulée par les hormones androgènes.

L'action des androgènes se fait par l'intermédiaire du récepteur aux androgènes (AR), qui appartient à la même superfamille, les récepteurs stéroïdes, que les récepteurs TRs. Tout comme les TRs, les ARs ont un rôle de facteur de transcription. Les androgènes, de la même manière que la T3 pour les TRs, sont les ligands qui se fixent sur les ARs et induisent la transactivation de gènes cibles par la fixation de l'homodimère ARs sur l'Elément de Réponse à l'Androgène (ARE). La fixation des androgènes induit donc une activation de la transcription de gènes sous le contrôle de l'ARE.

*Cf. Lexique page 3

Le récepteur aux androgènes présente une forte homologie de séquence avec les TRs. L'organisation des domaines fonctionnels est sensiblement similaire à celle des TRs (Figure 15, page 36). Le ligand, l'hormone androgène (par exemple la dihydrotestostérone, DHT), se fixe sur un site de fixation présent dans le domaine LBD, ce site est appelé BF-1 (Binding Function-1) et correspond à la cible thérapeutique des drogues anti-androgène utilisées pour traiter le cancer de la prostate androgène-dépendant. Par sa fixation au niveau du site BF-1, l'androgène provoque un changement de conformation au niveau du site AF-2. Ce changement de conformation induit l'activation du site AF-2 par la fixation, à son niveau, du complexe protéiques co-activatrices (CoAs) qui remplace le complexe de protéines co-répressives (CoRs). La fixation de ce complexe protéique, CoAs, est indispensable pour l'activation de la transcription par les ARs.

La protéine hCRYM présente un profil d'expression plus élevé dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. Cette surexpression est due à une régulation du gène codant pour la protéine hCRYM par les androgènes. Ceci a été montré par l'utilisation de drogues anti-androgènes (bicalutamide et hydroxyflutamide) et par l'utilisation de siRNAs qui induisent une diminution de l'expression des transcrits codant pour une hormone androgène. Ceci induit une diminution de l'expression de hCRYM au niveau des transcrits mRNA et au niveau protéique. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Mousse et collaborateurs (2002) qui montrent une diminution du profil d'expression des transcrits de hCRYM pour des tumeurs qui ont développées une résistance à la thérapie anti-androgène (apparition de tumeurs androgènes-indépendantes). Cette même étude, effectuée en présence de T3, ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'expression de la protéine hCRYM (Malinowska et al., 2009). Par conséquent, la T3 n'a pas d'influence sur l'expression de hCRYM.

Par ailleurs, le traitement d'une lignée tumorale prostatique androgène-dépendante (MDA PCa 2b) en présence de T3 induit une augmentation de la prolifération des cellules et cet effet est augmenté en présence d'androgènes. Le mécanisme T3-dépendant à l'origine de la prolifération des cellules cancéreuses n'a pas encore été élucidé (Malinowska et al., 2009).

Le mécanisme de remodelage du récepteur AR a été étudié par Estébanez-Perpiná et collaborateurs (2007), par la résolution des structures cristallographiques du domaine LBD

(domaine de fixation des androgènes) de l'AR complexé à une androgène (DHT) et à des molécules thérapeutiques potentiellement inhibitrices du site AF-2 (appelé également BF-2).

Pour contrer le mécanisme de résistance aux drogues anti-androgènes, le site AF-2, par son rôle clé dans l'activation de la transcription, pourrait constituer une excellente cible thérapeutique. Les auteurs de cet article ont donc criblé une chimiothèque capable de se fixer sur le site AF-2 et d'inhiber son action. La structure cristallographique du domaine AF-2 complexé au DHT (induction de l'activation du site AF-2) et à certaines de ces drogues montre que les acides aminés du site AF-2 créent une nouvelle poche profonde, qui correspond au site BF-3 (proche du site initial d'AF-2). Le site BF-3 est capable d'accueillir des molécules aromatiques telles que la T3 et une autre molécule dérivée de la T3 : 3,3',5-triiodothyroacetic acid (TRIAC), ainsi que des molécules anti-inflammatoires non stéroïdes (Figure 15). Ce site BF-3 n'était pas connu auparavant et pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour remplacer les thérapies anti-androgènes actuelles qui induisent des phénomènes de résistances tumorales. Cette résistance aux drogues anti-androgènes développée par les tumeurs pourrait s'expliquer par un changement de conformation du site AF-2 qui est à nouveau capable d'induire la fixation des co-activateurs par l'intermédiaire d'un autre site BF. Cette activation d'AF-2, *via*, un nouveau site BF nouvellement remodelé pourrait être provoquée par la fixation d'un partenaire, en réponse aux drogues anti-androgènes.

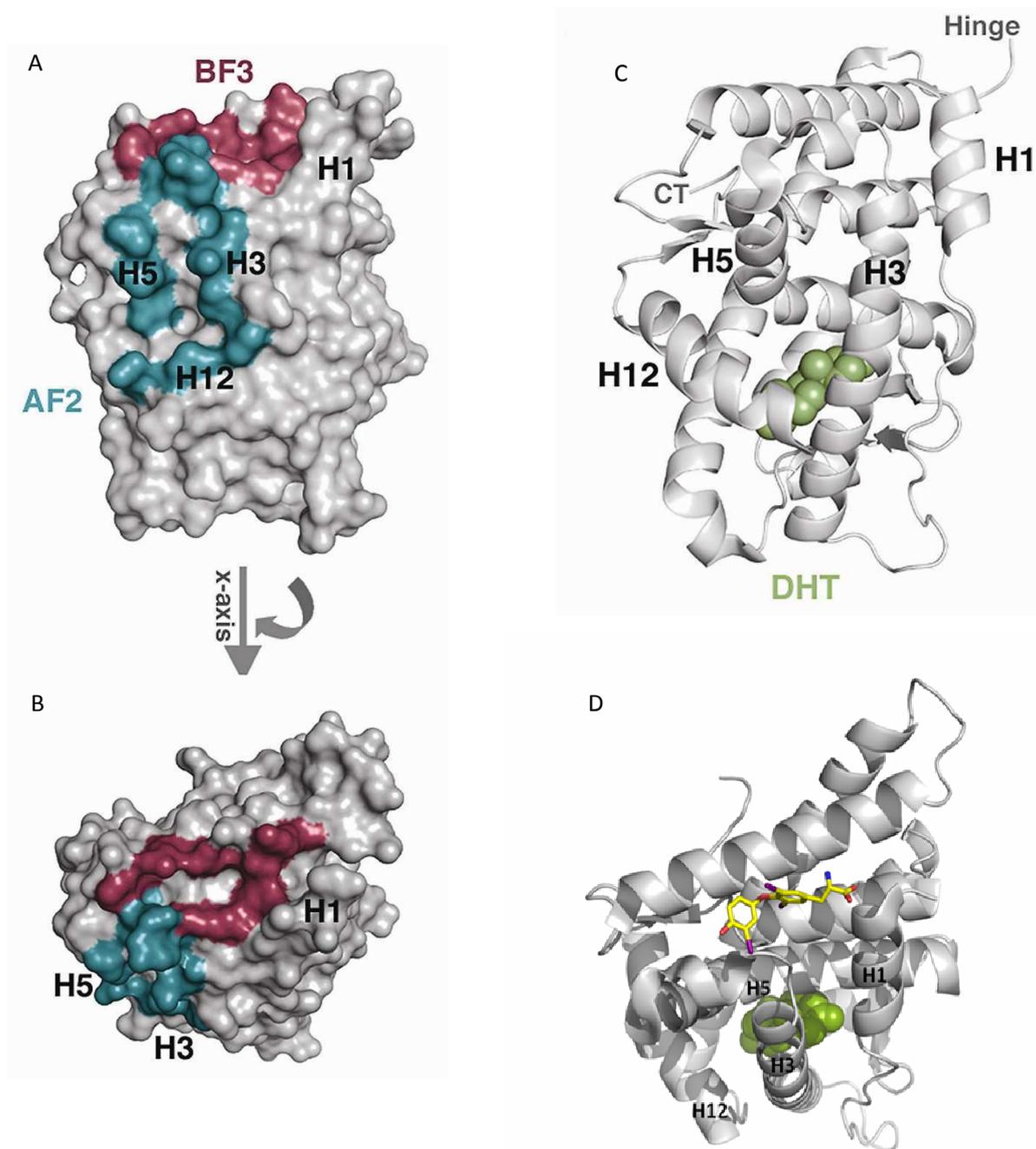


Figure 15 : Structure du domaine LBD du RA complexé au DHT (effet activateur sur le site AF-2 par sa fixation sur le site BF-1) et à la T3 (effet inhibiteur sur le site AF-2 ou BF-2 par sa fixation sur le site BF-3) (A) représentation des sites AF-2 (cyan) et BF-3 (rouge), vue sur le site AF-2 ; (B) rotation de 90° de A, vue sur le site BF-3 (C) Représentation des structures secondaires du domaine LBD complexé au DHT (vert), les structures secondaires importantes pour l'activation d'AF-2 sont les hélices α 1, 3, 5 et 12 ; (D) Structure du domaine LBD complexé au DHT et à la T3 (jaune). Adapté à partir de Estébanez-Perpiná et al., 2007.

Cependant, ces résultats qui montrent un effet inhibiteur de la T3 et du TRIAC par leur fixation au niveau du site BF-3 sont en contradiction avec les résultats, *in vivo*, obtenus par

Malinowska et collaborateurs (2009) qui montrent une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses induite par la T3, donc un effet activateur de la T3. Ces différences pourraient s'expliquer par l'intervention, *in vivo*, de protéines avec un effet CoRs qui masqueraient le site BF-3 ou bien induisent un changement de conformation de ce site par une fixation à proximité de celui-ci ou du site AF-2. De plus, la résolution des structures cristallographiques avec ces molécules, dont la T3, s'est effectuée sur le domaine LBD, isolé des autres domaines de l'AR. Ceci peut également influencer la conformation du domaine LBD qui, par conséquent, pourrait favoriser la conformation du site BF-3 pour la fixation de la T3.

En définitive, ce lien entre la T3 et les récepteurs ARs ainsi que le contrôle de l'expression de hCRYM par ces récepteurs nucléaires suggèrent une implication possible de la voie de signalisation de la T3 et de hCRYM dans le cancer de la prostate.

Par ailleurs, rappelons que le gène codant pour le récepteur AR est muté par une expansion anormale du trinuécléotide CAG dans l'amyotrophie bulbospinale (SBMA), (Banno et al., 2009), l'une des 14 maladies dites à expansion du trinuécléotide CAG dont la MH. En outre, l'expression de la protéine mCRYM a été identifiée dans la région bulbo spinale, cependant, son expression est très modérée dans cette région en comparaison avec la région striatale (<http://mouse.brain-map.org/brain/Crym.html?isopop=1>). En définitive, ce lien entre la protéine hCRYM et le récepteur AR pourrait impliquer une possible perturbation de l'expression de hCRYM dans des cas de SBMA.

C.8. Les études structurales sur CRYM de mammifères et ses homologues

C.8.1. La structure de hCRYM complexée au NADPH

La protéine hCRYM est une CTBP-NADPH dépendante qui est capable de fixer la T3 et de réguler la concentration intracellulaire de la T3 libre par l'intermédiaire du couple redox NADPH/NADP⁺ (Vie et al., 1997). Le mécanisme proposé par Vie et collaborateurs (1997) est comparable à celui des autres CTBPs-NADPH dépendantes précédemment décrites. Ce mécanisme implique une forme active, hCRYM complexée au NADPH (hCRYM/NADPH), qui fixe la T3 et inhibe son action nucléaire, et une forme inactive, hCRYM complexée au NADP⁺ (hCRYM/NADP⁺), qui fixe la T3 et active son rôle nucléaire. De plus, le transport nucléaire de

la T3 par hCRYM a également été démontré *in vivo* (Mori et al., 2002 ; Hashizume et al., 1989). Cependant, le mécanisme d'action de hCRYM n'est pas encore connu. La résolution de la structure cristallographique du complexe hCRYM/NADPH (Cheng et al., 2007, code d'accès PDB 2I99) révèle l'organisation structurale de la protéine et le site de fixation du NADPH (Figure 17). La structure de hCRYM/NADPH a été résolue par la méthode de remplacement moléculaire* en utilisant le modèle de l'Alanine déshydrogénase d'*A.fulgidus* (AfAlaDH, Gallagher et al., 2004, numéro d'accès PDB 1OMO). Cette protéine présente environ 40% d'homologie avec hCRYM et fait parti de la famille des CTBPs/OCDs (qui sera présentée ultérieurement). La structure de hCRYM/NADPH présente deux monomères dans l'unité asymétrique* (Figure 17.B) et les deux monomères présentent une forte similarité (RMSD* de 0,39 Å). La structure finale de hCRYM comprend les résidus A2-A313, B3-B313, 149 molécules d'eau et deux molécules de NADPH. Le dernier résidu Lys314, muté dans les cas de surdité non syndromique, à l'extrémité C-terminale est invisible. L'absence de ce résidu dans la structure de hCRYM/NADPH est certainement due à sa flexibilité. L'extrémité C-terminale de hCRYM est proche de l'extrémité N-terminale. Les deux extrémités sont localisées dans le domaine de dimérisation et de fixation de la T3. Oshima et collaborateurs (2006) ont montré que la mutation K314T a pour effet d'abolir l'effet du NADPH sur l'affinité de la T3 pour hCRYM, en la diminuant, alors que X315Y augmente son affinité.

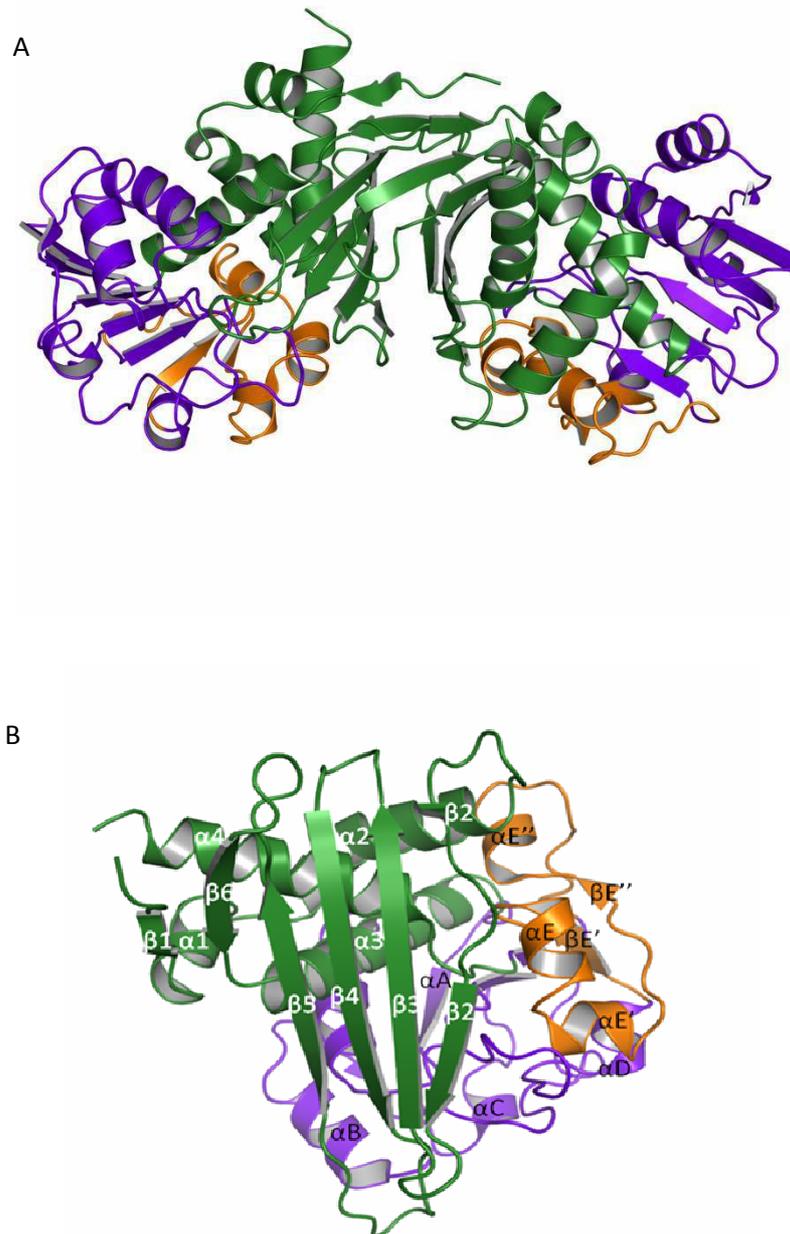


Figure 17 : (A) Structure cristallographique du dimère physiologique de hCRYM complexée au NADPH ; (B) Monomère de hCRYM. Adapté à partir de Cheng et al., 2007.

La protéine hCRYM est organisée en deux principaux domaines fonctionnels : le domaine de fixation de la T3 et le domaine de fixation du NADP(H) (l'annotation NADP(H) désigne le NADPH ou le NADP⁺), (Figure 18). Le domaine de fixation du NADP(H), compris entre les résidus 131 et 194, présente une organisation sensiblement similaire aux domaines NADP(H)

connus. De plus, il comporte le motif GxGxxA/G caractéristique de la fixation des dinucléotides et qui est conservé chez toutes les protéines avec un domaine à NAD(P) (Cette annotation désigne les deux couples redox NADP(H) et NAD(H)). Les domaines NAD(P) présentent une alternance de brins β et d'hélices α ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), connus sous le nom de Rossmann fold. Chez hCRYM, le domaine de Rossmann présente de multiples interruptions par l'ajout ou la suppression de structures secondaires non caractéristiques de ce domaine qui donne cette organisation $\beta A\alpha\beta B\alpha\beta C\alpha\beta D\beta E\alpha D\beta E'\alpha E\alpha'E'\beta E''\alpha E''\beta F$. Dans cette organisation, il manque une hélice α entre les brins βD et βE . Un sous-domaine (appelé domaine $\beta E'-\alpha E''$) est intercalé entre l'hélice αD et le brin βF du domaine de Rossmann et qui est composé de deux brins β ($\beta E'$ et $\beta E''$) et de trois hélices α (αE , $\alpha E'$ et $\alpha E''$) (Figure 17.B et Figure 18). Ce domaine se trouve très éloigné du site de fixation du NADP(H). Cette organisation de Rossmann fold like pourrait constituer la spécificité de la famille des CTBPs pour le domaine du NADP(H).

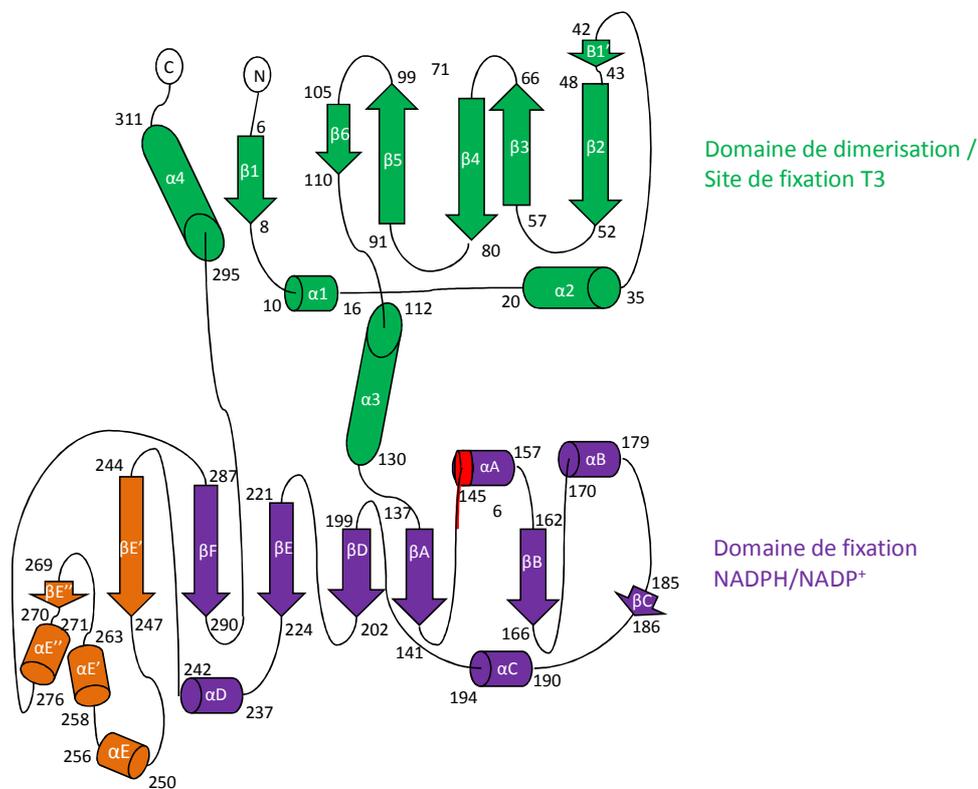


Figure 18 : diagramme de représentation des structures secondaires de hCRYM/NADPH

Une molécule de NADPH est observée dans chaque monomère de hCRYM. La fixation de la molécule de NADPH sur hCRYM implique des liaisons hydrogènes engagées directement avec les résidus de hCRYM et certaines, indirectement, par l'intermédiaire de molécules d'eau (Figure 19). La fixation de la molécule de NADPH par hCRYM est sensiblement similaire à celle des autres protéines avec un domaine de fixation du NADP(H).

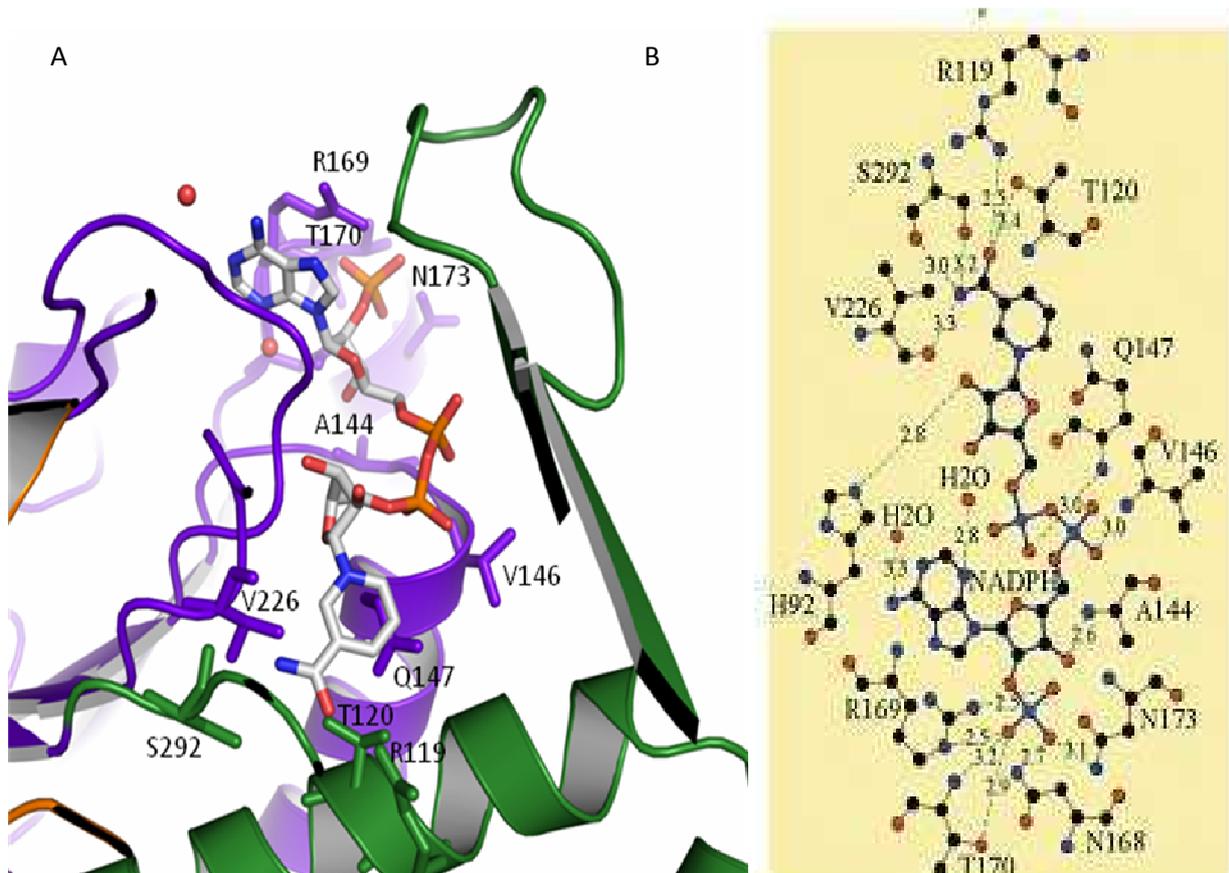


Figure 19 : Résidus de hCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADPH (A) Représentation du site d'interaction du NADPH, l'hélice $\alpha 3$ est impliquée dans la fixation du NADPH (représenté en vert), une structure secondaire partagée entre les 2 domaines (NADPH et T3/dimérisation). Les molécules d'eau sont représentées en sphère rouge ; (B) Représentation des liaisons hydrogènes entre le NADPH et les résidus de hCRYM impliqués dans l'interaction. D'après Cheng et al., 2007.

Le domaine de dimérisation est composé des résidus 2-130 et 195-311 (Figure 18). Ce domaine est également le domaine de fixation de la T3, mis en avant avec la structure de mCRYM/T3/NADP(H) (qui sera présentée ultérieurement). Ce domaine comporte un feuillet β antiparallèle, composé de sept brins β (de $\beta 1$ à $\beta 7$) dont les brins $\beta 1$ et $\beta 1'$ qui ne présentent pas une orientation antiparallèle. Ce domaine comporte également quatre

hélices α (de $\alpha 1$ à $\alpha 4$). Les deux monomères sont très similaires sauf au niveau de la boucle comprise entre les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ du domaine de dimérisation et de fixation de la T3 (appelée boucle $\beta 4$ - $\beta 5$, du résidu 80 à 91). Cette boucle, exposée à la surface de la protéine, présente des conformations différentes dans chaque monomère qui sont associées à des isomérisations *trans/cis* du résidu Pro90 (Figure 20). Cette double conformation de la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ semble suggérer une flexibilité de cette boucle qui n'est pas impliquée dans l'interface de dimérisation et semble plutôt orientée vers le site de fixation de la T3 et du NADP(H). Cependant, elle n'est pas assez proche du cofacteur NADPH pour que les résidus de cette boucle puissent interagir avec le NADPH. Cheng et collaborateurs (2007) suggèrent, pour la structure de hCRYM, que la fixation de la T3 pourrait stabiliser cette boucle.

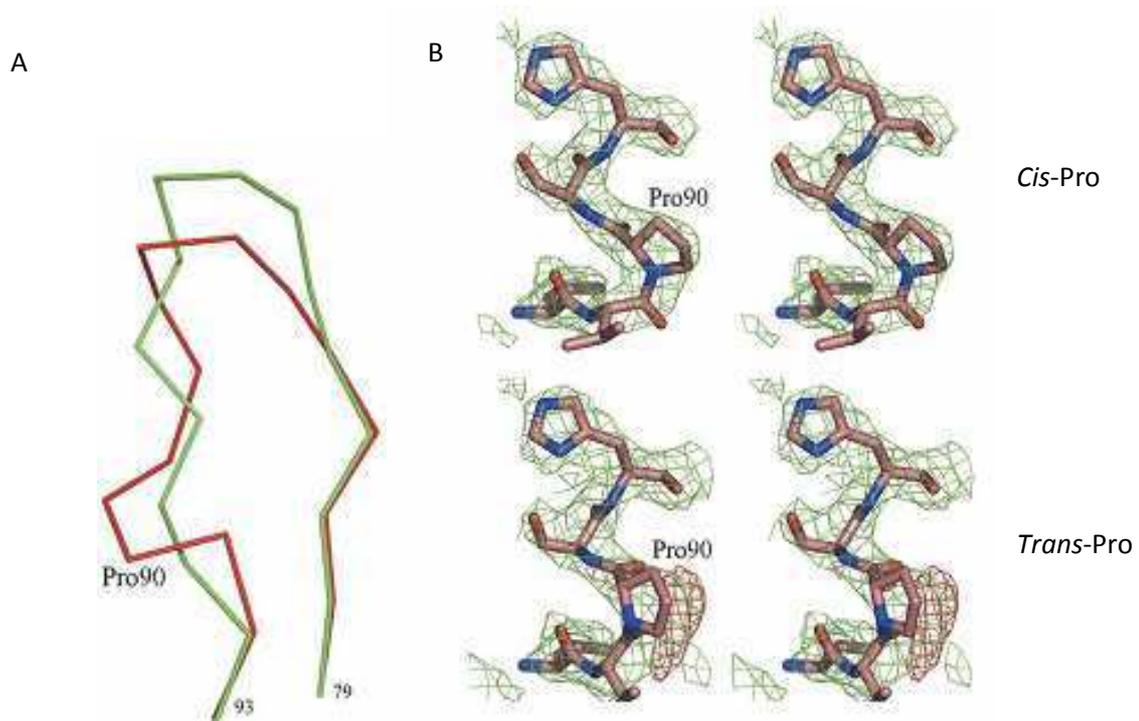


Figure 20 : Représentation des conformations de la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ de la structure de hCRYM ; (A) Superposition des boucles $\beta 4$ - $\beta 5$ des deux monomères de hCRYM/NADPH. La boucle avec la *cis*-Pro90 est représentée en rouge et la boucle *trans*-Pro90 est représentée en vert. (B) Représentation de la densité électronique de la *cis*-Pro avec l'affinement d'une *cis*-Pro (représentée en haut, 2Fo-Fc à 1σ , en vert) et d'une *trans*-Pro (représentée en bas, Fo-Fc à 3σ , en rouge). D'après Cheng et al., 2007.

C.8.2. Structures cristallographiques de mCRYM apo et mCRYM/NADP(H)

Les structures de mCRYM apo et mCRYM complexée au NADP(H) (mCRYM/NADP(H)) ont été résolues par le Dr. Franck Borel au laboratoire, respectivement, à une résolution de 2,3 et 2,4 Å (Tableau 7). Les formes cristallographiques, de ces deux structures, sont des dimères et correspondent donc à la forme physiologique de mCRYM et hCRYM (dimère non montré). Les monomères de l'unité asymétrique de mCRYM apo sont assez similaires (RMSD de 0.5 Å), ainsi que les monomères de la structure de mCRYM/NADP(H) (RMSD de 0.7 Å). L'organisation des structures secondaires de ces deux structures de mCRYM est identique à la protéine hCRYM (Figure 21.A et 21.B). La superposition des structures de mCRYM apo et mCRYM/NADP(H) montre une similitude au niveau des structures secondaires mais des changements de conformation sont observés sur certaines structures secondaires (RMSD de 1.05 Å). Ces changements sont majoritairement présents au niveau du domaine de fixation de la T3. En particulier, au niveau des brins β qui composent le feuillet β antiparallèle. Ce dernier apparaît en position fermé dans la structure de mCRYM/NADP(H) en comparaison avec la structure de mCRYM apo où il se trouve en position ouverte (Figure 21.C). Ce changement de conformation du feuillet β antiparallèle, du à la fixation du NADP(H), indique que le cofacteur influence la conformation du domaine de fixation de la T3. La comparaison avec la structure de mCRYM/T3/NADP(H), (abordée dans le chapitre 3), apportera des suggestions sur la nature redox de la molécule de NADPH présente dans la structure de mCRYM/NADP(H). En effet, du fait de l'instabilité du NADPH, la conversion du NADPH en NADP^+ aurait pu se produire.

Data collection	ID23 ESRF	mCRYM complexée au NADP(H)
Data reduction		
Space group		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimension (Å)		a = 75,9 b = 86,8, c = 93,1 α = 90,0, β = 90,0, γ = 90,0
Resolution range (Å)		50-1,99 (2.49-2.39)
Completeness (%)		96.5 (92.6)
Redundancy		3.56 (3.48)
I/sigma		10.74 (4.6)
R _{sym} (%)		10.7 (35.2)
Refinement		
r.m.s.d bonds (Å)		0.011
r.m.s.d angles (deg.)		1.8
Average B factor (Å ²)		20.31
R _{factor} /R _{free}		0.230/0.284
<hr/>		
Data collection	BM30A ESRF	mCRYM apo
Data reduction		
Space group		P2 ₁
Cell dimension (Å)		a = 45.3, b = 96,6, c = 76,1 α = 90,0, β = 103,3, γ = 90,0
Resolution range (Å)		50-2.3 (2.4-2.3)
Completeness (%)		98.9 (98.9)
Redundancy		2.94 (2.79)
I/sigma		13.49 (3.52)
R _{sym} (%)		5.9 (33.1)
Refinement		
r.m.s.d bonds (Å)		0.01
r.m.s.d angles (deg.)		1.14
Average B factor (Å ²)		23.65
R _{factor} /R _{free}		0.202/0.256

Tableau 7 : Données cristallographiques des structures de mCRYM/NADP(H) et mCRYM apo.

L'extrémité C-terminale, en particulier le résidu K314, n'est également pas visible dans les deux structures de mCRYM. Cette extrémité est proche de l'interface de dimérisation, cependant, elle n'engage pas de liaison entre les monomères. Par contre, elle est exposée à la surface de la protéine et pourrait par conséquent être impliquée dans l'interaction avec un partenaire de CRYMs.

Le domaine de fixation du NADP(H) présente une conformation sensiblement identique pour les deux structures. Le domaine $\beta E'-\alpha E''$, qui s'intercale dans le motif de Rossmann, présente un léger changement de conformation. Malgré sa localisation lointaine du site de fixation du NADP(H), il pourrait indirectement être impliqué dans la fixation du NADP(H).

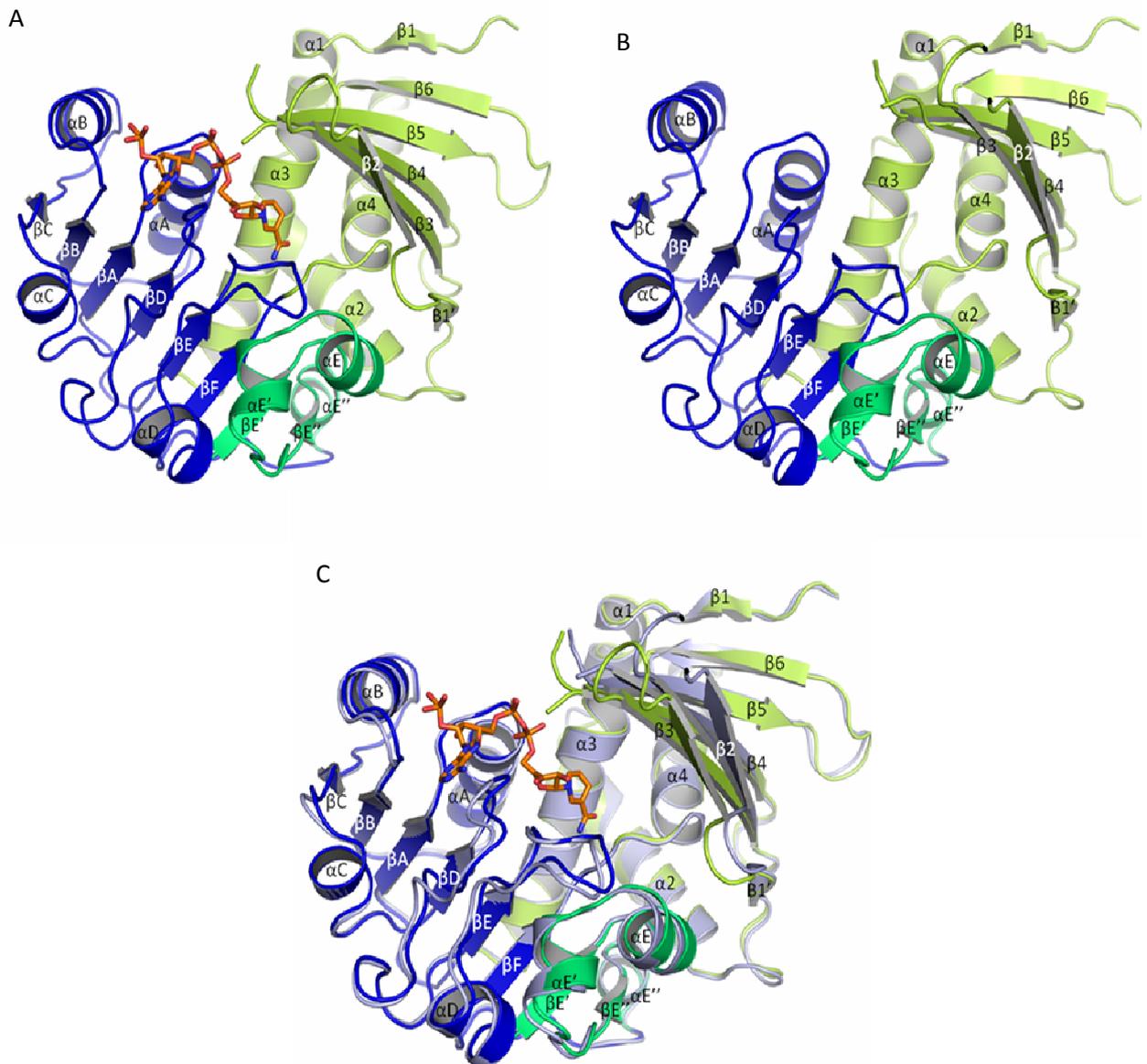


Figure 21: (A) Structures des monomères de mCRYM/NADP(H), (en orange); (B) mCRYM apo; (C) Superposition de la structure de mCRYM apo (en gris) et mCRYM/NADP(H), Représentation des domaines par couleurs : domaine de fixation de la T3 (en vert citron), domaine de fixation du NADP(H) (en bleu) et domaine $\beta E'-\alpha E''$ (en vert).

L'interaction du NADP(H) avec mCRYM fait intervenir les mêmes résidus que ceux impliqués dans l'interaction du NADPH avec hCRYM. Les cofacteurs dans les structures de mCRYM et hCRYM présentent la même conformation (Figure 22.B). De plus, la superposition des

structures de mCRYM et hCRYM ne montre pas de différences importantes au niveau de l'organisation des structures secondaires (RMSD de 0.6 Å), (Figure 22). Ce qui pourrait suggérer la présence de la forme réduite NADPH dans la structure de mCRYM/NADP(H).

Par ailleurs, une importante différence est présente au niveau de la boucle β 4- β 5 qui n'est pas visible dans les deux structures de mCRYM. Cette boucle est visible sur la structure de hCRYM/NADPH mais semblait flexible due à une différence de conformation dans chaque monomère induite par le résidu Pro90 (double isomérisation *cis/trans*). Les deux séquences d'acides aminés correspondant à cette boucle, de mCRYM (GHSNT-AVP) et hCRYM (DRGITSVVP) comportent uniquement trois résidus conservés ce qui représentent 30% d'homologie. L'absence de la boucle dans les deux structures de mCRYM confirme que le NADP(H) n'est pas suffisant pour stabiliser la boucle qui est d'autant plus flexible dans la structure de mCRYM comparée à celle de hCRYM. Est-ce que la fixation de la T3 est suffisante pour stabiliser cette boucle ou bien l'intervention d'un partenaire de CRYM est-elle nécessaire pour la stabiliser ? L'homologie de séquence, de 30%, entre les deux boucles de mCRYM et hCRYM est-elle suffisante pour permettre la fixation d'un même partenaire ?

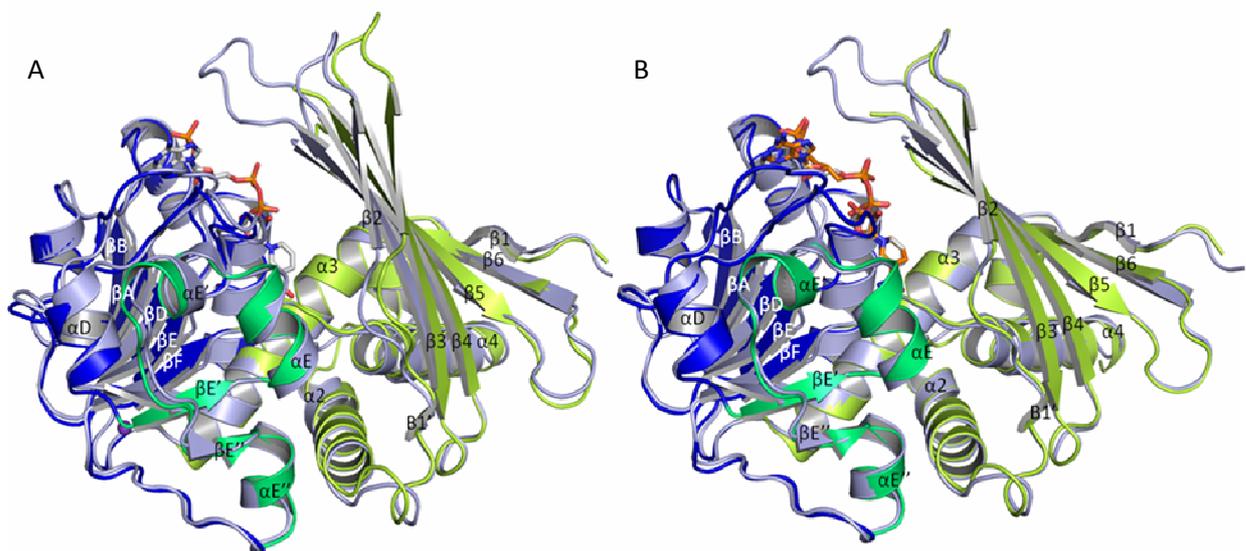


Figure 22 : Superposition de la structure de hCRYM/NADPH (en gris) avec mCRYM apo (même code couleurs que précédemment) (A) ; et mCRYM/NADP(H) (B)

La superposition de la structure de hCRYM/NADPH avec celle de mCRYM apo (Figure 22. A) présente un écart équivalent (RMSD de 1.2 Å) à celui observé entre les structures de mCRYM apo et mCRYM/NADPH (RMSD de 1.05 Å). Ceci est en adéquation avec la bonne superposition des structures de mCRYM et hCRYM complexées au NADPH (RMSD de 0.6 Å), (Figure 22.B) et conforte l'hypothèse de la présence de la forme réduite NADPH dans la structure de mCRYM/NADP(H).

C.8.3. Les homologues de CRYM et la famille des μ -crystallines/OCDs

Pour le moment, aucune activité enzymatique n'a été identifiée pour les protéines mCRYM, hCRYM ainsi que pour la μ -crystalline de kangourou. Pourtant, la séquence primaire de ces protéines présente une homologie avec les enzymes bactériennes, les Ornithines CycloDésaminases (OCDs, homologie d'environ 30%). Par leur homologie de séquence primaire avec cette classe enzymatique, ces μ -crystallines et certaines enzymes OCDs sont regroupées dans la même superfamille des μ crystallines/OCDs.

Aussi, ces μ -crystallines possèdent une homologie de séquence plus faible (autour de 20%) pour les enzymes glutamyl-tRNA reductase (gluTR), (Figure 23). Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse des porphyrines chez les bactéries et les plantes, qui utilisent comme substrat le glutamyl-tRNA pour produire le glutamate semi-aldéhyde.

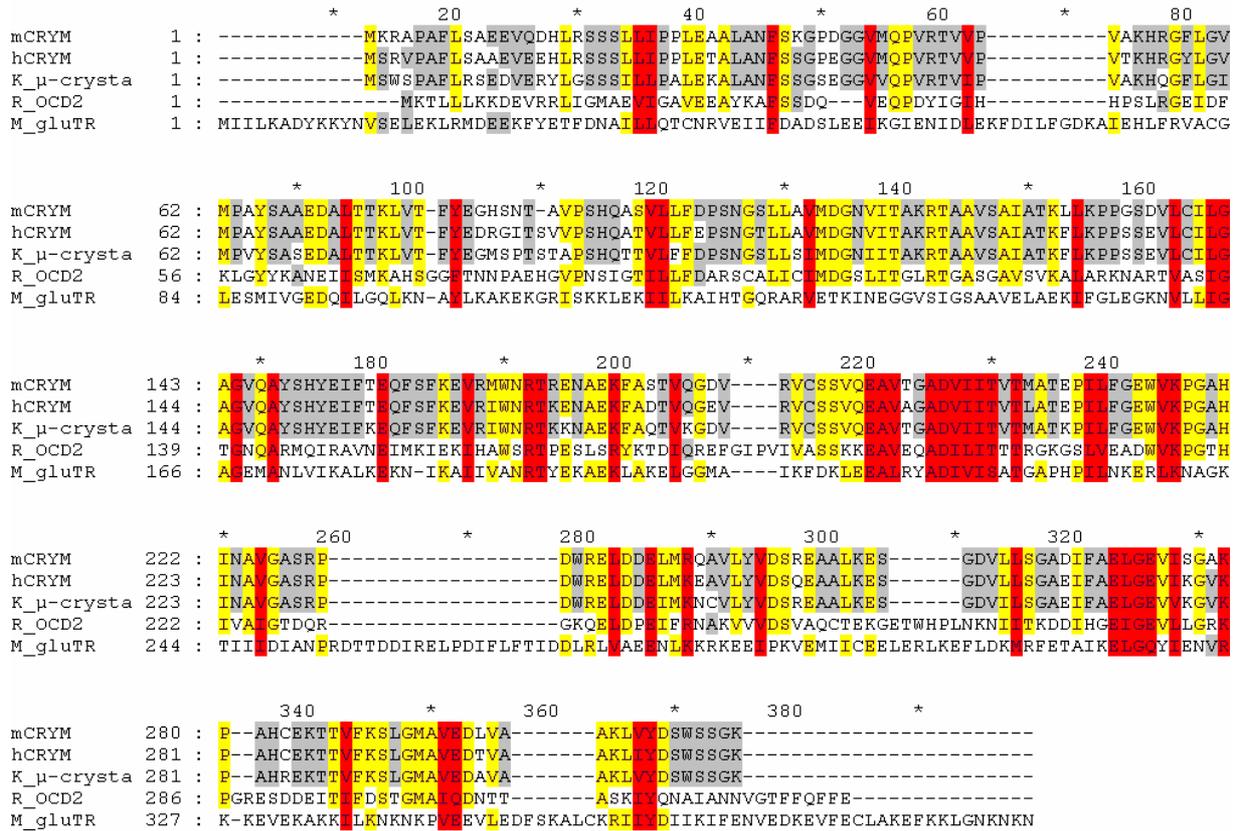


Figure 23 : Alignement de séquences d'acides aminés des protéines : CRYM murine (mCRYM, O54883), CRYM humaine (hCRYM, Q14894). Les deux protéines mCRYM et hCRYM possèdent 98% d'homologie de séquence primaire. La μ -crystalline de Kangourou (K _{μ} -crystalline, Q28488) possède 86% d'homologie (82% d'identité) avec mCRYM et hCRYM. L'enzyme ornithine cyclodésaminase de la bactérie *Rhizobium meliloti* (R_OCD2, P58339) en possède 30%. L'enzyme Glutamyl-tRNA réductase de l'archaea de *Methanocaldococcus jannaschii* (M_gluTR, Q60172) en possède 20%.

La superfamille des μ -crystallines/OCDs regroupe un certain nombre de protéines avec des fonctions différentes. Parmi ces protéines, seules trois structures tridimensionnelles ont été résolues, celles de mCRYM et hCRYM (hCRYM, Cheng et al., 2007, code d'accès PDB 2I99), de l'ornithine cyclodésaminase de *Pseudomonas putida* (PpOCD, Goodman et al., 2004, PDB 1X7D) et de l'alanine déshydrogénase d'*Archaeoglobus fulgidus* (AfAlaDH, Gallagher et al., 2004, PDB 1OMO), (Figure 24). Avant la caractérisation de l'activité de déshydrogénase, le gène (AF1665) codant pour la protéine AfAlaDH a été annoté comme un gène codant pour une OCD. Il a été surprenant de constater que le gène AF1665 code une protéine sans activité de cyclodésaminase mais plutôt avec une activité de déshydrogénase (Schroder et al., 2004). Il s'agit de la seule protéine de la famille des μ -crystallines/OCDs avec une telle

activité. La diversité de fonction et d'espèces de cette famille rappelle celle de la superfamille des cristallines et rend d'autant plus intéressant l'étude du lien évolutif entre ces protéines.

Les quatre séquences (mCRYM/hCRYM/PpOCD/AfAlaDH) présentent 85 résidus identiques ou fortement similaires (Figure 24). Parmi ces résidus, 32 résidus appartiennent au domaine de dimérisation et de fixation du ligand (T3 pour CRYM) ou du substrat (alanine pour l'AfAlaDH et ornithine pour la PpOCD). Les 53 autres résidus appartiennent au domaine de fixation du NAD(P) (y compris les structures secondaires non caractéristiques du domaine de Rossmann). Le domaine $\beta E'-\alpha E''$ possède 8 résidus conservés, ce qui représente environ 20% d'homologie pour ce domaine. Ce pourcentage suggère qu'il pourrait s'agir d'un domaine caractéristique de cette famille mais qui comprend des spécificités pour chaque protéine.

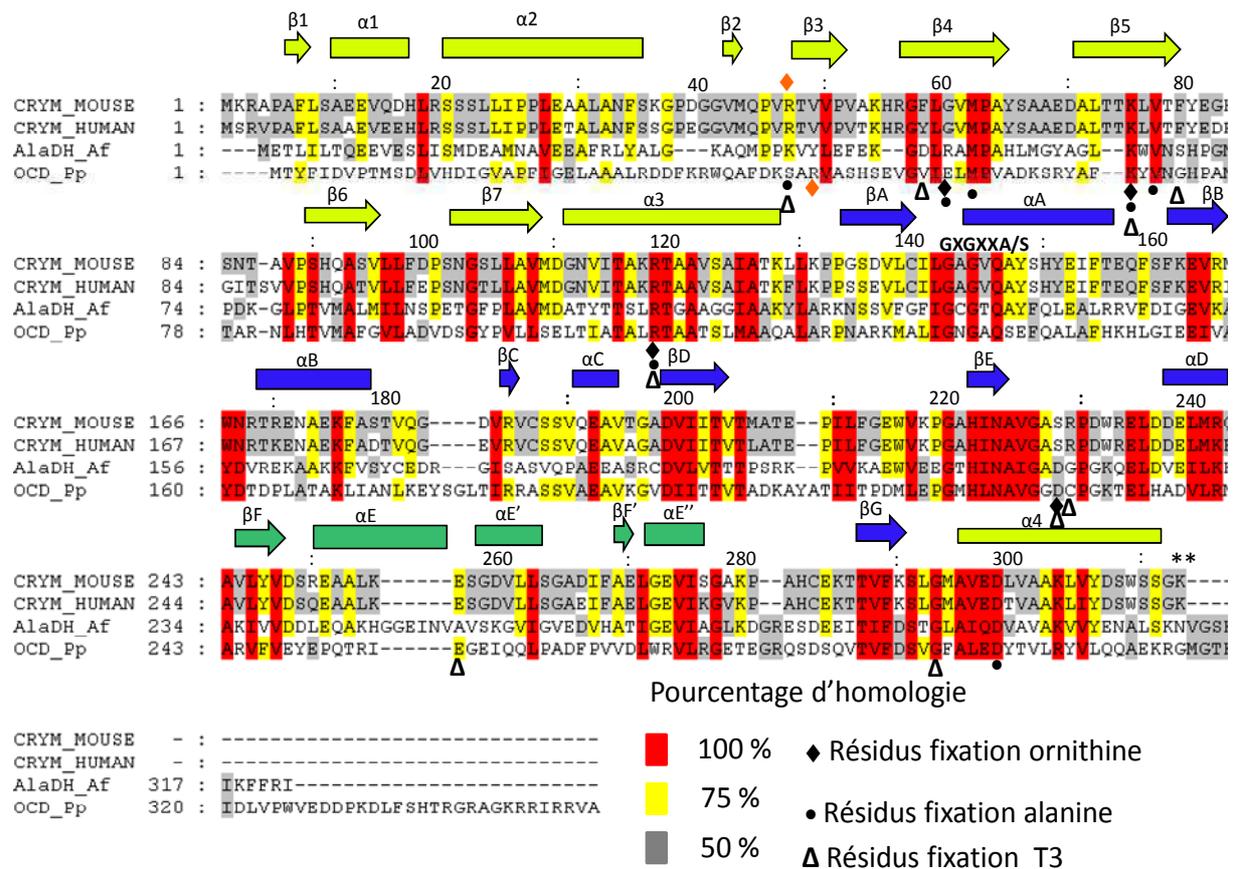


Figure 24 : Alignement de séquences de mCRYM (numéro accès O54883), hCRYM (Q14894, PDB 2I99), AfAlaDH (O28608, PDB 1OMO) et PpOCD (Q88H32, PDB 1X7D). Les structures secondaires représentées au-dessus des séquences correspondent à celle de mCRYM. Le motif GxGxxA/S est présent pour les quatre protéines avec une différence pour la PpOCD pour le dernier résidu qui est une sérine alors que les trois autres protéines présentent une alanine. Les résidus de l'enzyme PpOCD impliqués dans la fixation de l'ornithine (indiqués par des losanges représentés en-dessous des séquences). Seuls les résidus Arg45 de l'OCD et le résidu Arg47 pour mCRYM ne sont pas alignés entre les deux séquences et sont indiqués par un losange orange. Les résidus de l'AfAlaDH impliqués dans la fixation du substrat alanine sont indiqués par des cercles noirs en-dessous des séquences. Les résidus de mCRYM impliqués dans la fixation de la T3 sont indiqués par des triangles creux en-dessous des séquences.

Schroder et collaborateurs (2004) ont établi un arbre phylogénétique à partir de l'analyse des séquences primaires des protéines appartenant à la famille des μ -crystallines/OCDs/AfAlaDH (Figure 25). Cette famille est composée de 10 sous-familles dont la famille des μ -crystallines qui comprend les protéines μ -crystallines humaines (hCRYM), de souris (mCRYM), de rat et de kangourou. Il comprend également huit familles distinctes d'OCDs, dont la famille V qui comprend l'enzyme PpOCD (non indiquée sur l'arbre). Enfin, la famille X comprend l'enzyme AfAlaDH ainsi que d'autres enzymes AlaDH appartenant également au domaine des Archaea. Ces derniers présentent une machinerie de réplication de l'ADN, de transcription et de traduction proche des eucaryotes bien qu'elles soient des cellules procaryotes. Ces caractéristiques expliquent, en partie, la classification de cette famille d'AlaDH qui diffère des autres AlaDHs de bactéries. Par ailleurs, l'AfAlaDH présente plus de 90 % d'homologie avec d'autres OCDs (OCD1) appartenant aux bactéries du genre *Halobacterium*.

C.8.3.1. Ornithine cyclodésaminase de *P.putida*

Les OCDs (EC 4.3.1.12) sont des enzymes bactériennes qui catalysent la conversion de la L-ornithine en L-proline dans le catabolisme des opines. Ces dernières sont synthétisées dans les galles des plantes qui sont des excroissances tumorales anormales chez les plantes infectées par les bactéries du genre *Agrobacterium*. La réaction de cyclodésamination nécessite le cofacteur NAD^+ impliqué, en général, dans des réactions de catabolisme. Les produits de cette réaction sont la proline, l'ammoniac et le NADH (Figure 26).

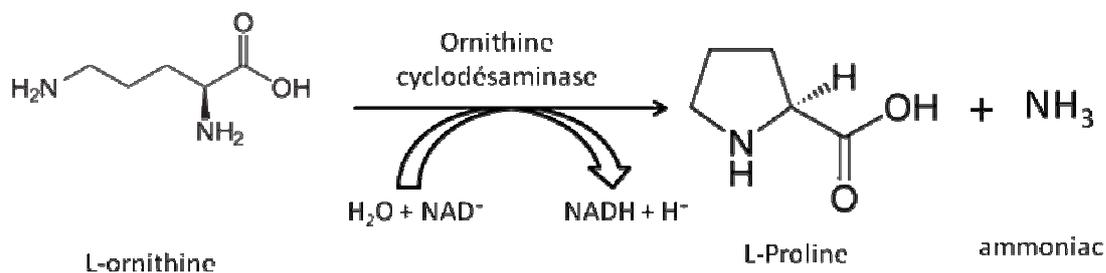


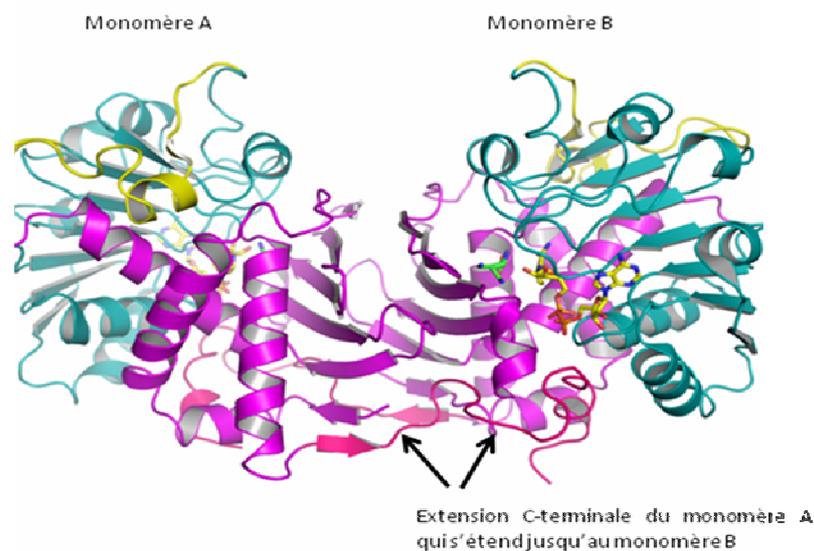
Figure 26 : la réaction de cyclodésamination du substrat L-ornithine en L-proline en présence de NAD^+ .

La structure cristallographique de l'OCD de *Pseudomonas putida* a été résolue (Goodman et al., 2004, PDB 1X7D) complexée au NADH et à la L-ornithine (Figure 27.A). La forme cristallographique est un dimère qui correspond à la forme physiologique de l'OCD. Sa structure secondaire a une organisation générale similaire à celles des protéines CRYMs (humaine et murine). Cependant, quelques différences sont observées (Figure 27.B et 27.C). Au niveau du domaine de dimérisation et de fixation à l'ornithine (du résidu 1-125 et 293-341), l'OCD possède une extension C-terminale qui lui rajoute une trentaine d'acides aminés en comparaison avec les CRYMs. Cette extension est composée du brin $\beta 7$ et de l'hélice $\alpha 6$. Ces structures s'étendent au monomère voisin, à proximité du site de fixation du NAD(H) de ce monomère (Figure 27.A). De plus, le résidu Lys 331, contenu dans cette extension, interagit avec le NADH. La séquence de cette extension C-terminale ne présente aucune homologie de séquence avec aucunes autres protéines. Elle est donc unique à la *PpOCD* et pourrait constituer la spécificité de l'enzyme *PpOCD* pour son substrat l'ornithine.

Au niveau de la boucle β 4- β 5 flexible sur les structures de CRYMs, l'OCD ne possède pas de boucle mais une hélice α (α 3), compris entre les brins β 4- β 5. Cette hélice est stable car elle est visible dans la structure.

Au niveau du domaine de fixation du NAD(H), l'OCD possède un domaine de Rossmann plus caractéristique de l'organisation connue pour ce domaine que celui de CRYMs, du fait de la parfaite alternance des brins β et des hélices α . Il est quand même interrompu par le domaine β E'- α E''. Il diffère des domaines de CRYMs par l'absence d'une hélice α (α E' de CRYMs) et par un léger allongement de l'hélice α E' de l'OCD qui correspond à l'hélice α E de CRYMs.

A



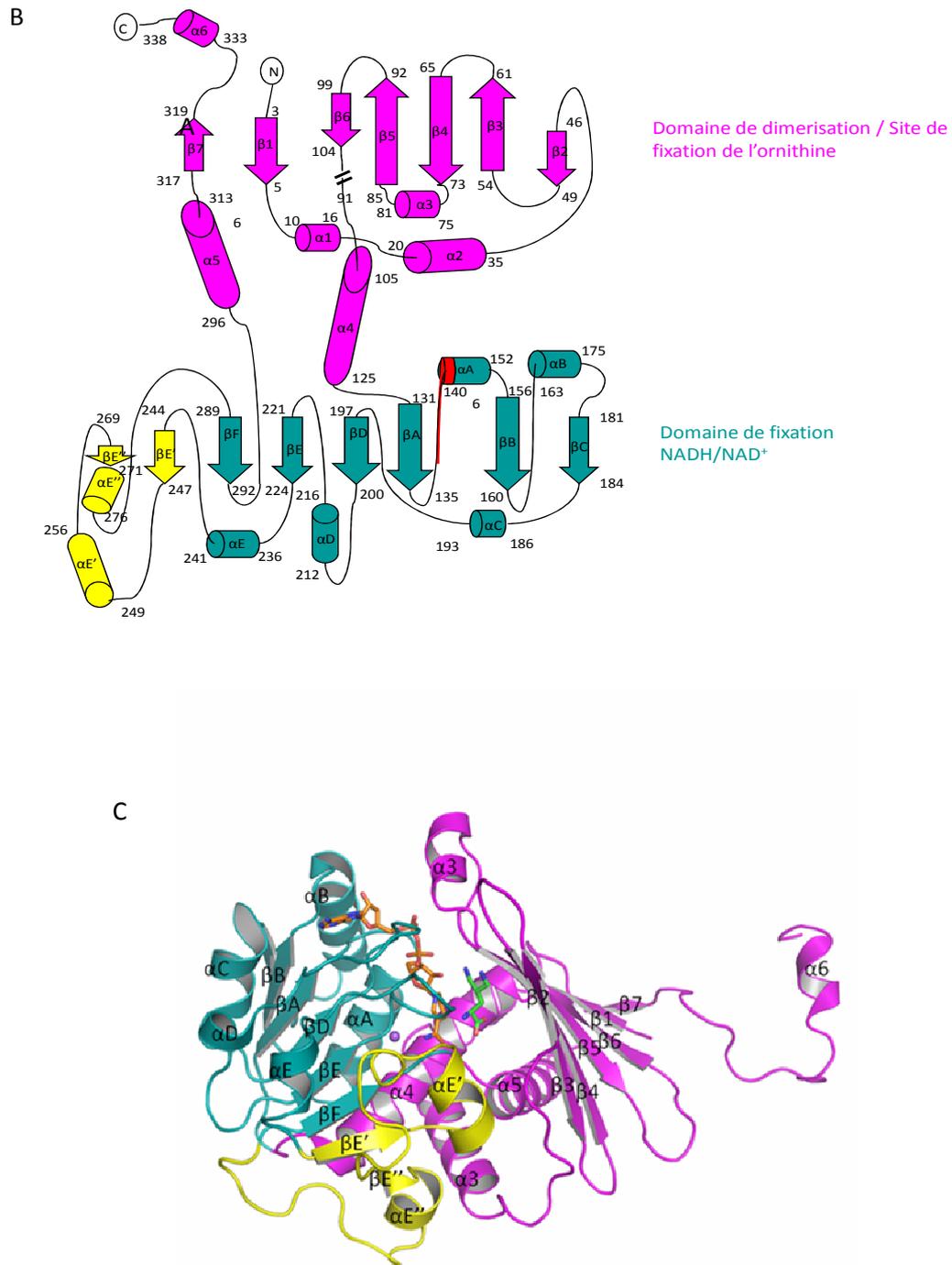


Figure 27 : (A) Structure cristallographique du dimère de l'OCD de *P.putida* ; (B) Organigramme des structures secondaires, le motif GYGXXS est représenté en rouge ; (C) structure du monomère avec l'extension C-terminale, spécifique à l'enzyme PpOCD.

Le mécanisme catalytique de cyclodésamination proposé par Goodman et collaborateurs (2004) implique les résidus Arg45, Glu56, Lys69, Arg112 et l'Asp228 (Figure 28). Le

groupement carboxylique de la L-ornithine interagit, par des liaisons hydrogènes, avec les résidus Arg45, Glu56, Lys69 et Arg112. Ces résidus n'ont pas de rôle catalytique mais participent, indirectement, en stabilisant l'ornithine dans le site actif. Le groupement α -aminé de l'ornithine effectue une liaison hydrogène avec le groupement carboxylique du résidu Asp228. Ce résidu est indispensable pour la stabilisation de l'ornithine dans le site actif et pour le transfert de l'ion hydrure de l'ornithine vers le NAD^+ . De ce fait, il constitue le résidu catalytique de la réaction de cyclodésamination. La comparaison des structures de mCRYM et *Pp*OCD montre la conservation des résidus Arg45, Lys69 et Arg112 alors que les résidus Glu59 et Asp228 ne sont pas conservés (Figure 24). La substitution de l'Asp par une sérine dans les séquences des protéines CRYMs (Ser228) ne permet pas la conservation de l'activité de cyclodésamination. De plus, des essais enzymatiques ont été effectués sur leur homologue μ -crystallines de kangourou (86% d'homologie avec mCRYM et hCRYM), ces essais n'ont révélé aucune activité de cyclodésaminase (Kim et al., 1992).

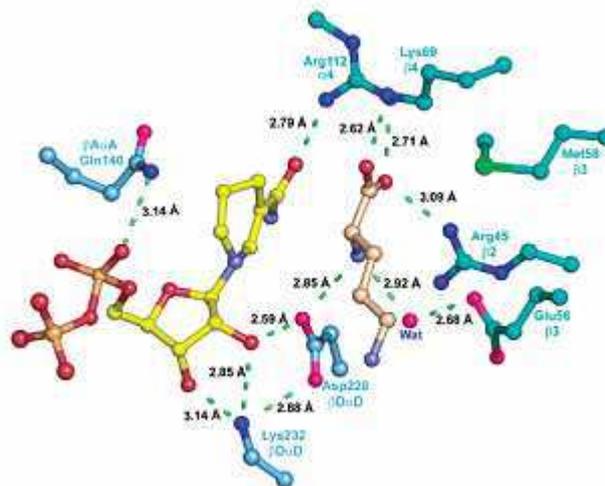


Figure 28 : Résidus impliqués dans la fixation et la réaction de cyclodésamination de l'OCD, en présence de NAD^+ . Le résidu Asp228 constitue le résidu catalytique. D'après Goodman et al. 2004.

C.8.3.2. Alanine déshydrogénase d'*A.fulgidus*

Les enzymes AlaDH catalysent la réaction de désamination réversible de la L-Alanine en L-pyruvate. Cette réaction nécessite la présence du cofacteur NAD^+ (Figure 29). Cette AlaDH, homologue à CRYM, est exprimée par une Archaea hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* (température optimale de croissance 83°C). L'AlaDH de cette Archaea ne présente pas d'homologie de séquence avec les autres déshydrogénases connues, appartenant au domaine du vivant des bactéries. De plus, très peu d'informations sont disponibles sur cette enzyme qui est la seule AlaDH, appartenant à la famille des μ -cristallines/OCDs. Avant la mise en évidence d'une activité alanine déshydrogénase (Schroder et al., 2004), le gène (AF1665) codant pour l'enzyme AfAlaDH a été annoté comme codant pour une OCD par son homologie de séquence avec de nombreuses OCDs telles que les enzymes OCD1 du genre *Halobacterium* qui possède plus 90% d'homologie et la PpOCD qui présente environ 30% d'homologie avec l'enzyme AfAlaDH.

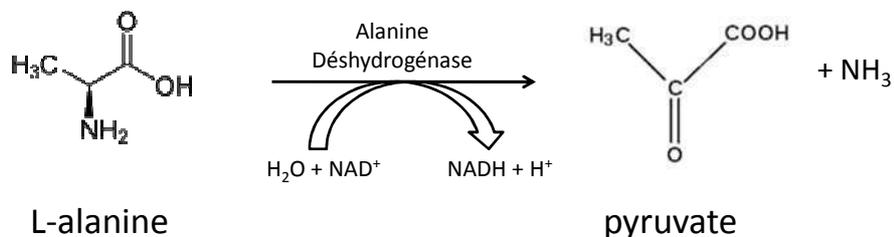


Figure 29 : réaction de L-alanine déshydrogénase, en présence de NAD^+ .

La structure cristallographique de l'AfAlaDH complexée au NAD^+ a été résolue (Gallagher et al., 2004, PDB 1OMO) et révèle un dimère cristallographique, la forme physiologique de la protéine (Figure 30.A). Les autres enzymes AlaDHs appartenant au domaine du vivant des

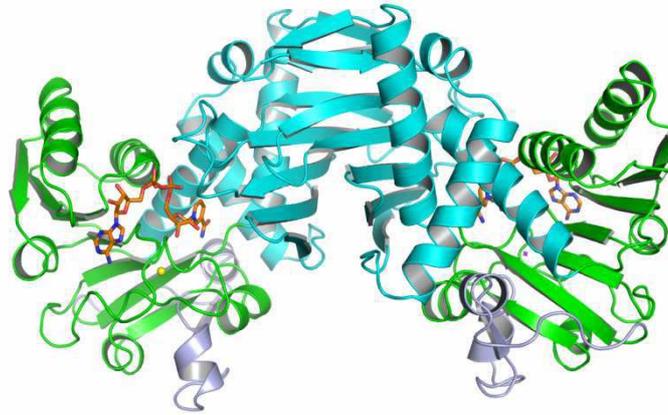
bactéries et qui ont été caractérisées structurellement présentent, la plupart une forme hexamérique telles que l'AlaDH de *Mycobacterium tuberculosis* (Andersen et al., 1992), *Streptomyces phaeochromogenes* (Itoh et al., 1983). D'autres formes oligomériques ont été identifiées chez certaines bactéries telles qu'une AlaDH tétramérique de *Streptomyces fradiae* (Vancura et al., 1989), octamérique chez *Streptomyces lapideum* (Baker et al., 1998). Malgré des différences dans la structure quaternaire, ces AlaDHs présentent une structure tertiaire similaire et une homologie d'environ 50%.

L'organisation en structure secondaire de l'AfAlaDH est plus proche de celle des protéines CRYMs par rapport à la PpOCD. Au niveau du domaine de dimérisation et de fixation de l'alanine, l'AfAlaDH possède une petite extension C-terminale qui lui rajoute une dizaine d'acides aminés par rapport aux séquences de CRYMs (Figure 30.B). Cette extension est composée du brin $\beta 7$ qui compose le feuillet β antiparallèle. De la même manière que ses homologues, cette extension C-terminale est exposée à la surface de la protéine.

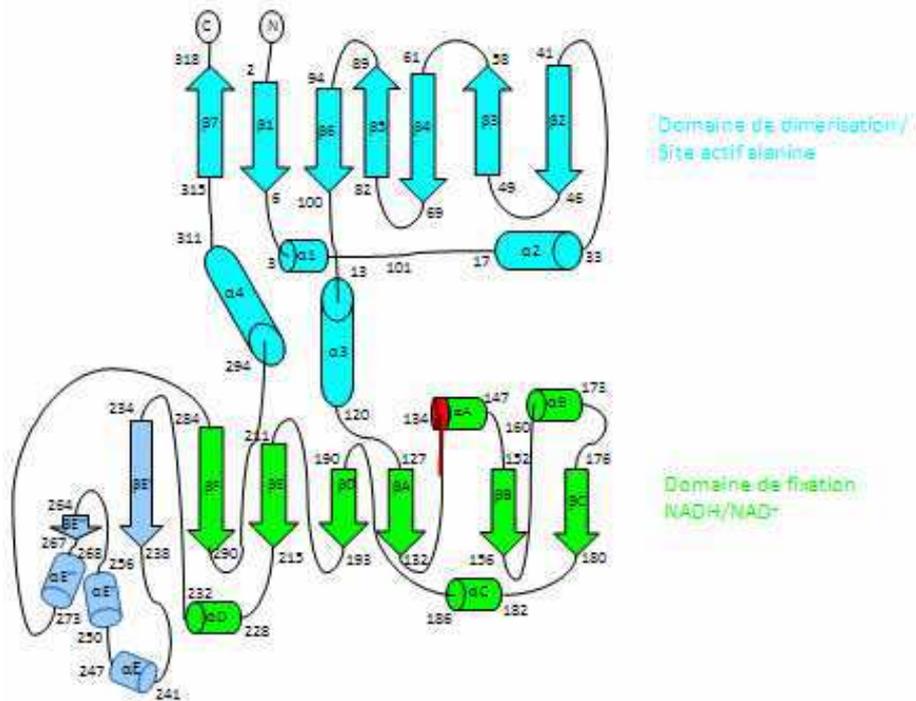
Au niveau de la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ flexible sur les structures de CRYMs, l'AfAlaDH possède également une boucle, comprise entre les brins $\beta 4$ - $\beta 5$. Cette boucle semble moins flexible car visible dans la structure.

Au niveau du domaine de fixation du NAD(H), l'AfAlaDH possède un domaine de Rossmann avec la même organisation que celle des structures de CRYMs. Il manque les mêmes structures pour permettre l'alternance de brins β et d'hélices α et il est également interrompu par le domaine $\beta E'$ - $\alpha E''$ qui est assez similaire au domaine de CRYMs au niveau de l'organisation des structures secondaires mais diffère par la longueur de ces structures qui sont plus importantes dans la structure de l'AlaDH.

A



B



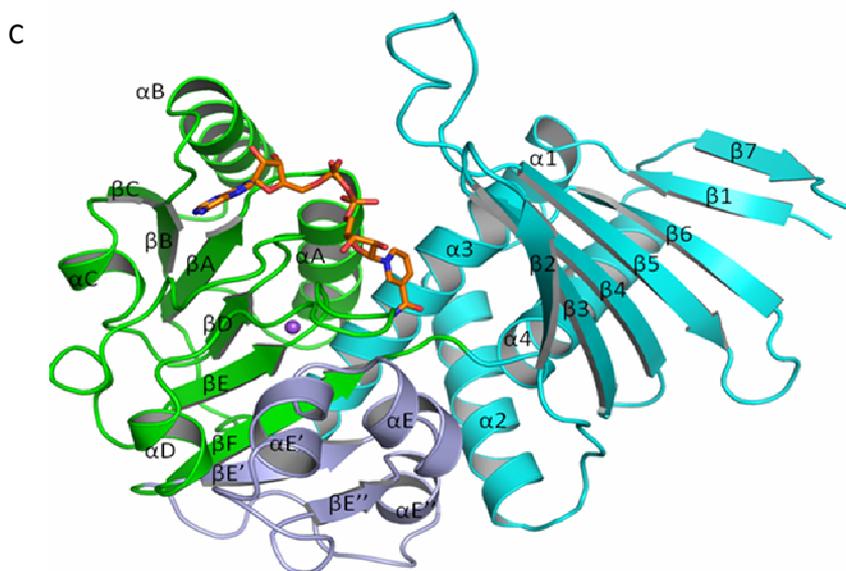


Figure 30 : (A) Structure cristallographique du dimère de l'AfAlaDH, (B) organigramme des structures secondaires, le motif GxGxxA est représenté en rouge (C) structure du monomère avec l'extension C-terminale, spécifique à l'enzyme AfAlaDH. L'ion sodium présent dans la structure est indiqué par une sphère perle.

A partir du modèle de fixation de l'alanine dans le site actif (Figure 31.A), un mécanisme catalytique a été proposé par Gallagher et collaborateurs (2004), (Figure 31.B). Les résidus Arg108, Asp297, Lys65, Lys41 et Arg52 semblent être impliqués dans la fixation de l'alanine dans le site actif. Deux molécules d'eau sont présentes dans le site actif (O503 et O510) et semblent indispensables pour la réaction catalytique par l'implication de la molécule d'eau O503 dans une attaque nucléophile sur le carbone alpha de l'alanine. Ces molécules sont stabilisées dans le site actif par les résidus Lys65, Lys41 et Arg52 de l'AlaDH qui correspondent aux résidus Lys75, Arg47 et Gly60 pour mCRYM. Dans les séquences de la PpOCD et des CRYMs, les résidus Lys65, Asp297 et Arg108 sont conservés alors que les résidus Lys41 et Arg52 ne sont pas conservés (substitués, respectivement, par les résidus Arg47 et Gly60 pour CRYMs et Ser43 et Glu56 pour la PpOCD). L'absence d'activité alanine déshydrogénase a déjà été confirmée pour hCRYM, ce qui suppose que la substitution des résidus Lys41 et Arg52 de l'AfAlaDH par les résidus Arg47 et Gly60 dans hCRYM ne permet pas la conservation de l'activité alanine déshydrogénase (Schroder et al., 2004).

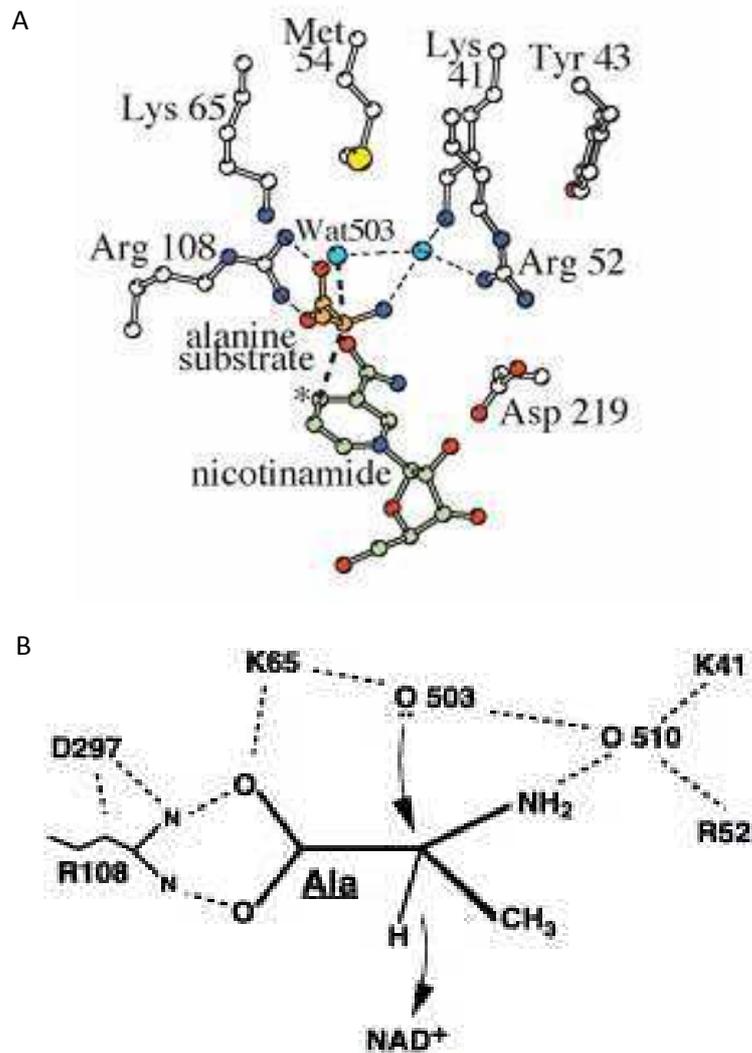


Figure 31 : (A) Modèle d'interaction de l'Alanine dans la structure cristallographique de l'AlaDH d'*A.fulgidus* complexée au NAD^+ , l'atome accepteur de l'ion hydrure est indiqué avec une étoile localisé à 3.6 Å de l'alanine ; (B) Mécanisme catalytique proposé à partir du modèle de fixation de l'alanine. O510 et O503 sont des molécules d'eau indispensables pour l'activité catalytique, notamment l'O503 qui est responsable de l'attaque nucléophile sur le carbone alpha de l'alanine (distance entre $\text{C}\alpha$ et O503 est de 2.5 Å). Les lignes en pointillées représentent des distances de moins de 3.2 Å. D'après Gallagher et al., 2004.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

A. CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES SOLUBLES

A.1. Clonage et criblage de l'expression et de la solubilité des protéines

A.1.1. Compte-rendu de la plate-forme RoBioMol

Le clonage et le criblage de l'expression et de la solubilité de la majorité des protéines sélectionnées pour l'étude structurale ont été confiés à Benoit Gallet (ingénieur CEA) et Marjolaine Noirclerc-Savoie (chercheur CEA), responsables de la plate-forme RoBioMol de l'IBS. Les résultats d'expression ont révélé qu'une seule protéine, la dysbindin1, suffisamment soluble pour débiter la purification pour les tests de cristallisation.

Pour la protéine mCRYM, Marie-Claude Gaillard, ingénieur CEA du laboratoire de physiogénomique, a réalisé le clonage (dans le plasmide pDEST 17) et les purifications pour les premiers tests de cristallisation qui ont permis la résolution des structures cristallographiques, réalisées par le Dr. Franck Borel, de mCRYM apo et mCRYM/NADP(H). Pour ce qui est de la protéine DCLK3, j'ai effectué le clonage et les tests d'expression.

A.1.2. Clonage et tests d'expression de la protéine DCLK3

L'amplification du gène Dclk3 (1857 pb) a été effectuée à partir du plasmide pDEST47 contenant le gène Dclk3 (fourni par la doctorante Laurie Galvan et le Dr. Emmanuel Brouillet, URA CEA-CNRS2210/MIRCen CEA Fontenay-aux-Roses).

Les séquences des oligonucléotides utilisées (Eurofins[®]) pour l'amplification du fragment d'ADN DCLK3 sont, l'oligo A : 5'-CTAGCTAGCTAGATGGGCAAAGAGCCGCT-3' (Tm = 70°C, %GC = 55) et l'oligo B : 5'-CGGAA TTC CGATTA ACTGTTGGGGGACTCCTC-3' (Tm = 75°C, %GC = 53) contenant, respectivement, les sites de restrictions NheI et EcoRI.

L'enzyme Phusion High-fidelity DNA polymérase (FINZYMES[®]) a été utilisée à 4 U/μl en présence de 4 ng/μL de plasmide pDEST47-DCLK3, 400 μM de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs), 1 μM de chaque oligonucléotides (A et B) et 5% de DMSO, le tout dilué dans du tampon fourni avec l'enzyme DNA polymérase.

Le programme de PCR est composé de 30 cycles dont chacun contient trois étapes successives : 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 2 minutes à 72°C. Avant le premier

cycle, une incubation de 10 minutes à 94°C a été effectuée afin de dénaturer les structures secondaires éventuellement présentes au niveau des oligonucléotides.

Le programme de PCR s'achève par une incubation de 20 minutes à 72°C afin de générer la séquence d'ADN poly-adenylée.

Après électrophorèse en gel d'agarose, les fragments d'ADN obtenus par PCR sont extraits en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid Quick Pure kit (Macherey-Nagel®).

La digestion de l'ADN Dclk3 et du vecteur pET28a+ (Novagen) par les enzymes de restrictions NheI et EcoRI a été effectuée selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs®). La ligase Rapid DNA ligation kit (Roche®) a été utilisée, selon les recommandations du fournisseur, pour l'insertion de l'ADN Dclk3 dans la cassette NheI-EcoRI du vecteur pET28a+ digéré. Ce vecteur permet l'expression de la protéine DCLK3 fusionnée avec une étiquette Histidine, à son extrémité N-terminale. Le produit de ligation est transformé dans la souche *E.coli* DH5α. La présence de l'insert Dclk3 a été confirmée par le séquençage d'un des clones positifs (Eurofins®).

L'expression de la protéine DCLK3 (PM = 69634,0 Da et pI = 7,3) s'est effectuée dans la souche *E.coli* BL21DE3. La croissance des cultures s'est effectuée à 37°C pour atteindre une Densité Optique (DO) autour de 0,7. Les cultures sont ensuite induites à une concentration finale d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) de 1mM, à 37°C pendant 3 heures (des échantillons de culture induites à 1 heure et 2 heures sont prélevés). Les fractions de culture cellulaire avant et après induction ont été déposées sur gel SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) pour un western Blot (WB). La membrane est ensuite incubée avec un anticorps anti-polyHistidine conjugué à la peroxidase directement sur cet anticorps (SIGMA-ALDRICH®). Ce dernier, ne nécessite pas d'anticorps secondaire. L'expression de DCLK3, sur les fractions de lysat cellulaire, n'était visible ni sur gel SDS-PAGE, ni sur WB. Par conséquent, l'extraction et la purification par chromatographie* d'affinité IMAC Nickel- nitriloacetic acid (Ni-NTA Qiagen®) ont été entreprises pour diminuer le nombre de contaminants qui pourraient empêcher la détection de DCLK3 par WB. La chromatographie Ni-NTA contient l'ion métallique Ni²⁺ qui comporte six liens de coordination dont quatre sont occupés par le NTA pour l'immobilisation du métal sur la résine. Les deux autres liens interagissent avec deux atomes d'azotes de deux cycles aromatiques de deux histidines.

La croissance et l'induction des cultures ont été réalisées comme décrites précédemment. Après l'induction de l'expression de DCLK3 pendant 3 heures, les cultures sont centrifugées et le culot est repris dans un tampon de lyse contenant 50 mM de Na_2HPO_4 à pH 8.5, 500 mM de NaCl, 10mM de β -mercaptoethanol, 1% de détergent tween-20, 10% de glycérol, 1mM de PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride) et 20 mM d'imidazole. Après sonication, le lysat est centrifugé et des échantillons du culot et du surnageant sont prélevés et déposés sur gel.

La purification par une chromatographie d'affinité Nickel (Ni-NTA Qiagen[®]) s'est effectuée, à 4°C. Après une première étape de lavage avec le tampon de lyse, un deuxième lavage est effectué avec le tampon de lavage 1 ayant la même composition que le tampon de Lyse mais avec une concentration en imidazole augmentée à 30 mM. Il est suivi d'une troisième étape de lavage avec un tampon de lavage 2, similaire au premier mais avec 50 mM d'imidazole. L'étape d'élution a été réalisée avec un tampon d'une composition sensiblement similaire aux précédents, sans tween et contenant 250 mM d'imidazole. Le dépôt de toutes les fractions sur gel SDS-PAGE à 12 % d'acrylamide (Figure 32) ne montre aucune bande clairement visible correspondant au poids moléculaire de la protéine DCLK3 (environ 70 kDa).

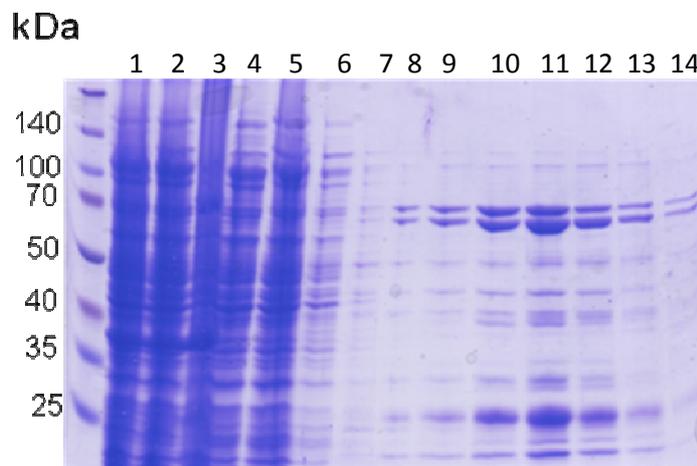


Figure 32 : Gel SDS-PAGE 12 % d'acrylamide contenant les fractions des différentes étapes d'extraction et de purification par chromatographie d'affinité Nickel de la protéine DCLK3. Les fractions numérotées de 1 à 14 correspondent dans l'ordre aux fractions : avant sonication, après sonication, culot, surnageant, fraction de protéines non retenues sur résine Nickel (flow through), lavage tampon de lyse, lavage tampon de lavage 1, lavage tampon de lavage 2, fractions d'élution 1, 2, 3, 4, 5 et 6.

Par conséquent, un WB a été effectué sur les fractions d'élution pour s'assurer de l'absence ou non de l'expression de la protéine DCLK3. La révélation du WB montre la présence de la protéine DCLK3 dans les trois premières fractions d'élution (Figure 33). Indiquant que la protéine DCLK3 est faiblement exprimée dans la fraction soluble. De plus, il semblerait que la protéine ait subi une dégradation à l'extrémité C-terminale (car His-tag à l'extrémité N-terminale). Suite à ces résultats et par manque de temps, les investigations sur la protéine DCLK3 ont été interrompues.

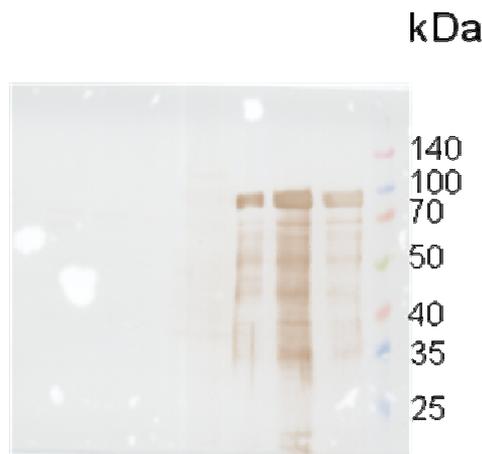


Figure 33 : Western blot anti-polyHistidine des fractions d'élutions de la chromatographie d'affinité Nickel de la fraction soluble de DCLK3. L'ordre de dépôt des fractions d'élution, de droite à gauche : Fractions d'élution 1, 2, 3, 4, 5 et 6.

A.2. Purification des protéines solubles

A.2.1. La protéine DYSBINDIN1

L'expression de la protéine DYSBINDIN1 (Dbndd1, PM = 20066,1 Da et pI = 4,5), est réalisée dans la souche *E.coli* Rosetta (Cette souche exprime les ARNt correspondant à 6 codons rares : AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA). La croissance des cultures s'est effectuée à 37°C pour atteindre une Densité Optique (DO) autour de 0,7. Les cultures sont ensuite induites à une concentration finale d'IPTG de 1mM, à 16°C pendant toute la nuit (environ 12h). Après induction, les cultures sont centrifugées et le culot est repris dans un tampon de lyse contenant 50 mM d'Hepes pH 8, 500 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole, 10mM de β -mercaptoethanol, 1% de détergent tween-20, 10 % de glycérol et 1 mM de PMSF. Après

sonication, le lysat est centrifugé et la majorité de la protéine est présente dans la fraction soluble.

Par la présence d'un His-tag à l'extrémité N-terminale de la protéine, la première étape de purification s'est effectuée par une chromatographie d'affinité Nickel (Ni-NTA Qiagen[®]) sur Chromatographie Liquide à Faible Pression (FPLC, Akta[®]), à 4°C. Toutes les étapes de purification sont effectuées avec des colonnes prêtes à l'emploi (GE-Healthcare[®]) utilisables sur les systèmes automatisés de Chromatographie (FPLC). L'appareil est équipé de détecteurs UV, conductimètre et d'un collecteur de fraction. Une interface informatique permet de suivre la purification et d'exécuter des commandes sur l'appareil FPLC.

Après un premier lavage avec le tampon de lyse, un deuxième puis un troisième sont effectués à 30 et 50 mM d'imidazole. La protéine Dbndd1 est éluée avec un tampon d'élution contenant 50 mM d'Hepes pH 8, 500 mM de NaCl, 250 mM d'imidazole, 10 mM de β -mercaptoethanol, 10 % de glycérol et 1mM de PMSF (Figure 34).

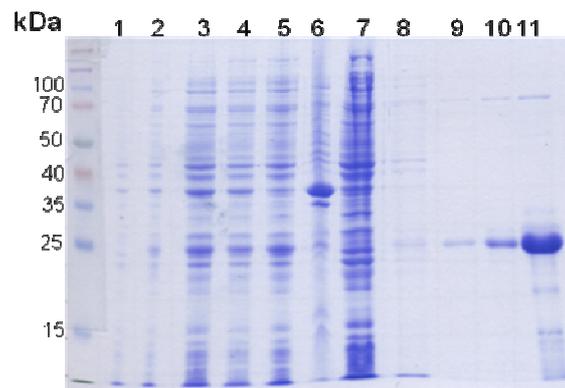


Figure 34 : Gel SDS-PAGE 15 % d'acrylamide contenant les fractions des différentes étapes d'expression, d'extraction et de purification par chromatographie d'affinité Nickel de la protéine Dbndd1. Les fractions numérotées de 1 à 11 correspondent dans l'ordre aux fractions : avant induction, après induction, avant sonication, après sonication, surnageant, culot, fraction de protéines non retenues sur résine Nickel (flow through), lavage tampon de lyse, lavage tampon de lavage 1, lavage tampon de lavage 2, fractions d'élution 1, 2, 3 et 4.

En plus d'être une étape de purification, la chromatographie d'exclusion de taille constitue un contrôle qualité de l'homogénéité de la préparation de protéine. Cette étape est réalisée avec une colonne HiLoad 16/60 Superdex 75 (grade préparatif, 16 mm de diamètre, 60 cm

de haut), qui est immédiatement réalisée à partir de la fraction d'éluion contenant la protéine, sans étape préalable de dialyse.

La chromatographie d'exclusion de taille, aussi appelée, gel filtration permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur conformation (globulaire, tubulaire...). La séparation se fait grâce à des granules de gel poreux. Le principe de technique consiste à exclure les grosses molécules qui ont un diamètre supérieur à celui des pores. Ces grosses molécules sont éluées en premier, au niveau du volume mort (V_m) de la colonne. Les molécules qui sont incluses dans le gel ont une migration freinées. Ainsi, les granules de gel poreux permettent une éluion des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

L'éluion de la protéine s'est effectuée avec un tampon contenant 20 mM d'Hepes pH 7.5, 100 mM de NaCl et 3 mM de DTT (Figure 35).

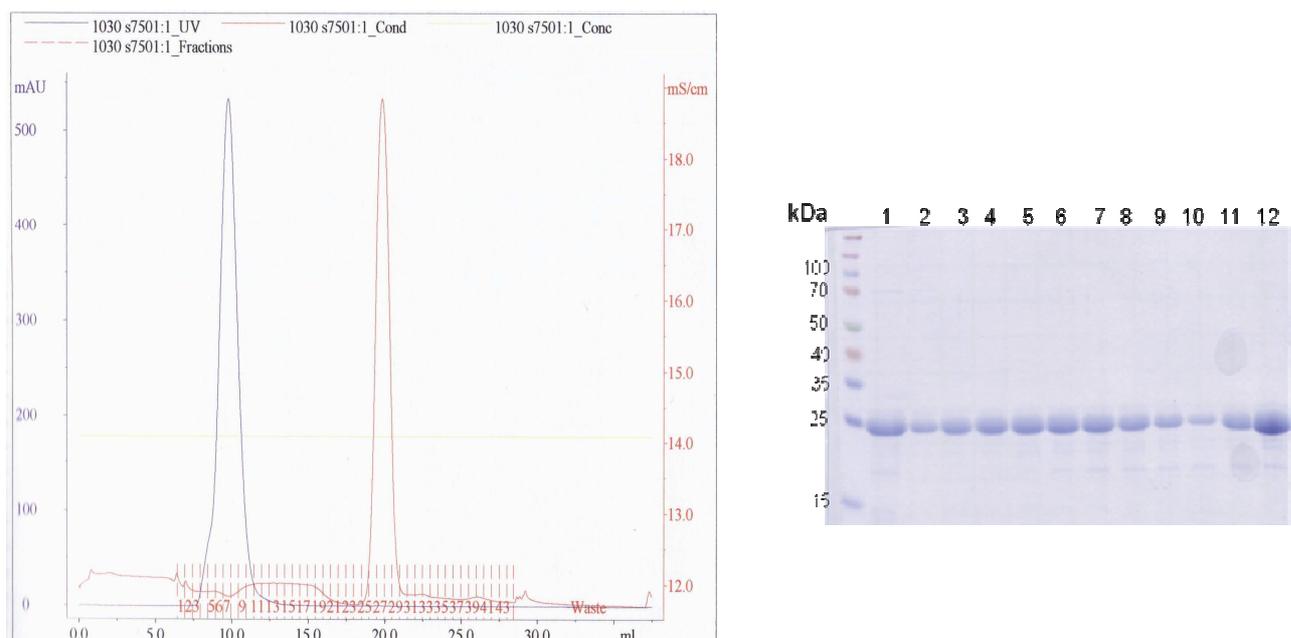


Figure 35 : Profil d'éluion et SDS-PAGE de la chromatographie de taille HiLoad 16/60 Superdex 75 de la protéine Dbndd1. Les numéros de chaque piste du gel SDS-PAGE correspondent dans l'ordre aux fractions : échantillon injecté dans la colonne, fractions d'éluion de la piste 2 à 10, pool des fractions d'éluion, fraction concentrée. Rendement de purification 10 mg/L de culture.

A.2.2. La protéine mCRYM

L'expression de la protéine mCRYM (PM = 36 180 Da, pI = 6) s'est effectuée dans la souche *E.coli* Rosetta. La croissance et l'induction des cellules bactériennes sont réalisées de la même manière que la protéine Dbndd1. Après induction, les cultures sont centrifugées et le culot cellulaire est repris dans un tampon de lyse contenant 50 mM d'Hepes à pH 7.5, 500 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, 3 mM de DTT et 10 % de glycérol. Après sonication, le lysat est centrifugé et la majorité de la protéine mCRYM est obtenue dans la fraction soluble. Lors de la purification de mCRYM pour la cristallisation du complexe mCRYM/T3/NADPH, le cofacteur NADPH à une concentration 0,1 M et le ligand, l'hormone thyroïdienne T3 à 10^{-4} M, sont ajoutés dans le lysat et dans tous les tampons.

La première étape de purification s'effectue par une chromatographie d'affinité Ni-NTA (Qiagen®). Une étape de batch qui consiste à incuber la résine Nickel avec le lysat de mCRYM précède l'étape de lavage avec le tampon de lyse à 10 mM d'imidazole puis un second lavage est effectué avec le même tampon à 20 mM d'imidazole. L'élution s'effectue avec le même tampon à une concentration de 250 mM d'imidazole (Figure 36).

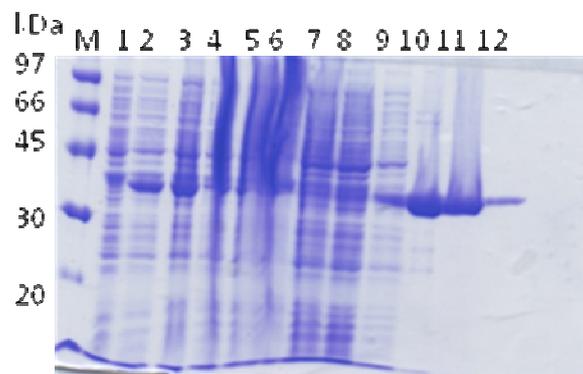


Figure 36 : Gel SDS-PAGE 12 % d'acrylamide contenant les fractions des différentes étapes d'expression, d'extraction et de purification par chromatographie d'affinité Nickel de la protéine CRYM. Les fractions numérotées de 1 à 12 correspondent dans l'ordre aux fractions : avant induction, après induction (2 et 3), avant sonication, après sonication, culot, surnageant, fraction de protéines non retenues sur résine Nickel (flow through), lavage 1 à 20 mM d'imidazole, lavage 2 à 50 mM d'imidazole, fractions d'élution à 250 mM d'imidazole.

La fraction d'élution est directement injectée dans une colonne d'exclusion de taille, HiLoad 16/60 superdex 200 (grade préparatif, 16 mm de diamètre, 60 cm de haut). Après cette

dernière étape de purification, la protéine est dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl et 3 mM de DTT (Figure 37).

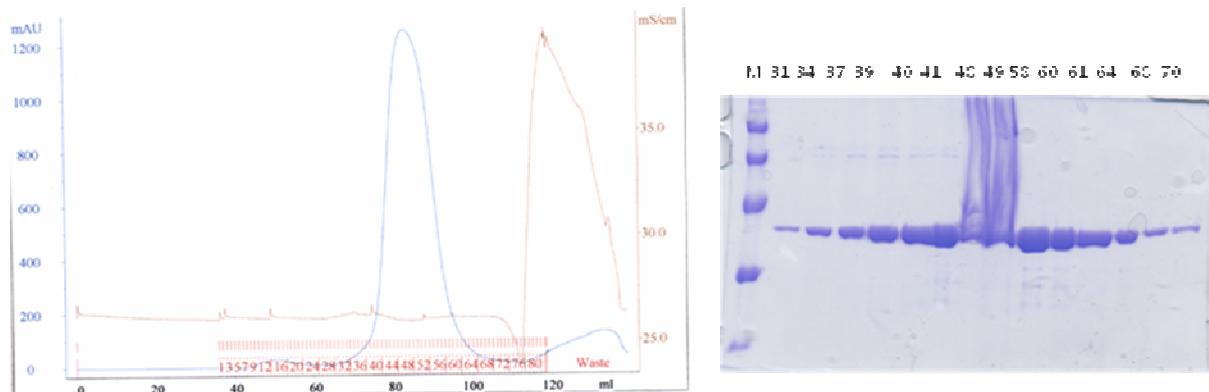


Figure 37 : Profil d'élution de la chromatographie de taille HiLoad 16/60 Superdex 200 et SDS-PAGE 12% d'acrylamide. Les numéros de chaque piste du gel SDS-PAGE correspondent aux numéros des fractions d'élution éluées sur la chromatographie. Le volume de la colonne auquel s'élue la protéine mCRYM correspond au dimère de mCRYM (environ 70 kDa). Rendement de purification 10 mg/L de culture.

B. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

B.1. Spectrométrie de masse dénaturante

Afin de contrôler la masse moléculaire des protéines Dbndd1 et mCRYM avant cristallisation, les fractions purifiées de Dbndd1 et de mCRYM ont été, respectivement, analysées par MALDI-TOF MS et ESI-TOF MS (Autoflex, Bruker Daltonics®), en condition dénaturante. Les analyses ont été effectuées par Izabel Bérard (ingénieur d'étude CNRS), et le Dr. Luca Signor (ingénieur-chercheur CEA), tous les deux en charge de la plate-forme de spectrométrie de masse à l'IBS. Les échantillons sont dilués dans 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) pour effectuer l'analyse en condition dénaturante. Puis les échantillons sont déposés et mélangés (rapport 1/1) avec la matrice MALDI (SIGMA-ALDRICH®) : acide sinapinique dans l'acetonitrile/eau-0.1% TFA, rapport 50/50.

B.1.1. La protéine Dysbindin1

Le profil du spectre MS révèle une masse moléculaire de la protéine Dbndd1 de 19332 Da, qui correspond à la masse de la protéine sans la méthionine à l'extrémité N-terminale (Figure 38).

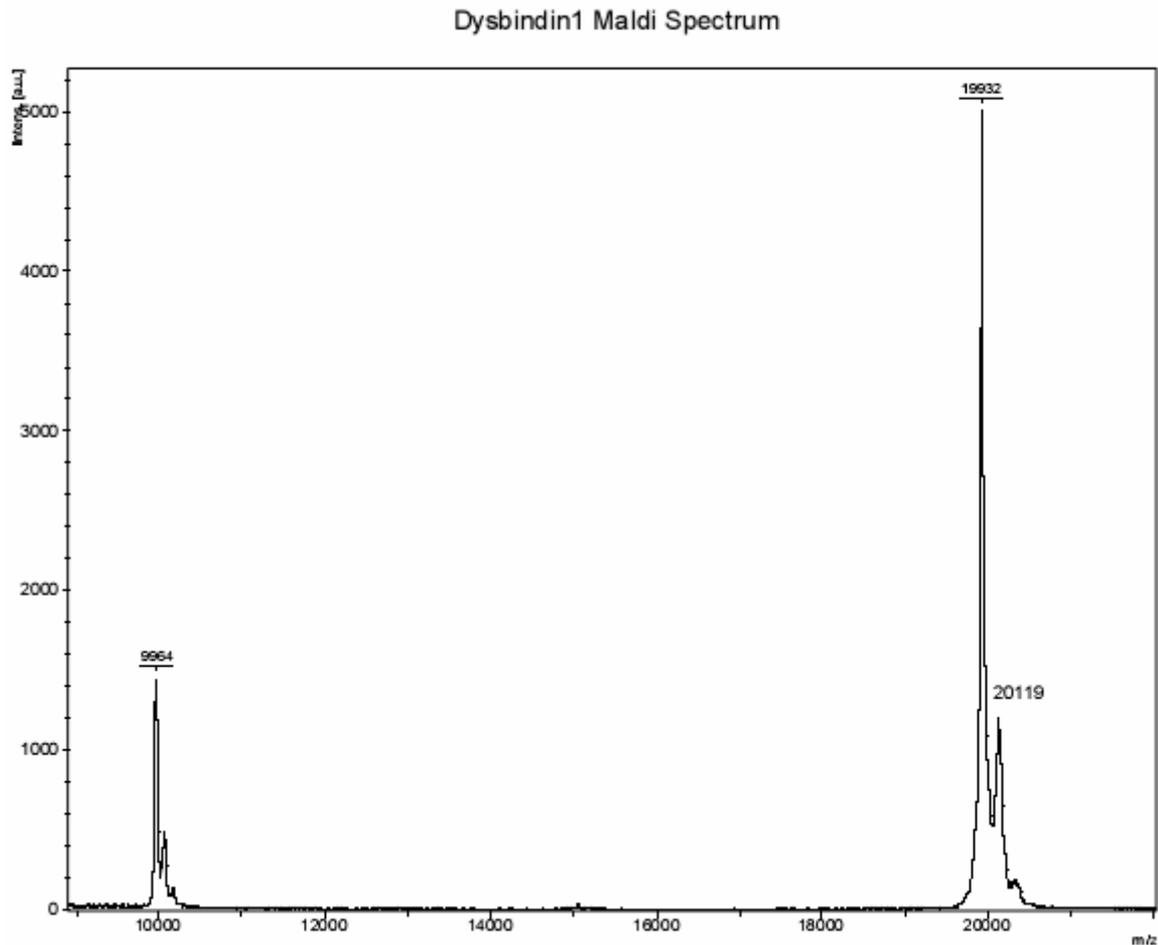


Figure 38 : Spectre MALDI-TOF MS de la protéine Dbndd1 en condition dénaturante.

B.1.2. La protéine mCRYM

Le spectre ESI-TOF MS de la protéine mCRYM en condition dénaturante montre deux masses moléculaires (36125 Da et 36049 Da). La protéine avec une masse de 36049 Da correspond à la protéine mCRYM sans la méthionine à l'extrémité N-terminale (la masse de mCRYM avec la méthionine est de 36180 Da). La masse de 36125 Da possède une différence de 76 Da par rapport à la précédente masse (36049 Da). La masse de 76 Da correspond à celle du β -mercaptoethanol. Il se pourrait que certaines molécules de mCRYM aient conservé une molécule de β -mercaptoethanol dans leur structure. Malgré cette différence de masse, on peut conclure que le profil de MS montre une bonne homogénéité de la protéine mCRYM (Figure 39).

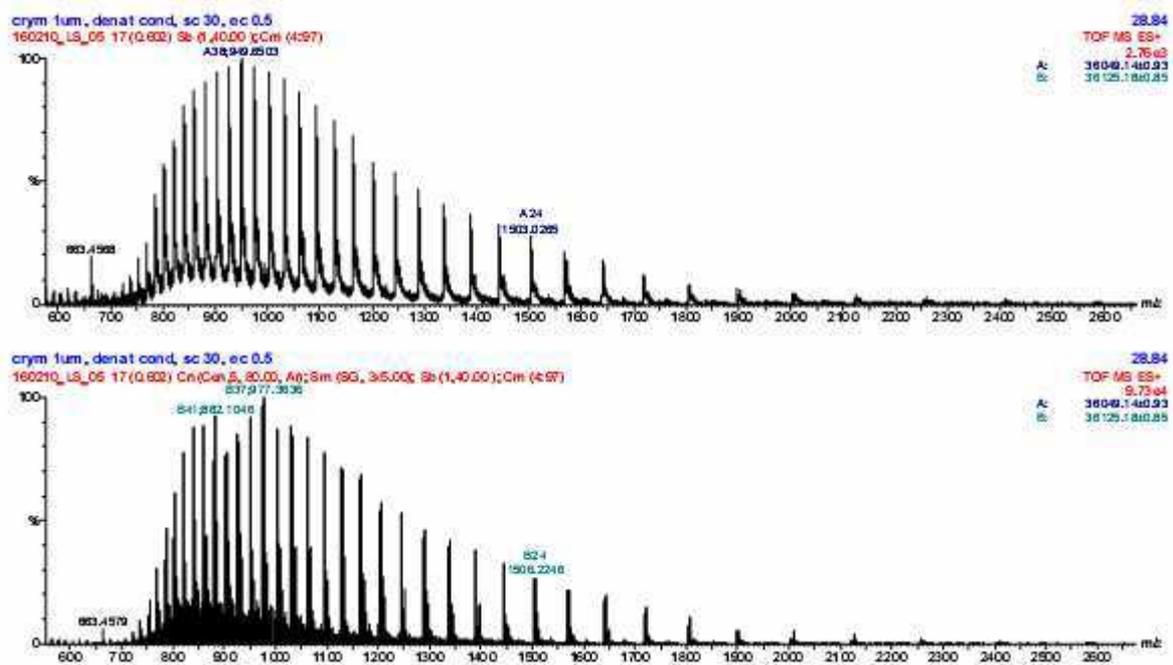


Figure 39 : spectre ESI-TOF MS de la protéine mCRYM en condition dénaturante.

B.2. Analyse par RMN-1D de la protéine DYSBINDIN1

Une analyse par Résonance Magnétique Nucléaire-1D a été effectuée pour la protéine Dbndd1, par le Dr. Adrien Favier, en charge de la plate-forme RMN à l'IBS. Cette analyse a pour but de déterminer l'état de repliement et l'homogénéité de la protéine. Cette analyse du repliement de la protéine se fait par l'analyse de la dispersion des déplacements chimiques des protons amides et méthyles ainsi que l'analyse de la largeur de raie des résonances. La figure 40 montre deux spectres d'une même protéine non repliée (Figure 40.A) et bien repliée (Figure 40.B). Les avantages de cette technique d'analyse est sa rapidité et la quantité d'échantillon nécessaire (50 μ l à 100 μ M). Comme l'analyse est effectuée, en solution, dans les conditions de tampon de la protéine, c'est-à-dire sans addition de composants, et que la protéine ne subit aucune dénaturation, l'échantillon peut être à nouveau utilisé.

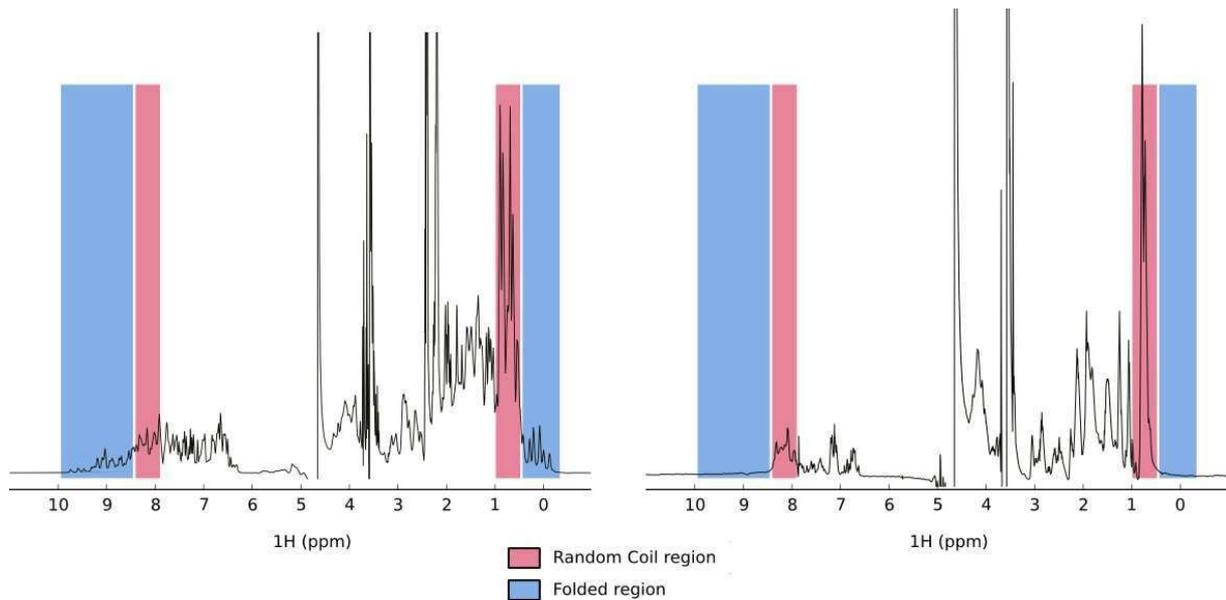


Figure 40 : Spectre RMN-1D proton d'une protéine bien repliée (spectre de gauche) et d'une protéine mal repliée (spectre de droite). La dispersion des pics des protons amides (entre 8 et 10 ppm) et des méthyles (entre 1 et 0 ppm) est une forte indication du repliement des protéines. Tirée du poster de la plate-forme RMN, Adrien Favier.

La protéine Dbndd1 révèle un spectre RMN 1D d'une protéine mal repliée (Figure 41). Cette information est en corrélation avec le profil de gel filtration qui montre un profil d'élution de la protéine au volume mort de la colonne HiLoad 16/60 Superdex 75 (gamme de PM compris entre 3 et 70 kDa), ce qui laisse supposer que la protéine Dbndd1 éluee correspond à des agrégats solubles.

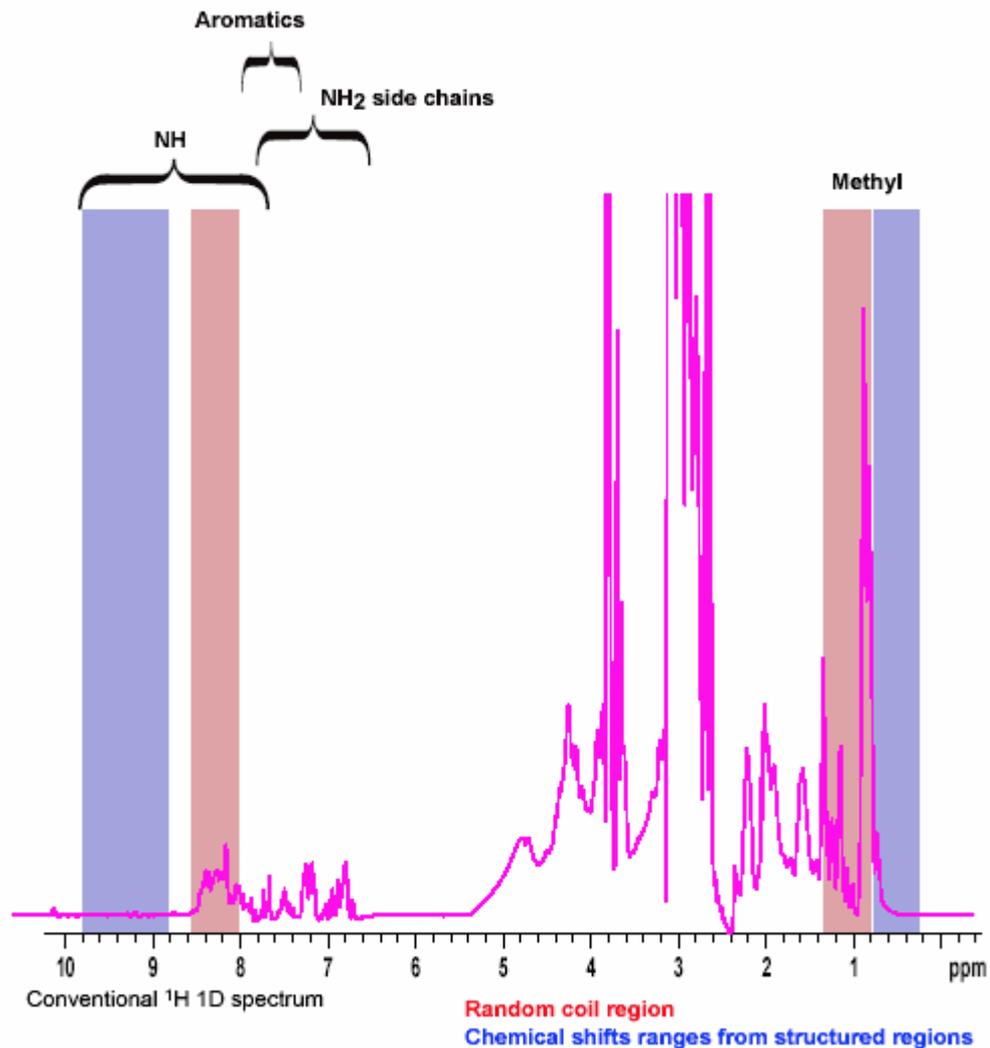


Figure 41 : Spectre RMN-1D de l'échantillon de la protéine Dbndd1. Ce spectre montre que la protéine est mal repliée.

C. CRISTALLISATION DE mCRYM COMPLEXÉE AU NADPH ET A LA T3

C.1. Principe de la cristallogénèse

La cristallisation d'une protéine est un phénomène thermodynamique et cinétique qui aboutit à la germination et à la croissance de cristaux de protéines. Le principe de la germination repose sur le passage d'un état liquide saturé en protéines à un état solide cristallin, dépendant de la nature physico-chimique du milieu. La croissance cristalline se poursuit par un retour à l'équilibre de la solution.

Les paramètres qui influencent la solubilité d'une protéine sont très nombreux et dépendent de ses propriétés physico-chimiques. Par conséquent, la détermination de ces paramètres s'effectue d'une manière empirique. Pour arriver à un état solide cristallin, les paramètres suivants sont optimisés :

- La pureté et l'homogénéité de la protéine : par la très faible proportion de contaminants (< 5 %) et l'absence de protéolyse qui conduit à une hétérogénéité et/ou à différents états oligomériques de la protéine. Aussi, la protéine doit être correctement repliée.
- Le pH : la répartition des charges à la surface de la protéine est pH-dépendante.
- La nature et la concentration des agents précipitant et additifs. Ils sont classés en trois familles :
 - o Les polymères qui agissent par exclusion de solvant au voisinage de la protéine (le polyéthylène glycol (PEG) est le plus utilisé)
 - o Les sels non chaotropiques (non dénaturant pour les protéines) qui modifient la force ionique et augmentent les interactions hydrophobes en excluant le solvant, par exemple le sulfate d'ammonium, les acétates ou les chlorures.
 - o Les solvants organiques qui diminuent la constante diélectrique du milieu.
- La température.

C.2. Techniques de cristallogénèse utilisées

Les essais de criblage ont été effectués, au robot (IBS), avec les plaques 96 puits (Greiner[®], trois gouttes assises par puits) ou avec les plaques low profil 96 puits (Greiner[®], une goutte assise par puits). Pour les essais à la main, les plaques Hampton[®] 24 puits ont été utilisées, par la technique de goutte suspendue sur une lamelle de verre siliconée et vissée sur le réservoir en plastique. Ces deux techniques reposent sur la même méthode de diffusion de vapeur et diffèrent uniquement par la position de la goutte qui est soit suspendue, soit assise.

La méthode de diffusion de vapeur est la méthode qui a été utilisée pour réaliser tous les essais de cristallogénèse. Elle est particulièrement adaptée aux essais réalisés sur de petits volumes (des volumes de 0.5 µl à 2 µl de solutions de protéines par goutte). Le principe

repose sur la dilution d'un microlitre de protéine avec une solution de cristallisation contenant un agent précipitant d'une concentration C_1 . Cette goutte (suspendue ou assise) est placée dans une enceinte fermée avec une solution réservoir contenant uniquement la solution de cristallisation, d'une concentration C_2 , supérieure à C_1 . Cette différence de concentration, entre la goutte et le réservoir, va progressivement disparaître grâce à des échanges par diffusion de vapeur ; et comme le volume du réservoir est très supérieur à celui de la goutte, cette dernière va voir son volume diminuer et sa concentration en agent précipitant augmenter jusqu'à s'approcher de la concentration C_2 . Cet équilibre aboutira à la sursaturation de la protéine qui formera un précipité amorphe ou cristallin (Figure 42).

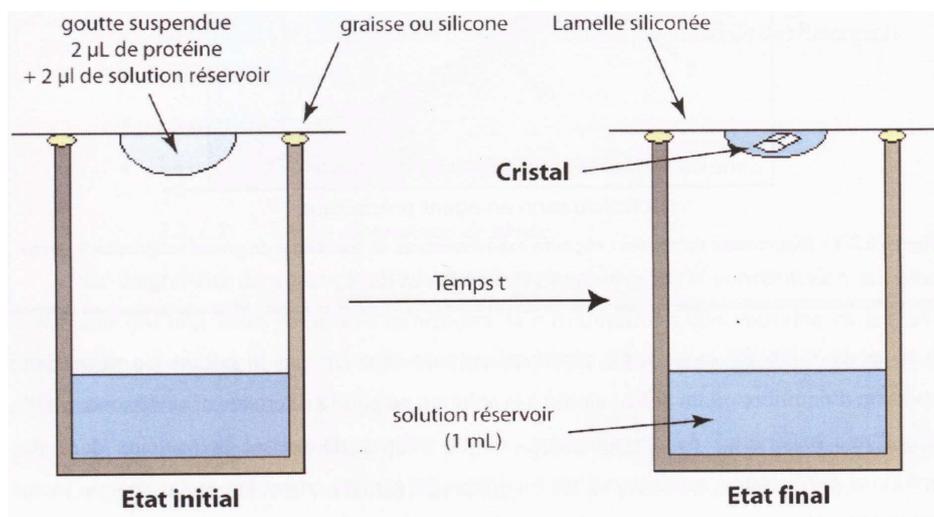


Figure 42 : Schéma du principe de la diffusion de vapeur en goutte suspendue.

C.3. Co-cristallisation de mCRYM en présence de T3 et de NADPH

C.3.1. Premiers essais de cristallisation

Avant ces essais de co-cristallisations, des tests de trempages des cristaux du complexe mCRYM/NADPH dans une solution de T3 à 2mM ont été effectués. Ces tests de trempage n'ont pas abouti à la forme ternaire mCRYM/T3/NADPH. Par conséquent, les premiers essais de co-cristallisations ont été effectués en testant, à la main, les deux conditions qui ont été favorables à la cristallisation de mCRYM apo et mCRYM/NADP(H), (condition 1 : 50 % PEG3350, 200 mM Sulfate d'ammonium et 200 mM Bis-Tris pH5,5; condition 2 : 50% PEG3350, 200 mM de phosphate de potassium pH 4,7 (KH_2PO_4) et 280 mM de thiocyanate de sodium (NaSCN)).

La protéine mCRYM (concentration initiale de 0,5 mM, concentration finale dans la goutte 0,2 mM), purifiée en présence de T3 et de NADPH, est incubée (environ 30 minutes, dans la glace) en présence de T3 (à 10 mM pour une concentration finale de 2 mM) et de NADPH (100 mM pour une concentration finale de 2mM) avant d'effectuer les gouttes (mix de la solution de protéine mCRYM/T3/NADPH et la solution de cristallisation dans un rapport 1 :1). Seule la condition de cristallisation contenant du PEG 3350, du KH_2PO_4 et du NaSCN a permis l'obtention de cristaux.

Les cristaux de mCRYM/T3/NADP(H) correspondent à des polycristaux contrairement aux monocristaux obtenus pour mCRYM apo et CRYM/NADP(H). Il s'agit d'une forme cristalline composée de plusieurs monocristaux qui ont poussé dans différentes directions à partir d'un point unique de nucléation (Figure 43). Cette croissance cristalline est sûrement due à la présence de la T3. Les précipités de T3 pourraient constituer les germes à partir desquels se fait la croissance cristalline et par conséquent engendrer une croissance polycristalline (Figure 43). Ces polycristaux ne sont pas exploitables aux rayons X.

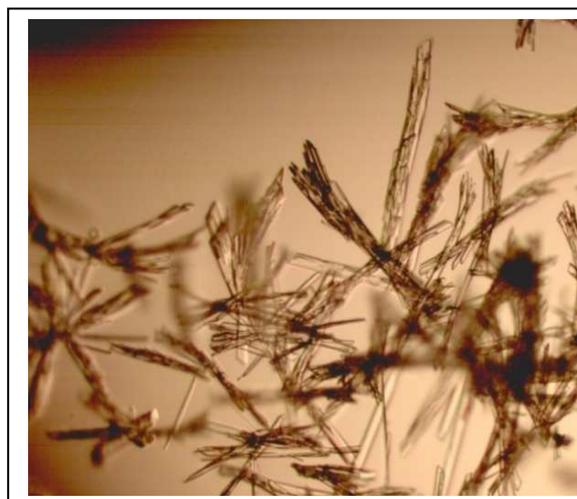


Figure 43 : Photo de cristaux de mCRYM (concentration finale 0,2 mM) en présence de NADPH (2 mM) et de T3 (2 mM). Condition : 320 mM thiocyanate de sodium, 18 % PEG 3350, 200 mM KH_2PO_4

C.3.2. Résolution du problème de solubilité de la T3

Par sa nature hydrophobe due à la présence de deux cycles aromatique, la dissolution de la T3 dans une solution aqueuse aboutit à une précipitation de la molécule. La détermination de la solution permettant la dissolution de la T3 a été très fastidieuse car aucune

information n'était disponible dans la littérature sur la façon dont la molécule doit être dissoute.

Par conséquent, j'ai contacté différentes personnes ayant travaillé sur la molécule T3 pour l'obtention de cette information. Après différents contacts, j'ai pu obtenir cette information auprès du Dr. Frédéric Flamant (UMR 5665 CNRS, UA913 INRA, ENS de Lyon). Afin de permettre une complète solubilité de la T3, la molécule de T3 en poudre (SIGMA-ALDRICH®) doit être dissoute dans de la soude (NaOH) à 100 mM, à une concentration mère de 10^{-2} M pour permettre par la suite sa dilution dans une solution aqueuse. La soude permet une déprotonation des fonctions hydroxyle et carboxylique afin d'augmenter la solvation de la molécule T3.

D. OPTIMISATION DES ETAPES DE CRISTALLISATION ET DE CRYOPROTECTION DU COMPLEXE mCRYM/T3/NADPH

D.1. Ensemencement des germes de cristaux de mCRYM/NADPH/T3

La technique d'ensemencement a été testée afin d'améliorer la qualité des cristaux. Elle consiste à introduire des germes cristallins dans une goutte de cristallisation avec une condition moins saturante que la précédente. A partir des polycristaux obtenus, deux méthodes d'ensemencement ont été utilisées dont le principe est identique. L'une en diluant successivement un broyat de ces polycristaux dans de nouvelles conditions moins saturantes. La deuxième consiste à déposer des germes cristallins dans la goutte de cristallisation par l'intermédiaire d'un poil de chien dans les mêmes conditions que la précédente méthode. Des monocristaux ont poussé avec l'ensemencement à l'aide d'un poil de chien. L'ensemencement par dilutions successives de broyat n'a pas amélioré la qualité des cristaux.

Après plusieurs ajustements de la concentration en PEG3350 et avec les mêmes concentrations de protéine mCRYM, de T3 et de NADPH que le test de co-cristallisation initial, j'ai pu obtenir des monocristaux exploitables aux rayons X (Figure 44).

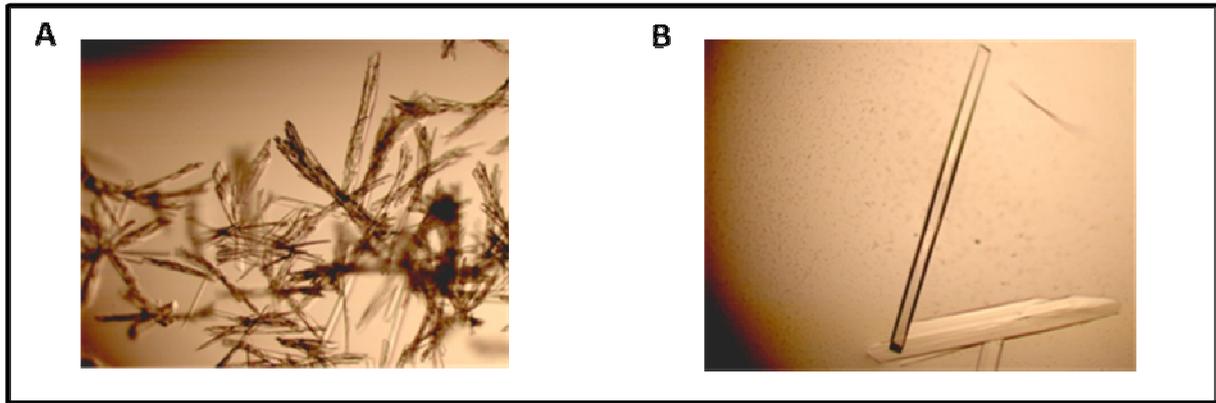


Figure 44 (A) Photo des polycristaux de CRYM utilisés pour les germes. Condition de cristallogenèse : 320 mM thiocyanate de sodium, 18 % PEG 3350, 200 mM KH_2PO_4 . (B) Ensemencement à partir des cristaux (A) avec un poil de chien. 280 mM NaSCN, 11 % PEG 3350 et 200 mM KH_2PO_4 .

D.2. Cryoprotection et tests de diffraction

Afin d'éviter la formation de glace qui détériore le cristal et dont la diffraction interfère avec celle de l'échantillon, les cristaux sont trempés dans une solution mère (solution dans laquelle ont poussé les cristaux, récupérée dans le réservoir de la goutte) additionnée d'un cryoprotectant. Pour les premiers tests de diffraction aux rayons X, les cristaux ont été congelés dans différentes conditions de cryoprotectant, soit un seul trempage avec du glycérol ou de l'éthylène glycol (un seul trempage à 15 ou 25 %), soit des trempages successifs à 15 puis 25 % de cryoprotectant. Les durées de trempage testées varient entre 30 secondes et une minute.

La cryoprotection à 15% de glycérol ou d'éthylène glycol n'était pas suffisante pour empêcher la formation de glace. Les cristaux qui ont subi deux trempages successifs, à 15 et 25% d'éthylène glycol ont diffracté à une meilleure résolution (autour de 2,5 Å) que les autres. Cependant, de nombreux cristaux ne diffractaient pas, notamment ceux qui ont subi une durée de trempage d'une minute. Ces différents résultats et essais de cryoprotection ont mis en évidence la fragilité des cristaux de mCRYM/T3/NADP(H). Par conséquent, des temps beaucoup plus courts ont été testés afin de limiter au mieux la détérioration de la qualité de diffraction des cristaux tout en optimisant la cryoprotection.

E. RESOLUTION DE LA STRUCTURE DE mCRYM/T3/NADPH

E.1. L'enregistrement et le traitement des données de diffraction

La propriété des rayons X (longueur d'onde de l'ordre de l'Angström, Å) permet de visualiser l'arrangement atomique d'une molécule. Les rayons X interagissent avec les électrons des atomes qui composent une molécule. Les rayons diffusés par la molécule sont enregistrés par un détecteur. Un traitement informatique des données de diffraction, basé sur la transformé de Fourier, génère l'image des nuages d'électrons qui correspondent aux positions des atomes de la molécule. L'utilisation d'un cristal est indispensable pour ses propriétés d'empilement moléculaire régulier et périodique dans les trois dimensions de l'espace. Ces propriétés permettent une diffusion des rayons X dans un nombre de directions limitées, ce qui permet une amplification du signal de diffusion dans des directions dites d'interférences constructives. L'enregistrement de différents clichés de diffraction s'effectue à différentes orientations du cristal au niveau du faisceau de rayons X.

La première étape de traitement des clichés de diffraction s'est effectuée avec le programme XDS (Kabsch 1993). Il est composé de huit modules (sous-programmes) qui s'enchaînent automatiquement : XYCORR, INIT, COLSPOT, IDXREF, DEFPIX, XPLAN, INTEGRATE, CORRECT.

Trois principales étapes sont effectuées par ce programme :

- L'indexation : détermination de l'orientation et des paramètres de maille* du cristal (a, b, c, la longueur des trois vecteurs directeur de la maille, ainsi qu' α , β , γ , les angles qu'ils forment entre eux). La maille élémentaire d'un cristal est constituée d'un seul motif, c'est-à-dire le nombre minimal d'atomes caractérisant le cristal. L'identification du groupe d'espace, à partir des paramètres de maille, s'effectue par les différentes possibilités d'indexation proposées par le module IDXREF de XDS. En biologie, il existe 7 systèmes cristallins possibles qui regroupent 64 groupes d'espaces (Figure 45). La détermination de ces paramètres de maille va permettre d'attribuer à chaque réflexion, ses indices hkl (nœud du réseau réciproque) afin de pouvoir intégrer les intensités de chaque réflexion pour chaque cliché.

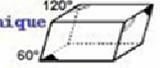
Les 7 systèmes cristallins en biologie		Paramètres de mailles	Exemples de groupes d'espace
Cubique		$a = b = c ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P23, P4 ₁ 32, I432...
Quadratique		$a = b \neq c ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P4, P422, I4 ₁ 22...
Orthorhombique		$a \neq b \neq c ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P222, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ ...
Monoclinique		$a \neq b \neq c ; \alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	P2, P2 ₁ , C2...
Triclinique		$a \neq b \neq c ; \alpha \neq \beta \neq \gamma$	P1
Rhomboédrique		$a = b = c ; \alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	P3, P312, R32...
Hexagonale		$a = b \neq c ; \alpha = \beta = 120^\circ \neq \gamma = 90^\circ$	P6, P6 ₂ , P6 ₃ 22

Figure 45 : Systèmes cristallins et exemples de groupe d'espace possibles en biologie.

- L'intégration des réflexions : en pratique, cette étape se fait automatiquement. Le module « INTEGRATE » établit les profils moyens des taches de diffractions et calcule l'intensité de chaque réflexion par intégration numérique suivant les profils calculés.
- La mise à l'échelle : dans un jeu de données, chaque réflexion est mesurée à plusieurs reprises sur plusieurs clichés (redondance). En théorie, ces intensités devraient être identiques mais en pratique différents paramètres (détérioration du cristal soumis aux rayons X, la fluctuation du flux de rayons X, la forme du cristal) provoquent de petites différences entre les intensités de ces réflexions équivalentes. Le module « XSCALE » moyenne ces intensités et calcule des facteurs de structures.

E.2. La validation des données de diffraction

La qualité d'un jeu de données est déterminée par différents critères statistiques calculés au cours du traitement des données. Les paramètres les plus significatifs sont :

- La résolution : correspond à la distance entre deux atomes donc à la finesse des détails dans l'image de la densité électronique. La limite haute de la résolution des données mesurées est imposée par la configuration de l'expérience (distance entre le détecteur et le cristal, longueur d'onde...) et par la qualité de diffraction du cristal.

Lors de la résolution des données, la dernière tranche de résolution est sélectionnée en fonction de deux critères : le rapport signal sur bruit de l'intensité ($I/\sigma(I) > 2$) et le facteur de structure R_{sym} ($30 \% < R_{sym} < 45 \%$).

- Le rapport signal sur bruit ($I/\sigma(I)$) : il permet d'avoir une estimation de l'intensité moyenne des réflexions mesurées en fonction de la résolution (avec I : l'intensité des réflexions, et $\sigma(I)$, le bruit de fond des intensités des réflexions).
- La complétude : elle donne le pourcentage de réflexions mesurées par rapport au nombre total de taches mesurables, à une résolution donnée. Elle doit être supérieure à 90 %.
- La redondance : elle établit le nombre moyen de fois qu'une réflexion et ses symétriques sont mesurés. Plus la valeur de la redondance est grande, meilleure sera l'estimation de l'intensité moyenne d'une réflexion unique.
- Le facteur R_{sym} permet de comparer l'intensité de chaque réflexion équivalente. Plus ce facteur est bas, meilleure est la cohérence du jeu de données.
- Le facteur de mosaïcité du cristal : il correspond à la qualité de l'empilement cristallin. En effet, les cristaux de protéine présentent souvent des défauts dont les origines sont multiples :
 - Lors de la croissance cristalline, du fait du nombre limité de contacts assurant la cohésion cristalline, des perturbations mécaniques ou thermiques peuvent engendrer des défauts dans l'empilement cristallin ;
 - La congélation, si elle est mal maîtrisée, peut également faire augmenter la mosaïcité.

Ce facteur peut varier entre $0,2-1,5^\circ$ et plus. Une forte mosaïcité risque d'entraîner des problèmes de superposition de réflexions, ou de causer des difficultés lors de la mesure des réflexions de faibles intensités.

E.3. Détermination de la phase par remplacement moléculaire

Afin de calculer la densité électronique d'une protéine, les intensités de réflexions ne sont pas suffisantes. Il est nécessaire de déterminer la différence de phase qu'il existe entre les différents rayons diffractés par le cristal. La technique de remplacement moléculaire est l'une des alternatives pour déterminer la phase. Elle est possible s'il existe une protéine homologue (> 30%) et qui est répertoriée dans la base de données PDB (Protein Data Bank). Cette base de données regroupe les structures cristallographiques déjà résolues.

La méthode de remplacement moléculaire consiste à calculer la transformé de Fourier des intensités diffractées (par la fonction de Patterson) pour le modèle cristallographique et pour la structure recherchée. Cela consiste à déterminer les six paramètres de la transformation géométrique (trois pour la rotation et trois pour la translation) qui nous permettent de passer du modèle à notre protéine. Le positionnement du modèle dans la maille cible est découpé en deux étapes : l'étape de rotation (α , β et γ) pour déterminer l'orientation du modèle et l'étape de translation (x, y et z) pour déterminer la position du modèle dans la maille.

L'obtention des premières cartes de densité électronique, calculées à partir des facteurs de structures observés (nommés F_o , issus des clichés de diffraction) et calculés (nommés F_c , issus du modèle de la PDB), s'est effectué avec un des programmes de CCP4, MolRep. Pour les deux premières structures de CRYM : mCRYM apo et mCRYM/NADP(H), (résolue par le Dr. Franck BOREL), le modèle de la protéine AfALDH, comportant 44 % d'homologie avec mCRYM, a été utilisé. Pour la résolution de la structure de mCRYM/T3/NADP(H), la structure de mCRYM apo a été utilisée comme modèle.

E.4. L'affinement et la reconstruction du modèle

Lorsqu'on calcule des cartes de densité électronique à partir d'un modèle affiné, ce dernier peut biaiser les phases à cause de son inexactitude. Pour rendre compte de ces erreurs, deux cartes de densité électronique sont calculées : la $2F_o-F_c$ et la F_o-F_c (appelées cartes de différences). Elles prennent en compte les erreurs apportées par l'incomplétude du modèle et l'inexactitude des positions des atomes, et permettent d'améliorer la qualité finale des cartes de différences.

La densité électronique $2F_o-F_c$ (généralement représentée en bleue sur le logiciel de reconstruction COOT) correspond aux régions correctement placées. La F_o-F_c met en évidence les erreurs du modèle : les pics positifs (représentés en vert) correspondent à des zones où il manque des électrons ; et les pics négatifs (représentés en rouge) représentent les zones où le modèle présente un excès d'électrons. Afin d'améliorer ces cartes de différences, une reconstruction manuelle du modèle (effectuée sur COOT) est nécessaire (par substitution des acides aminés qui diffèrent entre le modèle et la structures observés, les orientations des chaînes latérales...) puis cette reconstruction est compensée par l'affinement numérique des paramètres du nouveau modèle construit (par le module « refmac »). Plusieurs cycles de reconstruction et d'affinement sont nécessaires pour arriver à un facteur de structure calculé proche de celui observé. Dans le cas de mCRYM/T3/NADP(H), la reconstruction du modèle n'a pas été nécessaire du fait de l'homologie de 100% avec le modèle de départ (mCRYM apo).

Après de nombreux essais, l'optimisation de la cryoprotection a abouti à une collecte à une excellente résolution, de 1.53 Å, obtenue au Synchrotron sur la ligne ID14eh4 (ESRF, Figure 46). Le traitement des données a été effectué avec les programmes suivants : XDS pour la détermination des paramètres de maille et du groupe d'espace, les programmes de CCP4 (Molrep pour le remplacement moléculaire, Refmac5 pour l'affinement, ARP/WARP pour le placement des molécules d'eau, ProCheck pour vérifier la structure), COOT pour la visualisation et la construction de la structure et Pymol pour la représentation de la structure.

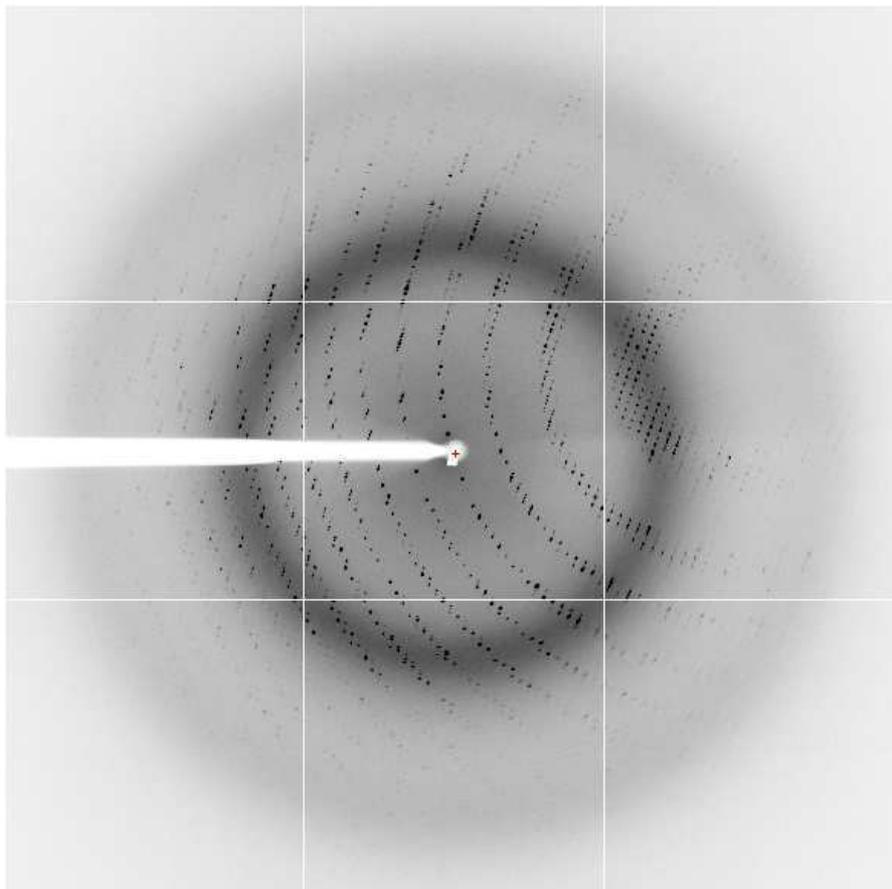


Figure 46 : Cliché de diffraction du cristal de mCRYM/T3/NADP(H). Ligne de lumière ID14eh4 (ESRF). Ce cliché met en évidence des taches d'intensité très diffuses. Résolution 1,53 Å.

E.5.Problème d'affinement des données de diffraction de mCRYM/T3/NADP(H)

Après le traitement des données avec le programme XDS, le groupe d'espace P1 donne les meilleures données pour les intensités de réflexion et les facteurs de structures (Tableau 6)

Data collection ID14eh4 ESRF	
Data reduction	
Space group	P1
Cell dimension (Å)	a = 45.22, b = 75.86, c = 95.35 $\alpha = 91.8, \beta = 89.6, \gamma = 104.9$
Resolution range (Å)	45-1.53 (1.62-1.53)
Completeness (%)	91.1 (90.8)
Redundancy	1.97 (1.96)
I/sigma	10.6 (2.83)
R _{sym} (%)	4.3 (28.3)
Refinement	
Reflections in working set	159900
Reflection in test set	7997
R _{factor} /R _{free}	0.235/0.316

Tableau 8 : Données cristallographiques de la structure de mCRYM/T3/NADP(H) avec le groupe d'espace P1.

Cependant, l'affinement (Refmac5, CCP4) n'a pas pu converger vers des statistiques acceptables. Pour une résolution de 1.53 Å, l'affinement permet d'arriver à seulement 31,6 % de R_{free}. De plus, seule la densité électronique attribuée à l'hormone T3 n'est pas bien définie. En effet, une partie de la densité est visible notamment les iodés. Le blocage de l'affinement et l'absence de densité électronique attribuée à la T3 pourraient s'expliquer par un problème lors de la cryoprotection qui aurait pu modifier l'empilement cristallin et par conséquent expulsée une partie des molécules de T3 fixées. Afin de vérifier cette hypothèse, le traitement de données a été continué avec d'autres programmes et en parallèle, de nouveaux cristaux ont été préparés afin d'optimiser l'étape de cryoprotection.

E.6. Optimisation de la cryoprotection

Suite à ce problème, deux principales stratégies ont été testées pour l'affinement des données : l'utilisation du programme CNS (Crystallography & NMR System), (Brunger et al., 1998) pour effectuer une composite omit map et une construction automatique par ARP/WARP. Ces deux programmes d'affinement ont pour but de vérifier la concordance entre les facteurs de structures expérimentaux et ceux calculés à partir du modèle en donnant plus de poids aux données expérimentales. La composite omit map a fait apparaître

de nombreuses doubles conformations qui pourraient être dues à un mauvais empilement cristallin.

Cependant, ces traitements n'ont pas permis d'améliorer l'affinement, à l'origine probablement d'un problème avec le groupe d'espace attribué aux données. En effet, le groupe d'espace P1 est le système cristallin le plus primitif, avec un seul axe de symétrie, une symétrie qui est applicable pour tout cristal. Il s'agit du seul groupe d'espace qui a été attribué et comportant des paramètres de mailles très proche du groupe d'espace $P2_1$ (Tableau 8). De plus, les données présentent un facteur de mosaïcité du cristal important ($1,6^\circ$), ce qui suggérerait une détérioration de l'empilement cristallin. L'étape de cryoprotection constituait dans ce cas l'étape qui pouvait être la cause de notre problème. L'hypothèse émise est que cette étape de cryoprotection où le cristal subit de nombreux traumatismes, le trempage dans le cryoprotectant, et le refroidissement plus ou moins rapide du cristal dans l'azote liquide pouvait être responsable des changements importants dans l'empilement cristallin. Ce qui expliquerait le problème lors du traitement des données notamment lors de l'indexation pour déterminer le groupe d'espace. Par conséquent, différents essais de cryoprotection ont été testés, avec des trempages successifs (5, 10, 15% de glycérol) dans du glycérol avec un temps très court, en trempant et récupérant le cristal immédiatement, ont permis d'améliorer la qualité de diffraction des cristaux.

E.7. Résolution de la structure du complexe mCRYM/T3/NADP(H)

Les premiers clichés de diffraction (Figure 47) montrent une amélioration dans la forme des taches de diffraction. Elles paraissent moins étaler, révélant une diminution de la mosaïcité ($0,3^\circ$). L'enregistrement de ces nouvelles données a été effectué sur la ligne ESRF ID14eh2 (Tableau 9). L'obtention de ces données, à une résolution de $1,75 \text{ \AA}$, avec le groupe d'espace $P2_1$ et des paramètres de maille, proche du groupe d'espace P1, confirme l'hypothèse d'une détérioration de l'empilement cristallin lors de la cryoprotection. L'affinement des données a mis en évidence la présence de la T3 et du NADPH dans la structure de mCRYM.

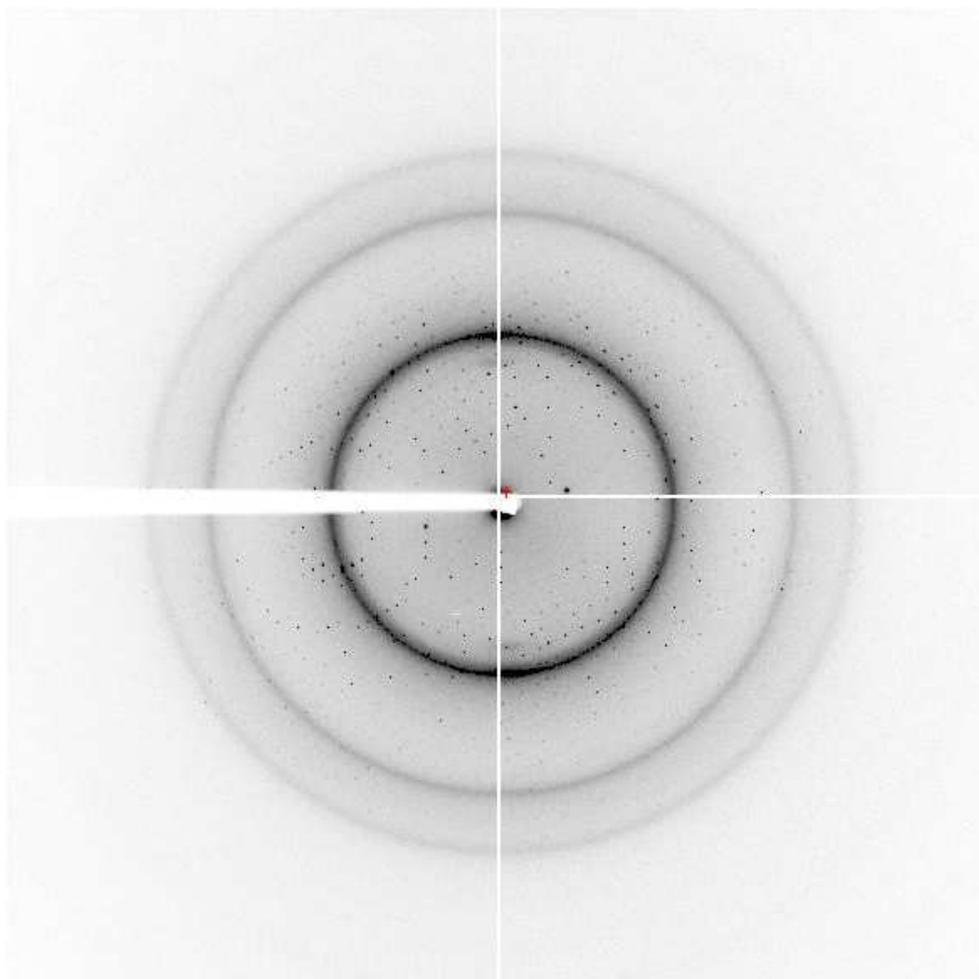


Figure 47 : Cliché de diffraction du cristal de mCRYM/T3/NADP(H). Ligne de lumière ID14eh2 (ESRF). Résolution 1,75 Å.

Données cristallographiques ID14eh2 ESRF	Complexe mCRYM/T3/NADP(H)
Données de diffraction	
Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille (Å)	a = 45,3, b = 97,2, c = 75,7 α = 90,0, β = 104,9, γ = 90,0
Résolution (Å)	43-1,75 (1,85-1,75)
Complétude (%)	99,5 (98,7)
Redondance	3,76 (3,74)
I/σ(I)	14,28 (3,69)
R _{sym} (%)	6,8 (39,9)
Remplacement moléculaire	
Modèle	mCRYMapo
R facteur initial (%)	46,1
Contraste	1,3
Nombre molécule par unité asymétrique	2
Refinement	
r.m.s.d bonds (Å)	0,025
r.m.s.d angles (deg.)	1,948
B facteur moyen (Å ²)	13,25
R _{factor} /R _{free}	0,150/0,204
Nombre d'atomes	5283
Nombre de résidus	1156
Nombre de molécules d'eau	543
Nombre de molécules de T3	2
Nombre de molécules de NADPH	2
Nombre d'ions	2
Coefficient de corrélation	0,96
Résidus en double conformation	2 (résidus Ser21 et Ser104)
Nombre de cycle d'affinement	~60
Premier cycle d'affinement	corps rigide
Diagramme de Ramachandran	
Nombre de résidus dans les zones favorables	567 (97,1%)
Nombre de résidus dans les zones tolérées	17 (2,9%)
Nombre de résidus dans les zones non admises	0

Tableau 9 : Données cristallographiques de mCRYM/T3/NADP(H) avec le groupe d'espace P2₁

F. Caractérisation thermodynamique de la T3

F.1. Présentation et principe de l'ITC

L'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) permet de mesurer les paramètres suivants : la constante d'association (K_a), la stœchiométrie (N), les variations d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS), d'une interaction entre deux molécules biologiques de nature protéique, telle que l'interaction ligand/substrat, et nucléotidique, par exemple l'interaction protéine/ADN. Ces paramètres sont déterminés à partir de la mesure de la quantité de chaleur absorbée (réaction endothermique) ou dégagée (réaction exothermique). Cette mesure se fait en solution et ne nécessite pas de greffer un marqueur ni l'immobilisation d'une des molécules.

Les expériences d'ITC avec la protéine CRYM ont été effectuées à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) en collaboration avec le Dr. Andres Palencia, chercheur contractuel dans le groupe de Dr. Stephen Cusack. L'objectif de cette caractérisation thermodynamique, est de déterminer l'affinité de la T3 pour mCRYM et l'influence de la fixation des cofacteurs NADPH/NADP⁺ sur cette affinité. Mais aussi, de corrélérer ces résultats avec les structures de mCRYM résolues et avec les informations disponibles dans la littérature pour les autres CTBPs. La caractérisation thermodynamique de la fixation de la T3 et des cofacteurs sur mCRYM a pour but de vérifier si les propriétés de fixation de la T3 sont comparables à celles des CTBPs précédemment caractérisées.

F.2. Déroulement de l'expérience

L'appareil d'ITC (VP-ITC, Microcal Inc) est composé d'une seringue de 300 μ l et d'une cellule de 1.4 ml (Figure 48).

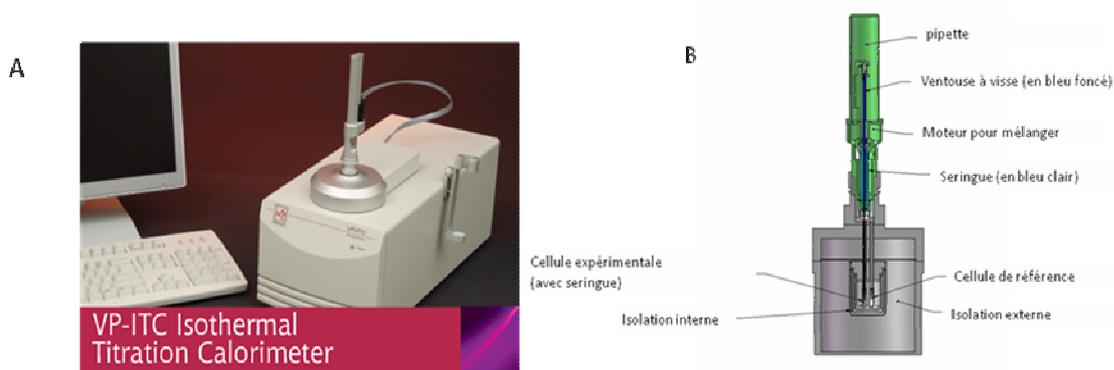


Figure 48. (A) Photo de l'appareil d'ITC utilisé. (B) schéma du dispositif portant la seringue (partie extérieure en vert) qui est plongée dans la cellule de référence (en gris). Photos tirés du manuel d'utilisation de l'ITC.

Les expériences ont consisté à étudier l'interaction du ligand, la molécule de T3 et les cofacteurs NADPH/NADP⁺ pour la protéine mCRYM (T3/mCRYM seule ou saturée avec du NADPH ou du NADP⁺, NADPH/mCRYM, NADP⁺/mCRYM). La molécule de T3 ou de NADP(H) à caractériser est introduite dans la seringue et la protéine mCRYM dans la cellule. Une expérience d'ITC consiste à 30 injections de T3 ou NADP(H) d'un volume de 7.5 μ l dans la cellule contenant 1.4 ml de CRYM. Le temps nécessaire pour une expérience est d'environ 4h. L'intervalle entre chaque injection correspond au temps nécessaire pour revenir à la ligne de base avant l'injection qui suit. La ligne de base est obtenue au début de l'expérience par une période d'équilibration.

Pour toutes les expériences effectuées sur la protéine mCRYM, la réaction est exothermique ($\Delta H < 0$). Chaque injection entraîne un dégagement de chaleur qui est proportionnel à la quantité de T3 ou NADP(H) qui s'est fixée à la protéine. Les résultats sont représentés sous la forme d'un graphique avec en abscisse le temps et en ordonnée la quantité de puissance nécessaire (μ cal/sec) pour maintenir constante la température entre la cellule expérimentale, où se trouve la protéine mCRYM, et la cellule de référence qui contient de l'eau (principe de compensation de chaleur entre les deux cellules). La quantité de puissance (μ cal/sec) est obtenue par le calcul de l'aire de chaque pic de chaleur (Figure 49). Pour une réaction exothermique comme celle de mCRYM en présence de T3 ou NADP(H), ceci se traduit par à une valeur en μ cal/sec < 0 . En principe, une réaction exothermique devrait aboutir à une valeur en μ cal/sec positive. Cependant, cette valeur obtenue par ITC correspond à la différence de μ cal/sec entre la cellule de référence et la cellule

expérimentale. Lorsqu'il se produit un dégagement de chaleur dans la cellule expérimentale, la quantité de puissance de cette cellule est supérieure à celle de la cellule de référence. La différence entre ces deux valeurs aboutit à une valeur en $\mu\text{cal}/\text{sec} < 0$.

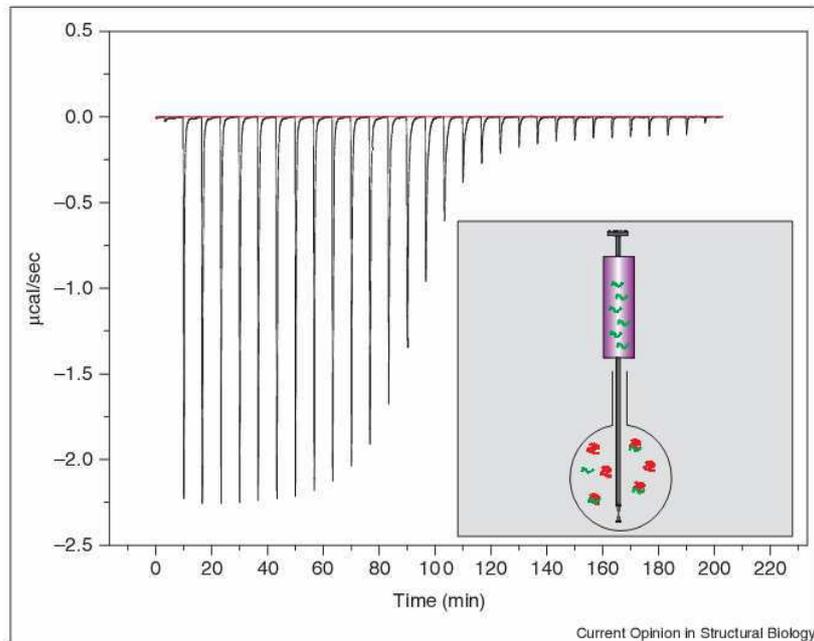


Figure 49 : Représentation d'une expérience d'ITC pour une réaction exothermique et schéma de la seringue (contenant le ligand, indiqué en vert) et de la cellule (contenant la protéine, indiquée en rouge). D'après Leavitt et al., 2001.

Au fur et à mesure des injections, la quantité de protéine mCRYM libre diminue progressivement, ce qui se traduit par une diminution de la taille des pics de chaleur jusqu'à arriver à la valeur de base, qui traduit une saturation de tous les sites de fixations des protéines mCRYM.

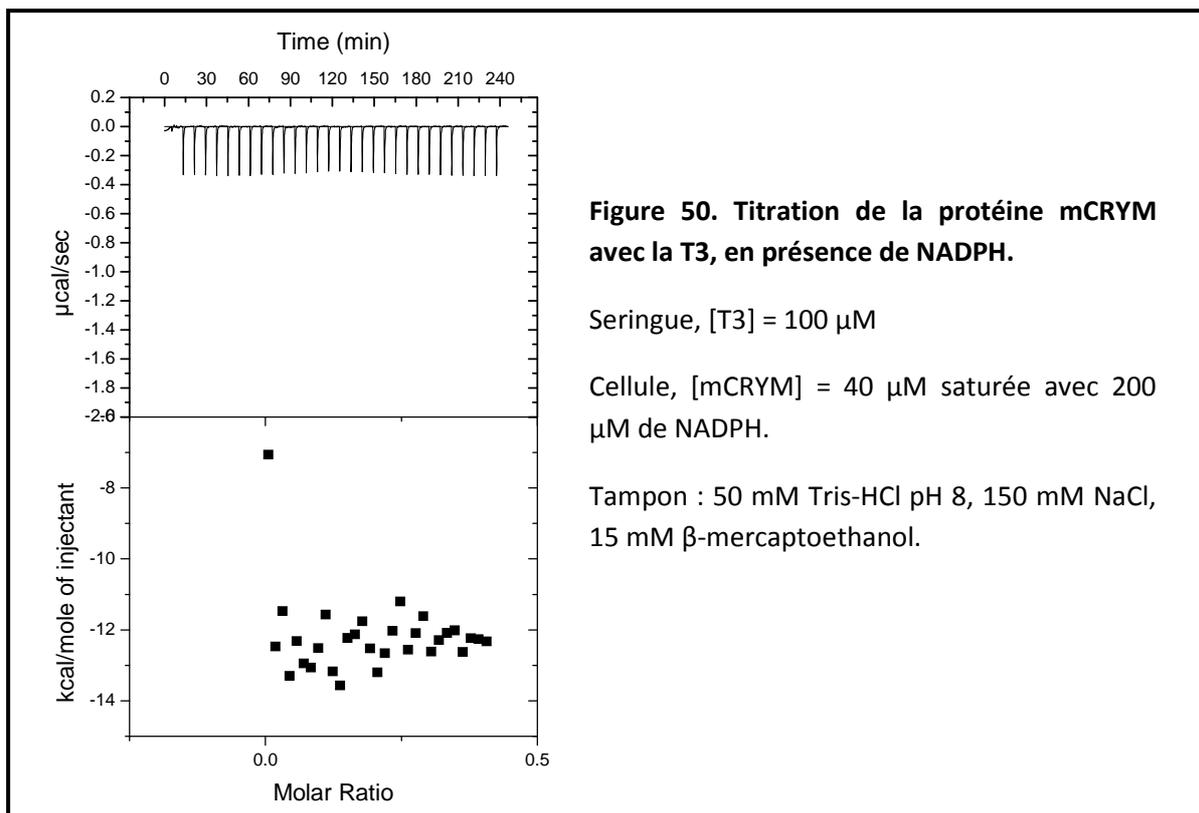
L'expérience d'ITC en présence de protéine et de ligand est appelée une expérience de « titration de la protéine avec le ligand », par exemple lorsque la molécule de T3 est contenue dans la seringue et la protéine mCRYM dans la cellule. Pour chaque expérience de titration de mCRYM avec la T3, il est nécessaire d'effectuer une « expérience de dilution du ligand », dans les mêmes conditions expérimentales que la condition de titration c'est-à-dire, en présence de T3 dans la seringue et par contre, la cellule ne contenant que du tampon, sans la protéine mCRYM. Cette expérience de dilution de ligand mesure le dégagement de chaleur dû à la dilution du ligand dans le tampon contenu dans la cellule expérimentale. La variation de la quantité de puissance ($\mu\text{cal}/\text{sec}$) qui se traduit par des pics de chaleur sera

soustraite de celle obtenue avec l'expérience de titration de la protéine avec le ligand. En effet, cette variation (correspondant au bruit), quand elle est importante, ne permet pas une analyse précise des résultats. Il est donc important d'avoir exactement le même tampon pour notre protéine et notre ligand afin de réduire le dégagement de chaleur induit par la dilution du ligand, pré-requis pour avoir une expérience d'ITC exploitable. Les premières expériences d'ITC ont été effectuées avec le NADPH et NADP⁺, en absence de T3. Le tampon utilisé pour ces premiers essais contenait 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl et 15 mM de β -Mercaptoethanol. Ces conditions expérimentales ont permis d'obtenir les premières constantes d'affinité des cofacteurs pour mCRYM.

F.3. Résolution du problème de solubilité de la T3

La caractérisation thermodynamique de la fixation de la T3 a été effectuée dans les conditions précédemment décrites pour les cofacteurs. Les premières expériences ont été effectuées avec la protéine seule et préalablement saturée avec du NADPH. Ces conditions de tampon (50 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl et 15 mM de β -Mercaptoethanol) n'ont pas été favorables à une solubilité optimale de la molécule T3 (limite de solubilité < 100 μ M). Aucune fixation de T3 n'est observée dans cette condition expérimentale (Figure 50).

Cette absence de fixation de la T3 (en absence ou en présence de NADPH) est due à une instabilité de la T3 dans cette condition de tampon. De légers précipités sont effectivement observés dans la solution de T3. Par conséquent, une autre condition, plus favorable à sa solubilité, a été recherchée.



La limite de solubilité de la T3 a pu être portée à une concentration de 700 μ M en modifiant la composition du tampon (composition initiale : 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl et 15 mM β -Mercaptoethanol). Ces essais ont mis en évidence deux paramètres dans la composition du tampon, les sels et le pH, qui ont une influence sur la solubilité de la T3. La présence de sels à 150 mM et d'un pH inférieur à 8.7 ne favorisent pas la solubilité de la T3 au-delà de 100 μ M. Par conséquent, les sels ont été supprimés et le pH du tampon a été ajusté à 8.7 dans la nouvelle condition de tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.7, et 10 mM β -Mercaptoethanol). Une agrégation de la protéine a été observée dans cette condition (ainsi que dans la précédente condition de tampon). Afin de limiter cette agrégation de la protéine, du glycérol a été ajouté dans la condition de tampon, à hauteur de 10%. Cette nouvelle condition de tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.7, et 10 mM β -Mercaptoethanol et 10% de glycérol) est optimale pour la solubilité de la T3 et de la protéine mCRYM. Les expériences avec les cofacteurs NADPH et NADP⁺ ont été testées avec le nouveau tampon pour vérifier si la composition du tampon a également une influence sur la constante d'affinité des cofacteurs. Toutes les expériences d'ITC qui ont suivi ont été effectuées dans cette même condition de tampon et à une même température de 25°C.

L'analyse des données d'ITC s'est effectuée en utilisant le modèle de fixation d'une classe de site, sans coopérativité possible entre les deux sites de NADP(H) ou de T3 du dimère physiologique de mCRYM. Ce choix a été déduit des observations structurales qui ne suggèrent pas de coopérativité entre les deux sites de fixation du NADPH ou de la T3 du dimère de mCRYM.

La détermination de la concentration de la protéine mCRYM a été estimée en mesurant la DO à 280 nm et le calcul de la concentration s'est effectué à partir de la détermination du coefficient d'extinction expérimental ($\epsilon = 48802 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) de la protéine mCRYM dans les conditions de tampon expérimentales de l'ITC. Cette analyse a été effectuée par Jean-Pierre Andrieu (Responsable du Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM), IBS), par l'analyse quantitative des acides aminés de mCRYM (Spackman et al., 1958). La concentration de NADPH et de NADP⁺ a été déterminée par la mesure de leur absorbance respective, à 340 et 260 nm et par l'utilisation de leur coefficient d'extinction respectif à ces longueurs d'onde ($\epsilon_{\text{NADPH}(340\text{nm})} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{NADP}^+(260\text{nm})} = 15000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Enfin, pour la T3, par l'absence de coefficient d'extinction théorique, la concentration de T3 a été estimée à partir de la masse pesée lors de sa préparation. Cependant, la molécule de T3 absorbe à 290 nm, cette absorbance a été exploitée pour vérifier la reproductibilité de la pesée.

CHAPITRE 3

Etude structurale du complexe mCRYM/T3/NADP(H)

A. RESULTATS ET DISCUSSION

A.1. Présentation générale de la structure

La structure cristallographique de mCRYM, autant sous forme apo (mCRYM apo) que complexée avec le NADP(H) (mCRYM/NADP(H)) ou avec la T3 et le NADP(H) (mCRYM/T3/NADP(H)), est un homodimère. Cette forme cristallographique correspond à la forme physiologique de la protéine (Figure 51).

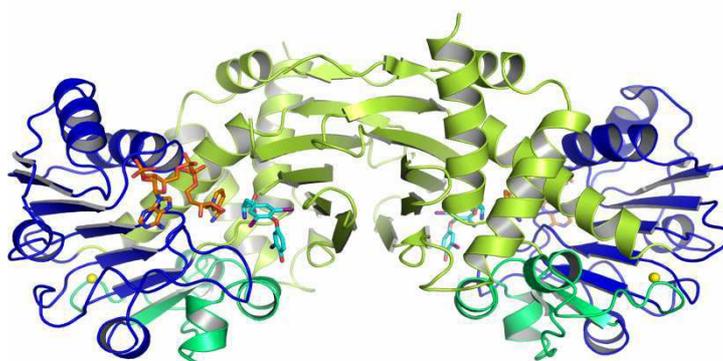


Figure 51 : Dimère cristallographique et physiologique de mCRYM/T3/NADP(H). La molécule de T3 est représentée en cyan, la molécule de NADP(H) en orange et l'ion potassium par une sphère jaune.

A.1.1. La molécule de T3 et la particularité des atomes d'iode

Cette nouvelle structure de mCRYM/T3/NADP(H) possède une molécule de T3 et de NADP(H) par monomère avec un taux d'occupation respectif de 0,75 (Facteur B moyen de la T3 de 14 Å², proche des résidus de mCRYM à proximité de la T3) et de 1. La carte de densité omit confirme bien la présence de T3 dans la structure (Figure 52.A).

La carte de différence 2Fo-Fc (Figure 52.B), ainsi que la carte omit de la molécule de T3, présentent toutes les deux une particularité au niveau des trois atomes d'iode. La densité électronique, au niveau de la liaison entre les atomes d'iodes et les carbones des cycles aromatiques de la T3, forme une sphère au niveau des atomes d'iodes. L'atome d'iode fait

parti de la famille des halogènes et comporte 53 électrons. Ce numéro atomique lui confère les mêmes propriétés que les atomes lourds utilisés en cristallographie pour l'obtention du signal anomal. Cette propriété de l'iode a été exploitée pour essayer de résoudre le phasage de la précédente structure de mCRYM/T3/NADP(H) (avec le groupe d'espace P1) mais le signal anomal n'était pas suffisant avec trois atomes d'iodes par monomère pour envisager cette stratégie. La nature chimique de l'iode pourrait cependant être à l'origine de la représentation sphérique de la densité électronique, par un effet de troncature de la série de Fourier lors du passage dans l'espace direct. Ce phénomène est observé pour d'autres structures contenant de la T3, comme par exemple celle du récepteur thyroïdien TR β complexé à la T3 (Huang et al., 2010).

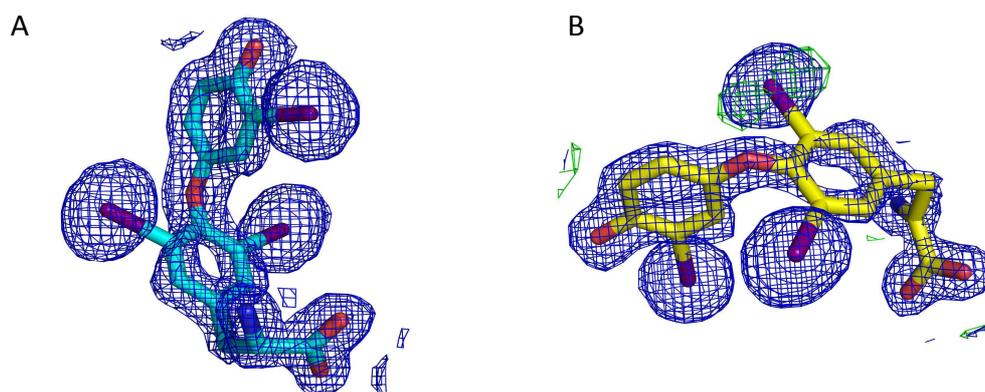


Figure 52 : Représentation de la densité électronique de la molécule T3 (A) carte « omit », 2Fo-Fc à 1 σ (B) carte de différence 2Fo-Fc à 2.5 σ .

A.1.2. Structures secondaires de mCRYM/T3/NADP(H)

La détermination des structures secondaires s'est effectuée à partir de l'algorithme du programme PROCHECK (CCP4). La numérotation des structures reprend celle de la structure de l'enzyme PpOCD (Goodman et al., 2004, PDB 1X7D), dont la séquence primaire comporte environ 30% d'homologie avec celle de mCRYM. La protéine mCRYM présente 47 % de structures secondaires, ce qui représente pour les 53% restant une proportion importante de structures non ordonnées (Figure 53).

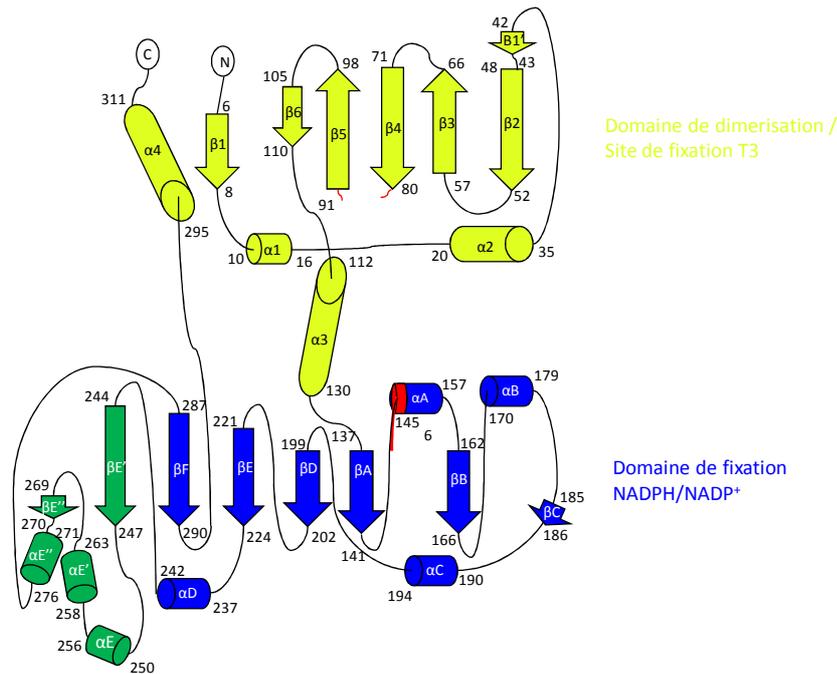


Figure 53 : Diagramme de représentation des structures secondaires de mCRYM/T3/NADP(H). Le domaine de dimérisation et de fixation de la T3 est représenté en jaune citron, avec la boucle entre les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ invisible dont les extrémités sont représentées en rouge. Le domaine de fixation du NADP(H) est représenté en bleu, le domaine entre le brin $\beta E'$ et l'hélice $\alpha E''$, intercalé dans le domaine du NADP(H) est représenté en vert. Ce domaine n'est pas caractéristique du repliement de Rossmann. Le motif consensus de fixation des dinucléotides GxGXXA est localisé au niveau de l'hélice αA , est représenté en rouge.

A.1.3. Structure tertiaire de mCRYM

La structure tertiaire du monomère de mCRYM révèle deux principaux domaines (Figure 53), le domaine de dimérisation et de fixation de la T3 (Figure 55) et le domaine de fixation du NADP(H) (Figure 54). Cette organisation tertiaire est identique aux autres structures de mCRYM (apo et complexée au NADP(H)).

A.1.3.1. Domaine de fixation du NADP(H)

Le domaine de fixation du NADP(H), compris entre les résidus 131 et 194, présente une organisation sensiblement similaire aux domaines NADP(H) connus. De plus, il comporte le motif GxGxxA/G caractéristique de la fixation des dinucléotides et qui est conservé chez toutes les protéines ayant un domaine à NAD(H) et à NADP(H). Ce domaine est constitué d'une alternance de brins β et d'hélices α , connu sous le nom de Rossmann fold. Chez mCRYM, le domaine de Rossmann présente de multiples interruptions par l'ajout ou la

suppression de structures secondaires non caractéristiques de ce domaine et qui donne cette organisation $\beta A\alpha\beta B\alpha\beta\beta C\alpha\beta D\beta E\alpha D\beta E'\alpha E\alpha E'\beta E''\alpha E''\beta F$. Une hélice α est absente entre les brins βD et βE . Un sous-domaine (nommé domaine $\beta E'-\alpha E''$), composé de deux brins β et de trois hélices α (αE , $\alpha E'$ et $\alpha E''$), est intercalé entre l'hélice αD et le brin βF du domaine de Rossmann et de trois hélices α (αE , $\alpha E'$ et $\alpha E''$). Ce domaine se trouve éloigné du site de fixation du NADPH. Cette organisation Rossmann fold like pourrait constituer la spécificité de la famille des μ Crystallines/OCDs/*AfAlaDH* puisqu'elle est observée dans les quatre structures résolues des protéines de cette famille (*hCRYM*, *mCRYM*, *PpOCD*, *AfAlaDH*).

Au niveau de ce domaine, un ion potassium semble être présent sur chaque monomère (Figures 54). Cet ion n'est pas observé dans les structures des homologues, ni dans les autres structures de *mCRYM* car la condition de cristallisation ne contenait pas du KH_2PO_4 comme c'est le cas pour la structure de *mCRYM/T3/NADP(H)*. La présence d'un ion potassium, par monomère, dans la structure de *mCRYM/T3/NADP(H)* ne permet pas d'extrapoler sur un possible rôle physiologique de *mCRYM* lié aux ions potassium. Cependant, de nombreuses études suggèrent un lien physiologique entre *CRYM*, *T3* et l'homéostasie du potassium. En effet, les hormones thyroïdiennes sont connues pour avoir un rôle dans la régulation de l'homéostasie du potassium par l'activation de l'expression des Na/K ATPases *via* une coopérativité des actions génomique et non génomique de la *T3* (Ismail-Beigi, 1993 ; Cheng et al., 2010). Aussi, *hCRYM* est fortement exprimée dans les fibroblastes de type II de la cochlée (structure anatomique de l'oreille interne), de la même manière que les sous-unités Na/K ATPases de type $\beta 1$. Ces deux protéines ont chacune un rôle important dans ces fibroblastes, puisque la mutation K314T et X315Y de *hCRYM* est responsable de la surdité non syndromique (Abe et al., 2003) et les Na/K ATPases sont impliquées dans la régulation du potentiel électrique positif et du taux élevé de potassium dans l'oreille interne (Steel et al., 2001 ; Spicer et al., 1996). Cette forte co-localisation de ces deux protéines dont leur rôle est important dans ce tissu, pourrait suggérer une possible coopérativité entre ces deux protéines afin de promouvoir l'action de la *T3* sur l'homéostasie du potassium et/ou sur la régulation de la concentration de potassium directement par *CRYM* (Oshima et al., 2006). Cependant, afin de vérifier ce lien possible, il est nécessaire d'identifier des partenaires de *CRYM* qui seraient impliqués dans le métabolisme du potassium.

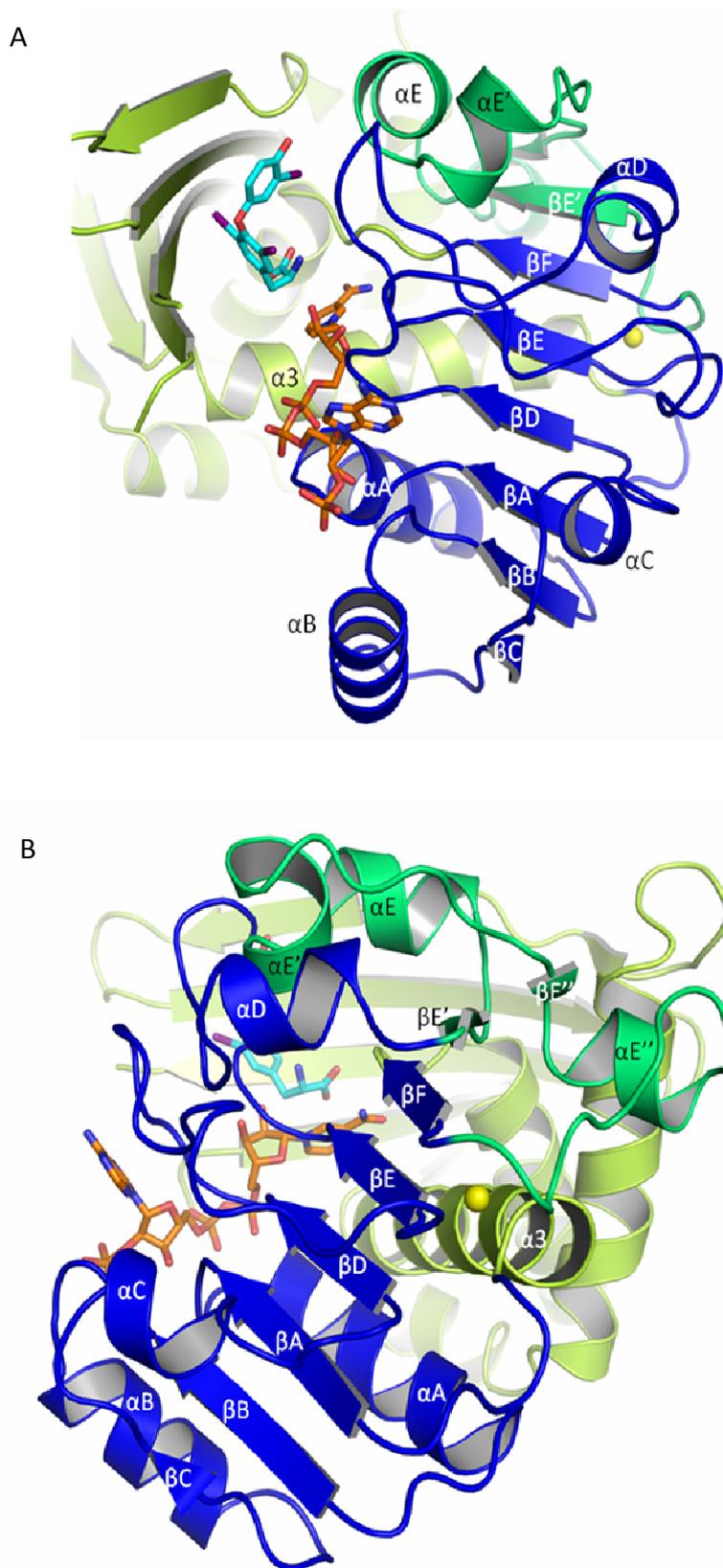
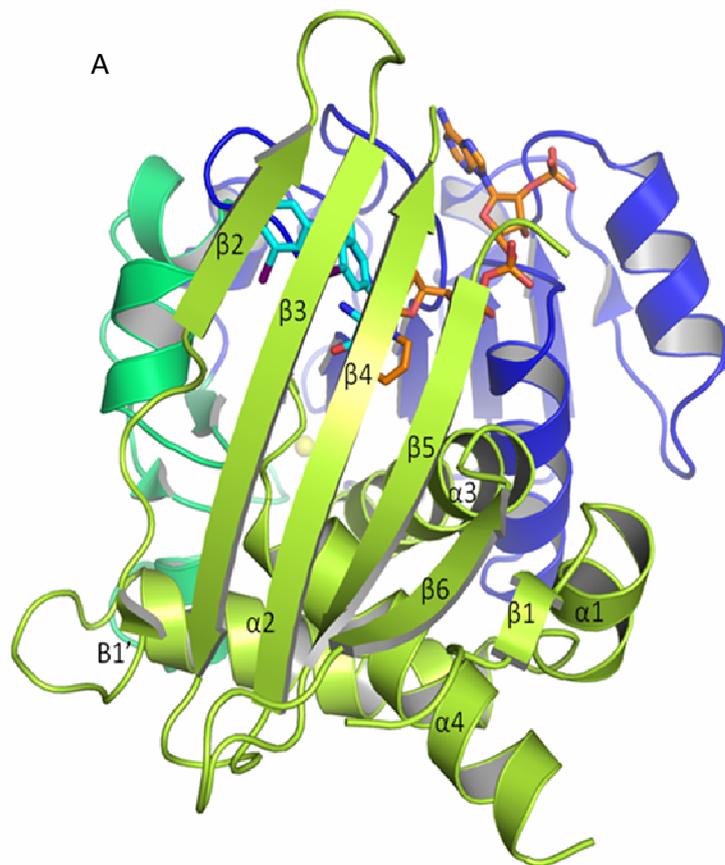


Figure 54 : (A) Représentation du monomère de mCRYM/T3/NADP(H), vue sur le domaine de fixation du NADP(H) (le domaine Rossmann est représenté en bleu et le domaine $\beta E' - \alpha E''$ en vert, la molécule de NADP(H) en orange, l'ion potassium par une sphère jaune). (B) rotation de 90° de la figure A.

A.1.3.2. Domaine de dimérisation et de fixation de la T3

Le domaine de dimérisation et de fixation de la T3 est localisé à l'extrémité N-terminale, du résidu 1 à 130 et à l'extrémité C-terminale, du résidu 295 à 314. Ce domaine est composé d'un feuillet β antiparallèle et de quatre hélices α . Les feuillets β antiparallèles de chaque monomère interagissent, par l'intermédiaire de leur face externe, pour former l'interface de dimérisation. Aussi, chaque feuillet est impliqué dans la fixation de la T3, au niveau de leur face interne (Figure 55). Le site de fixation de l'hormone T3 est ainsi localisé à proximité de l'interface de dimérisation mais également du site de fixation du NADP(H) (Figures 55).



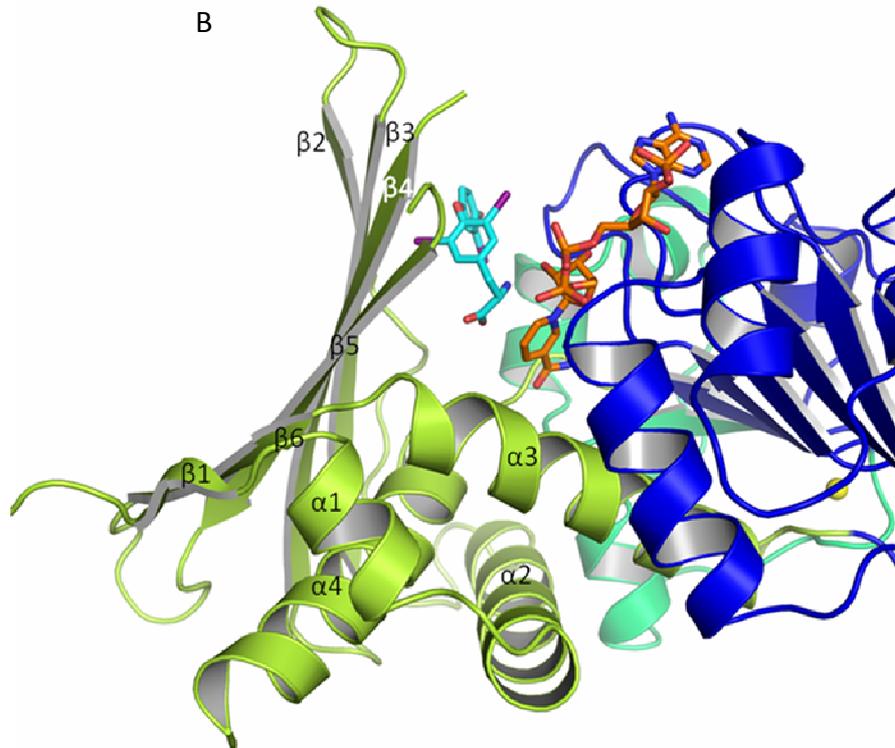


Figure 55 : (A) Représentation d'un monomère de mCRYM/ T3/NADP(H), vue sur le domaine de fixation de la T3 (le domaine est représenté en vert citron et la T3 en bleu cyan). (B) rotation de 90° de la figure A.

Au niveau du domaine de dimérisation et de fixation de la T3, la boucle entre les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ (nommée boucle $\beta 4$ - $\beta 5$) n'est pas visible sur les cartes de différences (F_o - F_c et $2F_o$ - F_c en densité positive) de la structure cristallographique de mCRYM/T3/NADP(H). Il en est de même pour les deux autres structures de mCRYM. Par conséquent, la présence de la molécule T3 dans le site de fixation de mCRYM ne permet pas la stabilisation de cette boucle. Notons la présence de résidus basiques (His84 et His91), au niveau de cette boucle, qui pourraient constituer un patch basique pour la fixation d'un partenaire de mCRYM. Ce partenaire pourrait avoir un rôle dans la stabilisation de cette boucle.

Le résidu K313, localisé à l'extrémité C-terminale de mCRYM, n'est pas visible dans la densité électronique du fait de sa présence à l'extrémité de la molécule, dans une structure non ordonnée. La mutation de ce résidu en Thréonine (K314T pour la protéine hCRYM) est à

l'origine d'une surdité non syndromique et induit une diminution de l'affinité de la T3 pour hCRYM qui devient NADPH indépendante bien que ce résidu soit éloigné du site de fixation de la T3 (Oshima A *et al.* 2005). Par ailleurs, l'extrémité C-terminale est exposée à la surface de la protéine et la nature basique du résidu Lys313 ainsi que la présence à proximité de ce résidu de trois résidus sérine (en position 308, 310 et 311) et du résidu Gly312, tous les quatre conservés dans les deux séquences de mCRYM et hCRYM, pourraient favoriser la fixation, *in vivo*, d'une protéine, non partenaire de CRYM sauvage, à CRYM mutée ce qui pourrait expliquer la diminution de la fixation de la T3 due à la mutation K314T de hCRYM. On pourrait imaginer une protéine qui induirait un encombrement stérique et/ou un changement de conformation qui inhiberait la fixation du NADPH et par conséquent, la fixation de la T3 devient NADPH indépendante et induit une diminution de son affinité pour CRYM. Afin de vérifier cette hypothèse, il suffit d'extraire CRYM à partir d'une lignée cellulaire stable ; par exemple celle utilisée par Oshima et collaborateurs (2005), lignée cellulaire COS1* stable exprimant la protéine CRYM mutée fusionnée à une étiquette FLAG puis d'extraire et de purifier CRYM mutée par immunoprécipitation puis d'analyser, par spectrométrie de masse (ESI-MS), si la fraction purifiée de CRYM contient du NADPH. Si l'hypothèse est vérifiée de l'absence de NADPH dans la fraction de CRYM, la même expérience peut être effectuée pour identifier les protéines qui se fixent à CRYM mutée versus CRYM sauvage (lignée cellulaire COS1 stable exprimant hCRYM sauvage fusionnée à l'étiquette FLAG). Puis d'extraire, en parallèle, les deux protéines CRYM du lysat cellulaire et de séquencer par spectrométrie de masse (ESI-MS-MS) les protéines qui se sont accrochées   CRYM mutée et sauvage. L'identification des partenaires présents pour CRYM mutée et absent pour CRYM sauvage devront être confirmés comme des partenaires de CRYM (et non des artefacts liés à la technique) par une immunoprécipitation inverse.

A.2. Interaction de la molécule T3 avec la protéine mCRYM et le NADP(H)

L'interaction de la T3 avec mCRYM s'effectue principalement par des liaisons hydrogènes, qui, la plupart, font intervenir des molécules d'eau. Des interactions électrostatiques et hydrophobes sont également engagées entre la T3 et mCRYM (Figure 56 et Tableau 10). Les oxygènes de la fonction carboxylique de la T3 constituent la majorité des liaisons hydrogènes entre la T3 et mCRYM. Alors que les cycles aromatiques de la T3 engagent, principalement,

des interactions hydrophobes avec les résidus Phe58, Phe79, Arg229 et le cycle nucléotidique du NADP(H). Aucune interaction n'est observée entre le cycle nicotinamide et la molécule T3, en particulier le carbone C4 de ce cycle, portant l'ion hydrure.

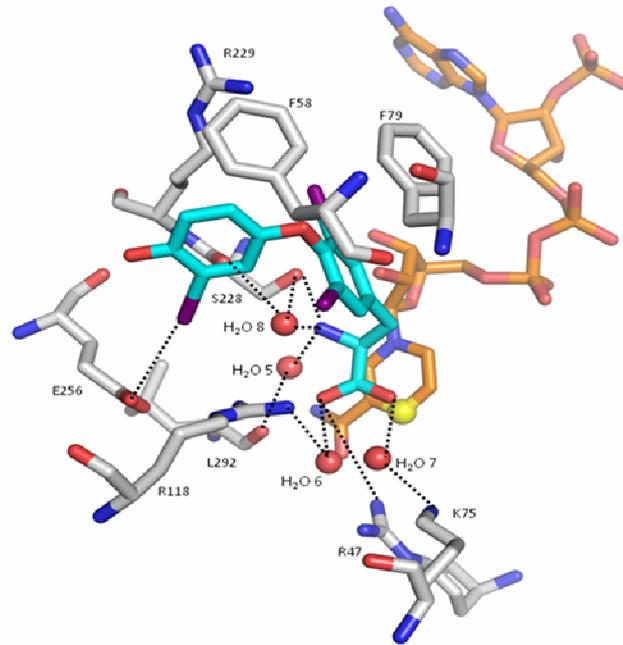


Figure 56 : Résidus de mCRYM impliqués dans l'interaction avec la molécule T3 (représentée en bleu cyan), la molécule de NADP(H) est représentée en orange et le carbone C4, au niveau du cycle nicotinamide, porteur de l'ion hydrure est représenté par une sphère jaune.

mCRYM	Distance (Å)	T3
R47-NH1	2,5	O4
R47-NH2	2,8	O4
R118-NH1 (2,90 Å)	2,6 (H ₂ O 6)	O4
L292-O (2,7 Å)	2,9 (H ₂ O 5)	N1
L292-O (3,2 Å)	2,6 (H ₂ O 6)	O4
K75-NZ (2,6 Å)	3 (H ₂ O 7)	O4
K75-NZ (2,6 Å)	2,3 (H ₂ O 7)	O3
S228-OG	2,9	N1
S228-OG (3,3 Å)	3,1 (H ₂ O 8)	O4
S228-O (3,3 Å)	3,1 (H ₂ O 8)	O4
E256-OE1	3,5	I2
S228-O	3,5	I2
R47-NH1 (3,6 Å)	3,5 (H ₂ O 8)	I2
R47-NH2 (3,4 Å)	3,5 (H ₂ O 8)	I2

Tableau 10 : Interactions entre la protéine mCRYM et la molécule de T3.

Les résidus de mCRYM impliqués dans ces interactions sont localisés dans différentes structures secondaires du domaine de fixation de la T3 mais également du domaine de fixation du NADP(H). Les résidus Arg47, Lys75, Phe58 et Phe79 sont situés au niveau du feuillet β antiparallèle. Le résidu Arg118 est situé au niveau de l'hélice α_3 , le résidu Leu 292 au niveau de la boucle entre l'hélice α_4 du domaine de fixation de la T3 et le brin β_F du domaine de fixation du NADPH, le résidu Glu256 au niveau de l'hélice α_E , du domaine $\beta E' - \alpha E''$ et enfin les résidus Ser228 et Arg229 au niveau de la boucle entre le brin βE et l'hélice α_D du domaine de fixation du NADP(H). Des résidus de mCRYM (Arg118, Ser228, Arg229 et Leu292) interagissent à la fois avec la molécule de NADP(H) et celle de la T3 (Figure 56 et 57). Les résidus Arg118 et Leu292 sont localisés au niveau du domaine de dimérisation et de fixation de la T3 et les résidus Ser228 et Arg229, appartiennent au domaine de fixation du NADP(H). En définitive, La fixation de la T3 n'engage pas uniquement des résidus appartenant à son domaine mais également des résidus du domaine de fixation du NADP(H), de même pour le NADP(H). Il semblerait qu'il y ait une coopérativité entre les deux molécules. La fixation de la molécule de NADP(H) pourrait stabiliser les chaînes latérales de

ces résidus pour renforcer la fixation de la T3. Ce point sera développé ultérieurement avec la comparaison des structures de mCRYM apo et mCRYM/T3/NADP(H).

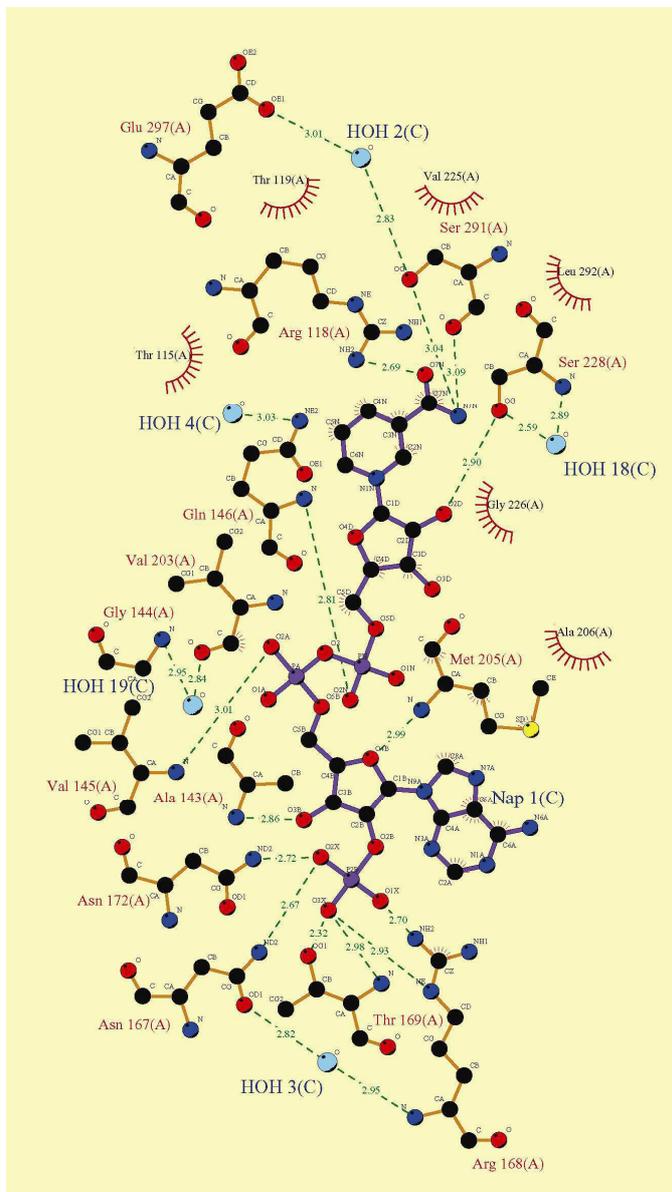


Figure 57 : Représentation des interactions entre la protéine mCRYM et le NADP(H). (Générée à partir de Ligplot)

Légende :

- 
 Résidus de mCRYM impliqués dans des interactions hydrophobes avec les atomes de NADPH représentés par ce symbole
- 
 Liaisons hydrogènes et leur distance.
- 
 Liaison entre atomes du NADP(H).
- 
 Liaison entre atomes de mCRYM.

Il est également surprenant de voir qu'aucune liaison n'est engagée entre les atomes d'iode de la T3 et ceux du NADP(H). Aussi, un seul atome d'iode (I2), de la T3, interagit avec les résidus de mCRYM (Arg47, Glu256 et Ser228). L'absence d'interaction des autres atomes d'iodes avec mCRYM suggère une faible affinité de fixation de la T3 dans cette structure de mCRYM. En effet, la répartition de surface électrostatique de la molécule mCRYM au niveau du site de fixation de la T3 confirme l'absence de patches basiques ou acides au niveau des iodes (Figure 58). Les structures cristallographiques de protéines complexées avec la molécule de T3 et les dérivés de T3, disponible dans la PDB, montrent pour certaines le

même type de fixation, des liaisons hydrogènes concentrées au niveau des oxygènes de la fonction carboxylique. Aussi, la partie aromatique de la molécule T3, où sont localisés les atomes d'iodes, ne présente pas de liaisons hydrogènes mais seulement des interactions hydrophobes et amphipathiques (Martinez L et al. 2008).

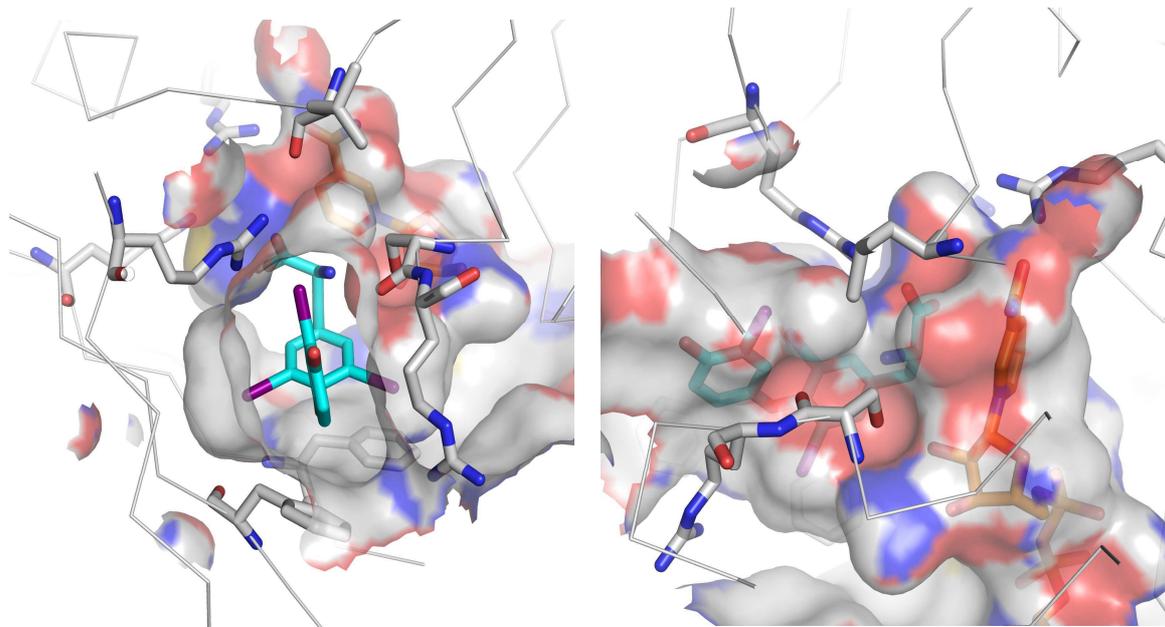


Figure 58 : (A) Représentation de la répartition de surface électrostatique au niveau du site de fixation de la molécule T3 et de la molécule de NADP(H) (B) rotation de 90° de A. La molécule de T3 est représentée en cyan et la molécule de NADP(H) en orange. Les résidus impliqués dans la fixation de la T3 sont indiqués en gris.

Les liaisons de la T3 engagées avec la protéine mCRYM ainsi que l'absence de liaisons existantes entre la T3 et le NADP(H) ne semblent pas suggérer une activité enzymatique liée au transfert de l'ion hydrure porté par le carbone C4 du cycle nicotinamide du NADP(H). De plus, aucun résidu de mCRYM et aucune molécule d'eau ne pourraient jouer le rôle de pont entre les molécules de NADP(H) et de T3 pour permettre ce transfert. Si la protéine mCRYM n'est pas une enzyme, comment peut-elle convertir le NADPH en NADP⁺ ? Y a-t-il l'intervention, *in vivo*, d'un partenaire capable d'effectuer cette conversion ? Si c'est le cas, pour quel mécanisme biologique de mCRYM l'énergie générée par cette conversion est-elle utilisée ?

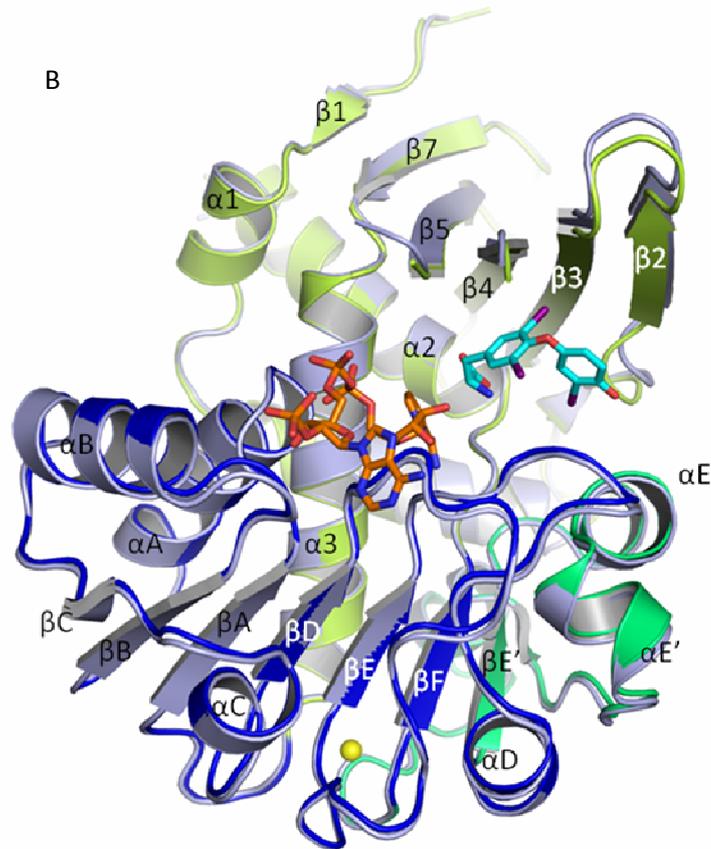


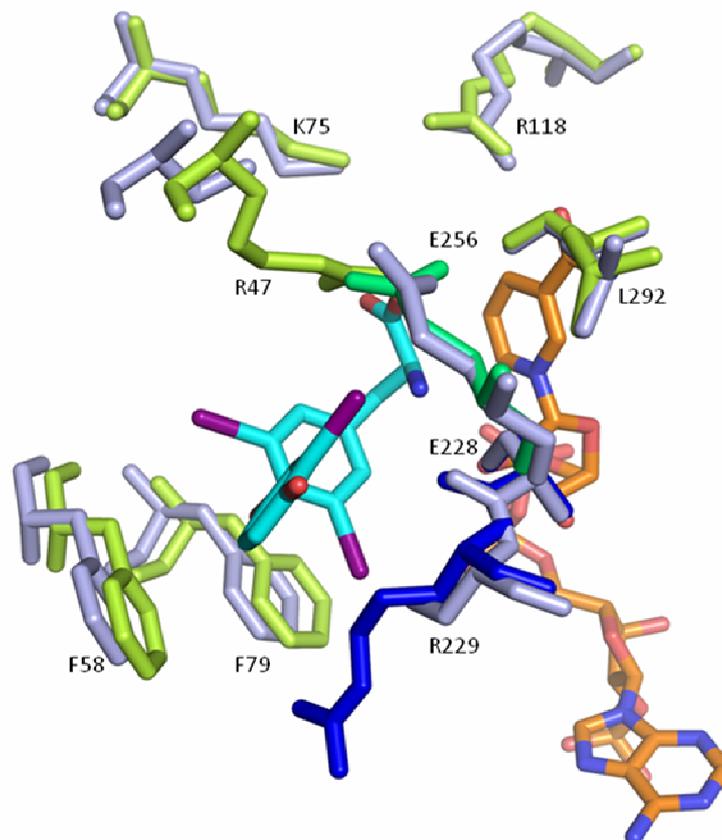
Figure 59 : Superposition de la structure de mCRYM/T3/NADP(H) et de mCRYM apo. (A) Représentation des deux monomères superposés de mCRYM/T3/NADP(H) (en vert citron, le domaine de dimérisation et de fixation de la T3, en bleu, le domaine de fixation du NADP(H), en vert, le domaine $\beta E'-\alpha E''$) et mCRYM apo (en bleu clair). (B) rotation de 90° de la figure A.

Des changements de conformation sont également visibles au niveau des chaînes latérales des résidus impliqués dans la fixation de la T3 (Figure 60.A). Dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), ces résidus présentent tous une conformation favorable à la fixation de la T3 par comparaison avec la structure de mCRYM apo. En particulier, dans la structure de mCRYM apo, la densité électronique attribuée aux chaînes latérales des résidus Arg47 et Arg229 n'est pas visible sur la carte de différence F_o-F_c (densité positive). La présence des

chaînes latérales de ces résidus dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H) révèle une stabilisation de ces résidus par la présence de T3 et/ou de NADP(H).

Au niveau du domaine de fixation du NADP(H), peu de changements de conformation sont visibles au niveau de la chaîne principale. La chaîne latérale du résidu Met205 est uniquement visible dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), (Figure 60.B). Les résidus, Arg168 et Thr169, présentent un changement significatif de conformation au niveau de leur chaîne latérale. Ces résidus sont tous les deux impliqués dans l'interaction avec le groupe phosphate du NADP(H). Aussi, le résidu Arg168 est un des deux résidus (avec le résidu Asn167) qui permet de discriminer entre le couple redox NADP(H) et NAD(H).

A



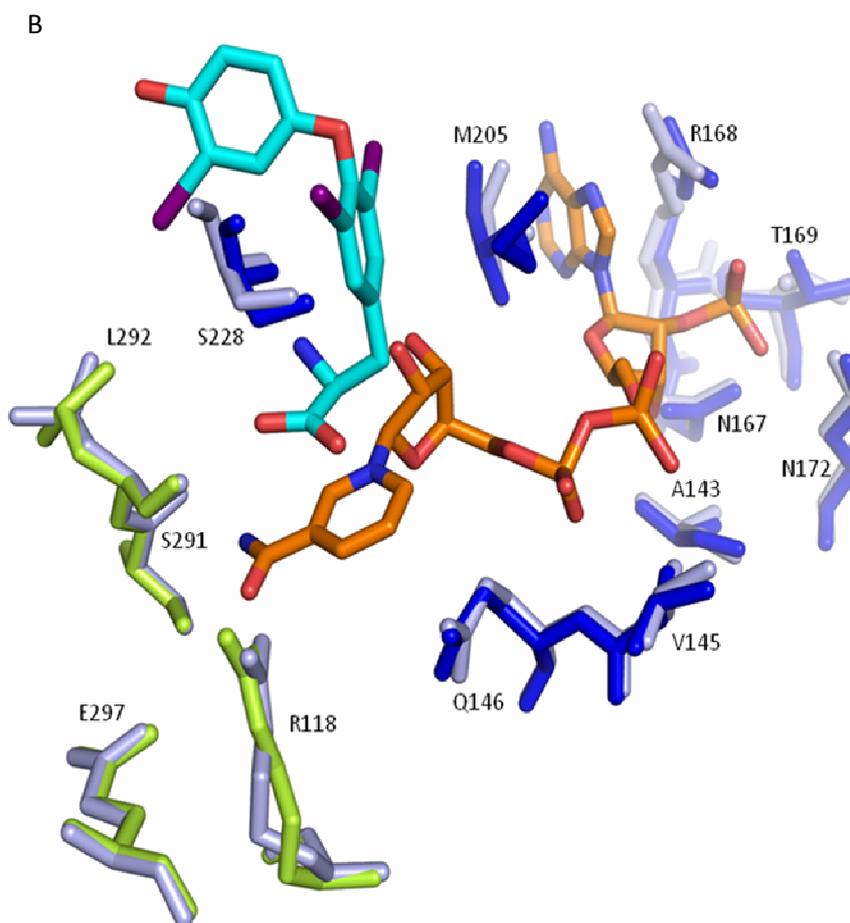


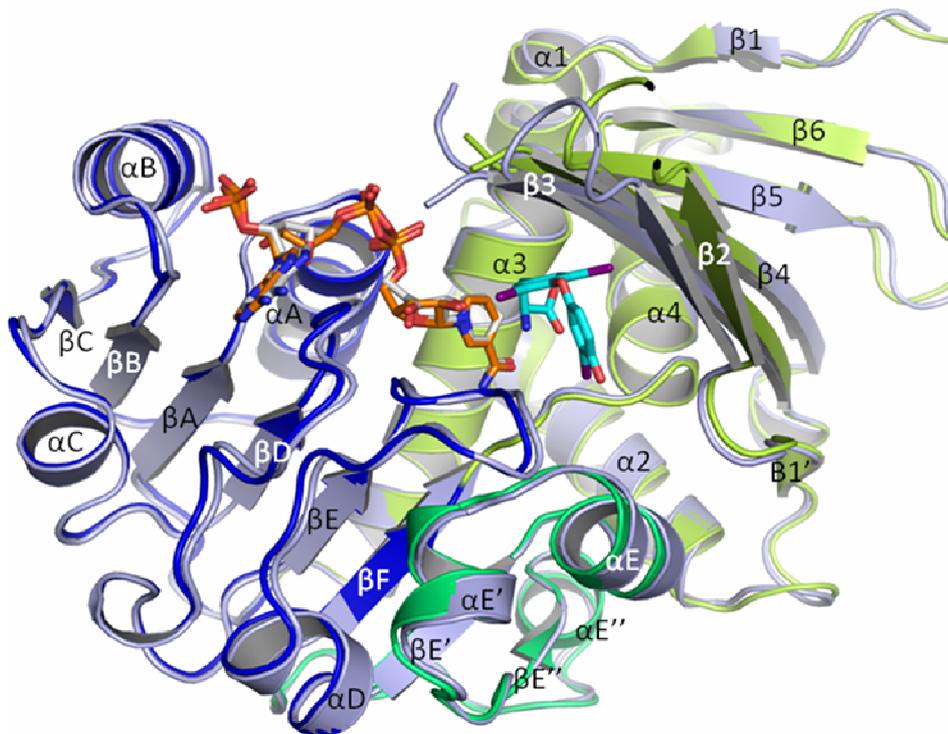
Figure 60 : Superposition des sites de fixation de la T3 et du NADP(H) des structures de mCRYM/T3/NADP(H) (code couleur par domaine) et de mCRYM apo (en bleu clair). (A) Représentation des résidus de mCRYM impliqués dans l'interaction avec la T3 (en cyan). (B) Représentation des résidus de mCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADP(H) (en orange). Les résidus T119, T115, G226, A206, V203 et G144 de mCRYM impliqués, principalement, dans des interactions hydrophobes avec le NADP(H) ne sont pas représentés pour plus de clarté.

En définitive, la fixation de la T3 et du NADP(H) génère une conformation fermée du site de fixation de la T3 dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H) par comparaison avec la structure de mCRYM apo. Ce changement de conformation est-il engendré par la fixation de la T3 et/ou du NADP(H) ? La comparaison de la structure de mCRYM/T3/NADP(H) avec celle de mCRYM/NADP(H) va permettre de mieux comprendre l'implication de chaque molécule dans les changements conformationnels observés.

A.3.2. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec mCRYM/NADP(H)

La superposition de la structure de mCRYM/T3/NADP(H) avec celle de mCRYM/NADP(H) présente plus d'écart (RMSD de 0.75 Å) par comparaison avec celle de la structure mCRYM apo (RMSD de 0.5 Å). Les changements sont également, en majorité, observés au niveau du domaine de dimérisation et de fixation de la T3. Les brins β qui constituent le feuillet β antiparallèle présentent des conformations différentes pour les deux structures, y compris le brin $\beta 1$ (Figure 61). Il est surprenant de voir que le feuillet β adopte une conformation plus proche (conformation fermée) du site de fixation de la T3 pour la structure de mCRYM/NADP(H) par comparaison avec la structure de mCRYM/T3/NADP(H). Cette dernière présentait déjà cette conformation par superposition avec la structure mCRYM apo mais il semblerait que le NADP(H) seul soit capable d'induire cette conformation fermée. Par ailleurs, d'autres changements sont observés au niveau des autres structures secondaires (les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$) du domaine de fixation de la T3.

A



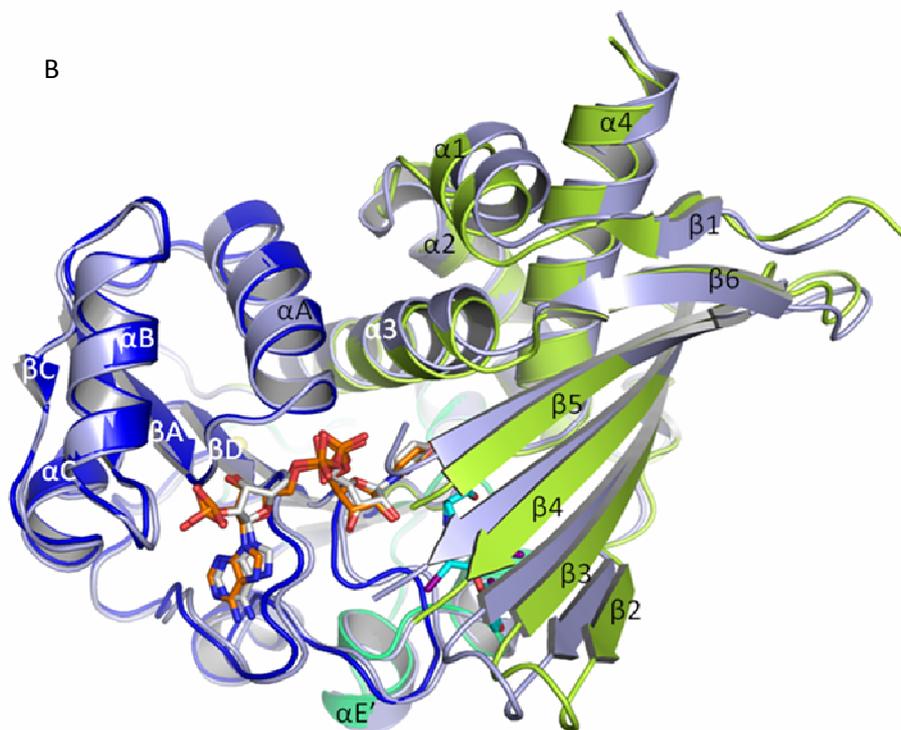
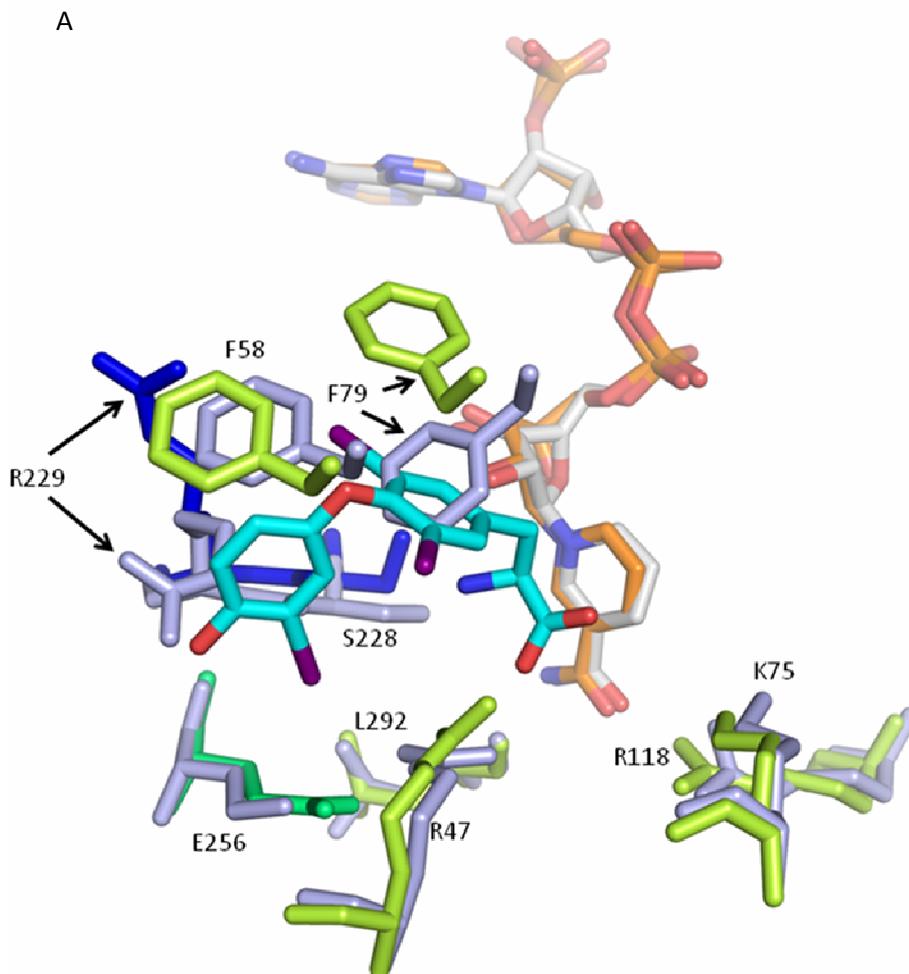


Figure 61 : (A) Superposition des monomères des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de mCRYM/NADP(H). Représentation des deux monomères superposés de mCRYM/T3/NADP(H) (en vert citron, le domaine de dimérisation et de fixation de la T3, en bleu, le domaine de fixation du NADP(H), en vert, le domaine $\beta E'-\beta E''$) et mCRYM/NADP(H) (en bleu clair). (B) rotation de 90° de la figure A.

L'analyse des sites de fixation du NADP(H) et de la T3 révèle également de nombreuses différences dans la conformation des chaînes latérales des résidus impliqués dans la fixation de la T3. La conformation du site de fixation de la T3 dans la structure de mCRYM/NADP(H) ne permet pas la fixation de la T3 telle qu'elle est positionnée dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), due à la présence du cycle aromatique du résidu Phe79 au niveau de l'emplacement de la T3 et de la position du résidu Arg229, beaucoup trop proche de la molécule de T3 (Figure 62). De plus, la conformation du cofacteur NADP(H) est différente pour les deux structures, notamment, au niveau du cycle nicotinamide des molécules de NADP(H) de chaque structure. La molécule de NADP(H) dans la structure de mCRYM/NADP(H) présente un cycle nicotinamide non planaire par comparaison avec le cycle de la molécule de NADP(H) dans mCRYM/T3/NADP(H). Il est connu que la forme réduite

NADPH possède un cycle non planaire comparée à la forme oxydée NADP⁺ (Goodman et al., 2004). Cette différence, entre les molécules de NADP(H) des structures de mCRYMs, pourrait suggérer la présence de la forme réduite (NADPH) dans la structure de mCRYM/NADP(H) et de la forme oxydée (NADP⁺) pour la structure de mCRYM/T3/NADP(H), (Figure 62.B). Cependant, l'écart de résolution entre les structures de mCRYM/T3/NADP(H) (1,8 Å) et mCRYM/NADP(H) (2,4 Å) rend difficile la comparaison et l'observation de changements de conformation.



B

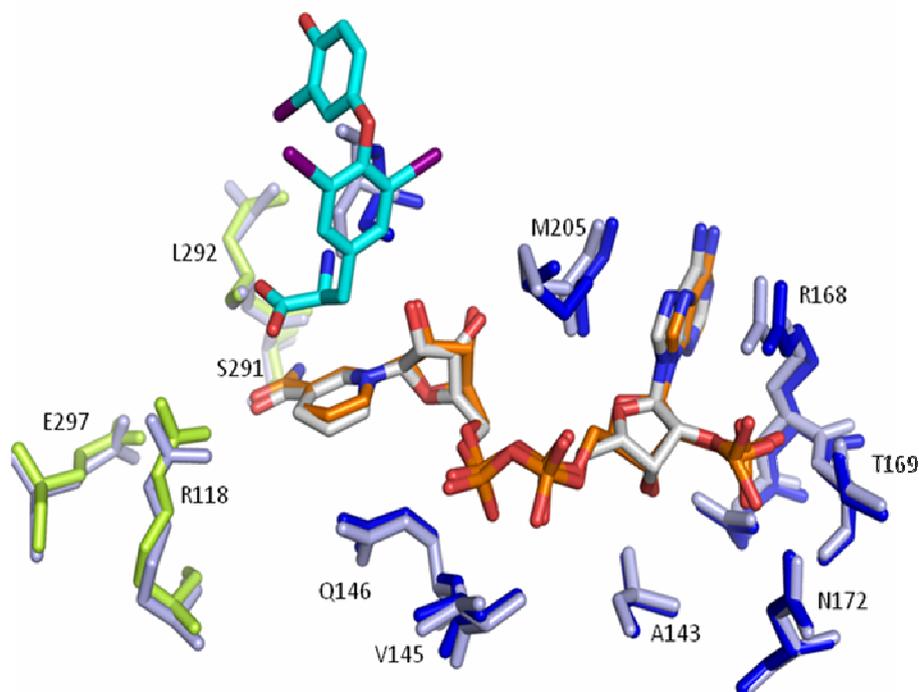


Figure 62 : Superposition des sites de fixation de la T3 et du NADP(H) des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de mCRYM/NADP(H). (A) Représentation des résidus de mCRYM impliqués dans l'interaction avec la T3 (en cyan). (B) Représentation des résidus de mCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADP(H) (en orange pour la structure de mCRYM/T3/NADP(H) et en gris pour mCRYM/NADP(H)). Les résidus T119, T115, G226, A206, V203 et G144 de mCRYM impliqués, principalement, dans des interactions hydrophobes avec le NADP(H) ne sont pas représentés pour plus de clarté.

Cette hypothèse pourrait expliquer les différences de conformation observées entre les deux structures. Si la présence de la forme réduite NADPH entraîne une conformation fermée de ce site et que l'affinité pour la T3 est augmentée en présence de cette forme, comme cela a été déterminé pour hCRYM (Vie et al., 2008), alors la conformation fermée du site de la T3, dans la structure de mCRYM/NADP(H), nécessite la fixation préalable de la T3. En effet, la représentation de la répartition de surface électrostatique des deux structures de mCRYMs superposées le montre bien ; dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), la molécule de T3 est visible en surface et cette conformation du site (dite ouverte) permet une exposition de la T3. Alors que la conformation du site (dite fermée) de mCRYM/NADP(H) ne permet une

moins bonne exposition de la T3 à la surface de la protéine. Par conséquent, il est difficilement envisageable que la T3 puisse accéder au site si elle n'est pas déjà fixée (Figure 63). Si l'hypothèse est vraie, cela voudrait dire que la protéine mCRYM devrait avoir constamment la T3 fixée, avec une affinité plus faible qu'en présence de la forme réduite NADPH, et cette dernière régulerait la fixation de la T3 en l'empêchant de sortir du site, principalement, par des changements de conformation des chaînes latérales.

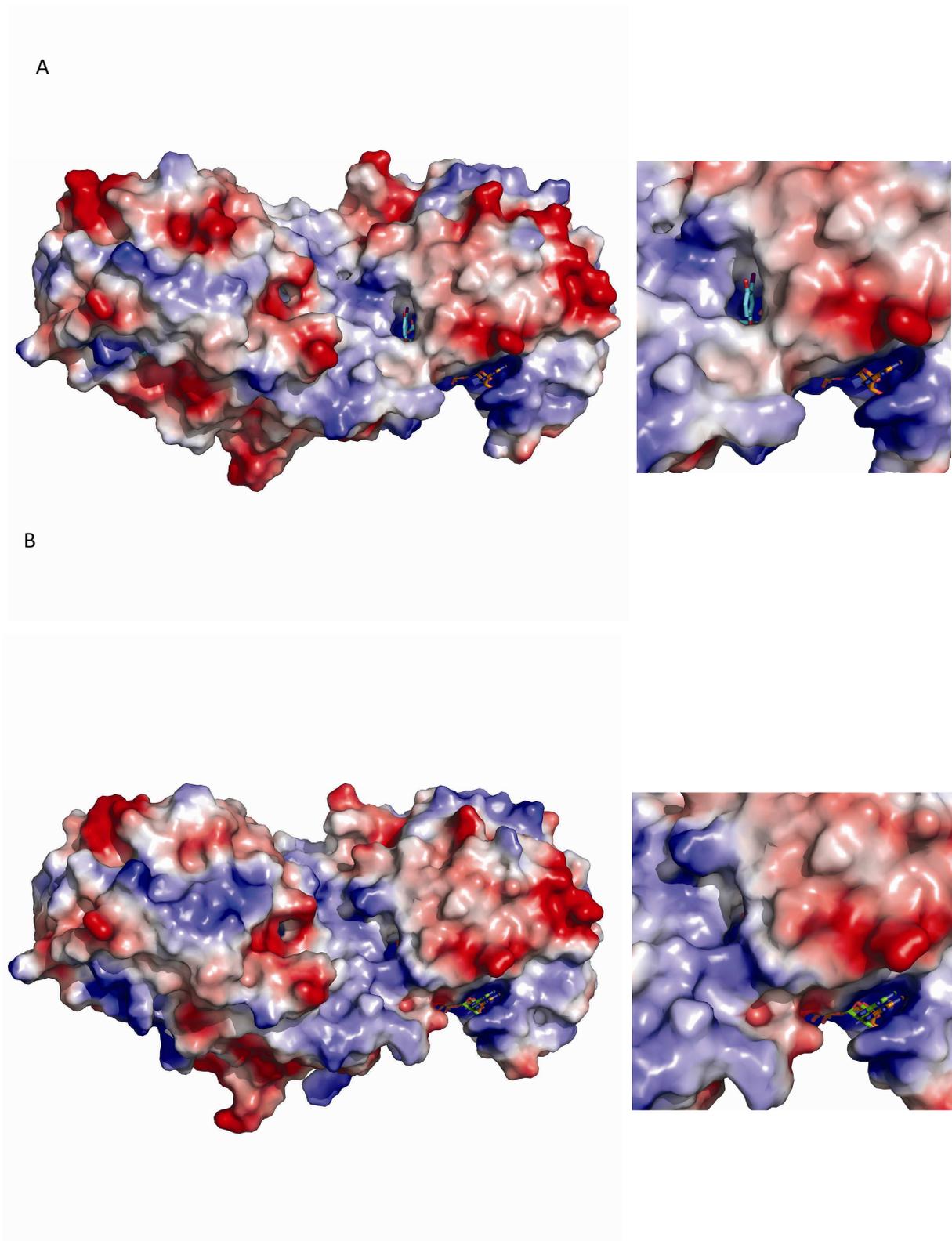


Figure 63 : Comparaison des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et mCRYM/NADP(H). (A) Représentation de la répartition de surface électrostatique. Les zones colorées en rouge sont chargées négativement, celles en bleu sont chargées positivement (A) du dimère de mCRYM/T3/NADP(H) avec un zoom sur le site de fixation de la T3, en position ouvert (la molécule de NADP(H) est représentée en orange) et (B) du dimère de mCRYM/NADP(H)

avec un zoom sur le site de fixation de la T3, en position fermée, (la molécule de NADP(H) est représentée en vert). La molécule de T3 (en cyan, non visible en .B par la position fermée du site de la T3) et de NADP(H) (en orange) de la structure de mCRYM/T3/NADP(H) sont représentés, telles qu'elles sont observées en (A). Générées à partir de Pymol.

Ce changement de répartition de charges est global, le dimère entier adopte une répartition de surface électrostatique relâchée dans le structure de mCRYM/T3/NADP(H) et rétractée dans la structure de mCRYM/NADP(H). Ce changement est également clairement visible au niveau du site de fixation du NADP(H).

En outre, cela signifierait que la position de la T3, dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), ne correspond pas à sa position la plus stable dans le site et correspondrait à un état intermédiaire caractérisé par une fixation de faible affinité. Ce qui irait dans le sens d'une conversion possible de la forme réduite NADPH (mise dans la condition de cristallisation) en la forme oxydée NADP^+ très probablement présente dans cette structure. Cette hypothèse est confortée par le taux d'occupation de la T3 qui est de 0,75 et par la difficulté d'obtention de la structure en présence de la T3. En effet, les conditions de cristallisation n'étaient pas favorables à la fixation de la T3 sur mCRYM du fait du pH fortement acide (pH 4,7) alors que le pH optimum pour la fixation de la T3 sur mCRYM doit être basique lié à la nature chimique de la T3 (au moins un pH de 8,7). Par ailleurs, la position des chaînes latérales de certains résidus de la structures de mCRYM/NADP(H) suggèrerait une position de la molécule de T3 plus enfouit dans le site de fixation dans cette structure, ce qui est possible compte tenu du volume disponible au fond du site. Une question est cependant soulevée dans le cas où cette hypothèse se confirme, comment s'est effectuée la conversion du NADPH en NADP^+ ? S'est-elle effectuée d'une manière spontanée (par l'influence des conditions de cristallisation à pH 4.7, le temps passé dans la goutte car la forme réduite NADPH est instable ou bien lors de l'irradiation du cristal aux rayons X) ou finalement, par une réaction enzymatique conduite par mCRYM ?

A.4. Comparaison de mCRYM avec hCRYM et les homologues

A.4.1. Homologie de séquence

L'alignement de séquence de mCRYM contre les séquences de protéines de la base de données SWISS-PROT démontre l'appartenance de CRYM à la famille des OCDs/ μ crystallines. En effet, de nombreuses OCDs sont classées juste après les protéines μ -crystallines d'autres espèces, avec une homologie de séquence avec les μ -crystallines autour de 30%-40%.

L'alignement de séquence primaire de mCRYM contre les séquences de hCRYM, de l'OCD de *P.putida* et de l'AlaDH de *A.fulgidus* montre des résidus conservés pour le domaine de fixation du ligand (T3 pour CRYM) ou du substrat (Ornithine pour l'OCD et l'Alanine pour l'AlaDH) et pour le domaine de fixation aux couples redox NAD(H), pour l'AlaDH et l'OCD, et le couple redox NADP(H), pour CRYM, (Figure 23 du chapitre 1 introduction, page 69).

L'identité de séquences entre CRYM humaine et murine est de 88% alors que celle avec les enzymes *PpOCD* et *AfAlaDH* est de 30 et 40%, respectivement. La différence majeure au niveau du domaine de Rossmann de ces protéines est la fixation de différents couples redox ; les protéines AlaDH et OCD fixent le couple NADH/NAD⁺ alors que la protéine CRYM fixe le couple NADPH/NADP⁺. Le cofacteur NAD⁺ est utilisé dans les réactions d'oxydation alors que le NADPH est utilisé dans les réactions de biosynthèse réductrices. Au niveau du domaine de fixation du NADPH, le motif GxGxxG/A spécifique à la fixation des dinucléotides est présent pour les quatre protéines, ce qui prouve une conservation de la fonction de ce domaine. Les séquences de ces protéines comportent plus de résidus conservés pour ce domaine (53 résidus conservés) que pour le domaine de fixation du ligand/substrat (32 résidus conservés). Ce dernier est scindé en deux sous-domaines pour les quatre protéines, il comporte la partie N-terminale de la séquence (environ les 130 premiers résidus) et l'extrémité C-terminale (environ les cents derniers résidus). La proportion de résidus (environ 15%) conservés pour les quatre séquences ne suggère pas une forte homologie pour ce domaine de fixation ligand/substrat. Par ailleurs, la fonction de ce domaine est différente pour toutes ces protéines, d'une part, par la spécificité du ligand ou du substrat fixé, et, d'autre part, par la nature de la réaction enzymatique pour l'OCD et l'AlaDH (cyclodésaminase et déshydrogénase, respectivement) et l'absence supposée d'activité

enzymatique pour les protéines CRYMs. Pour comprendre le lien entre la famille des OCDs/*AfAlaDH* et les μ -crystallines, la comparaison des structures 3D disponibles pour certaines de ces protéines (*mCRYM*, *hCRYM*, *PpOCD*, *AfAlaDH*) a été effectuée (Figure 64).

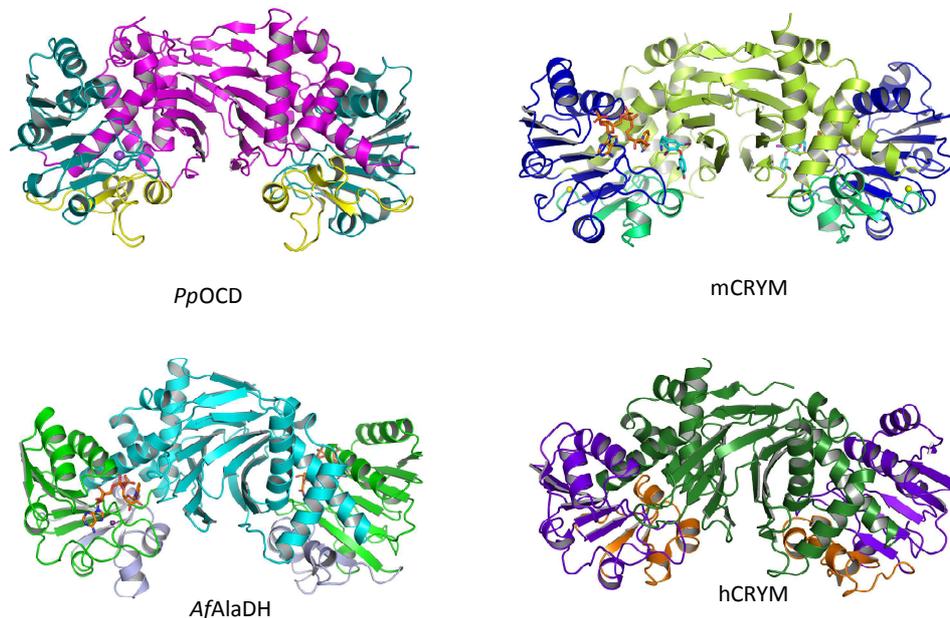


Figure 64 : Structures cristallographiques des dimères de *mCRYM*, *hCRYM*/NADPH (PDB 2199), *AfAlaDH*/NAD⁺ (PDB 10MO) et *PpOCD*/Orn/NADH (PDB 1X7D).

A.4.2. Comparaison de *mCRYM*/T3/NADP(H) avec *hCRYM*/NADPH

La superposition des structures de *mCRYM*/T3/NADP(H) et de *hCRYM*/NADPH (Cheng et al., 2007, PDB : 2199), (Figure 65), conduit à un écart équivalent, (RMSD de 0.8 Å), à celui observé entre les structures de *mCRYM*/T3/NADP(H) et *mCRYM*/NADP(H), (RMSD de 0.75 Å). Par ailleurs, la superposition de *mCRYM*/NADP(H) et de *hCRYM*/NADPH conduit à un écart moins important (RMSD de 0,60 Å).

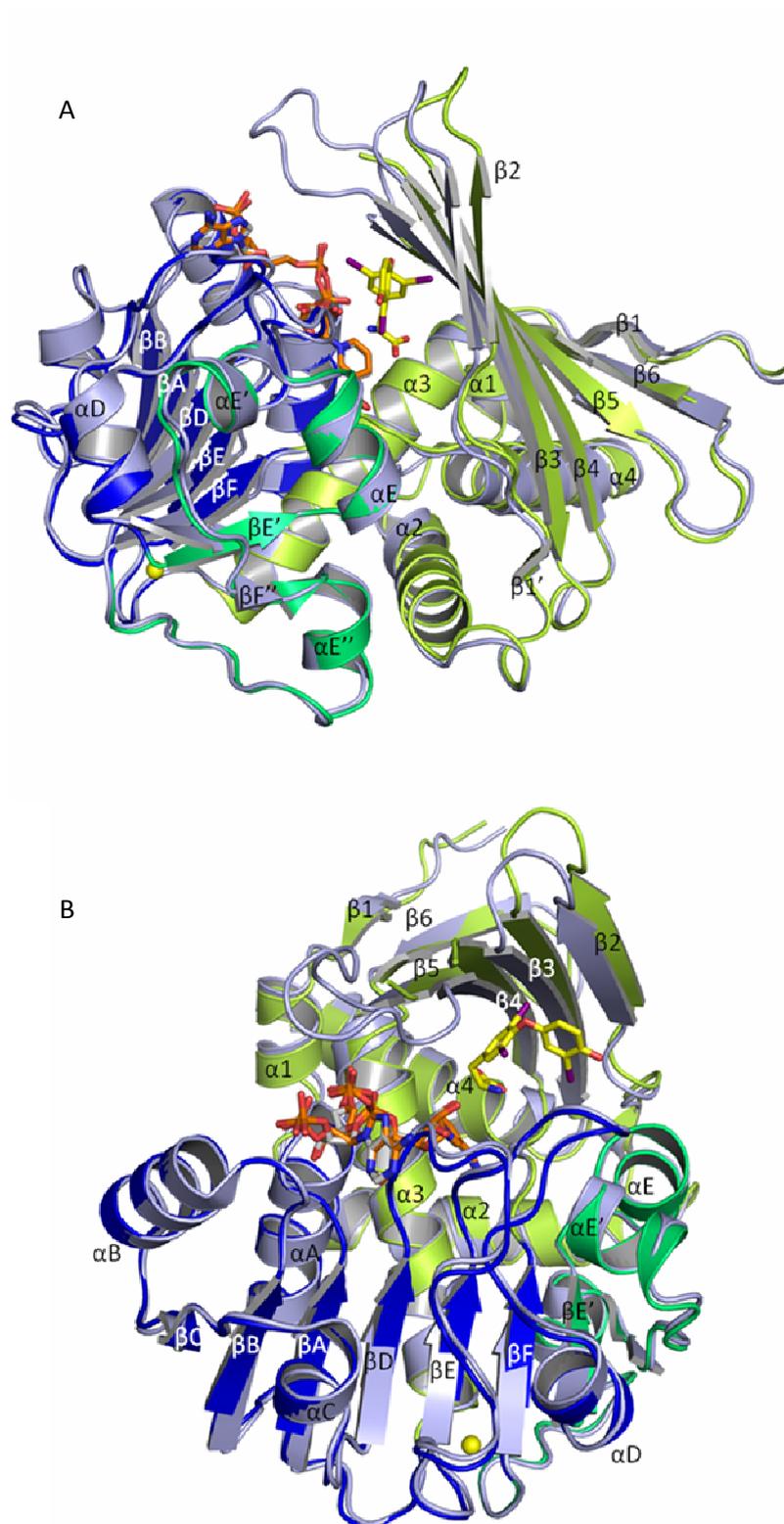
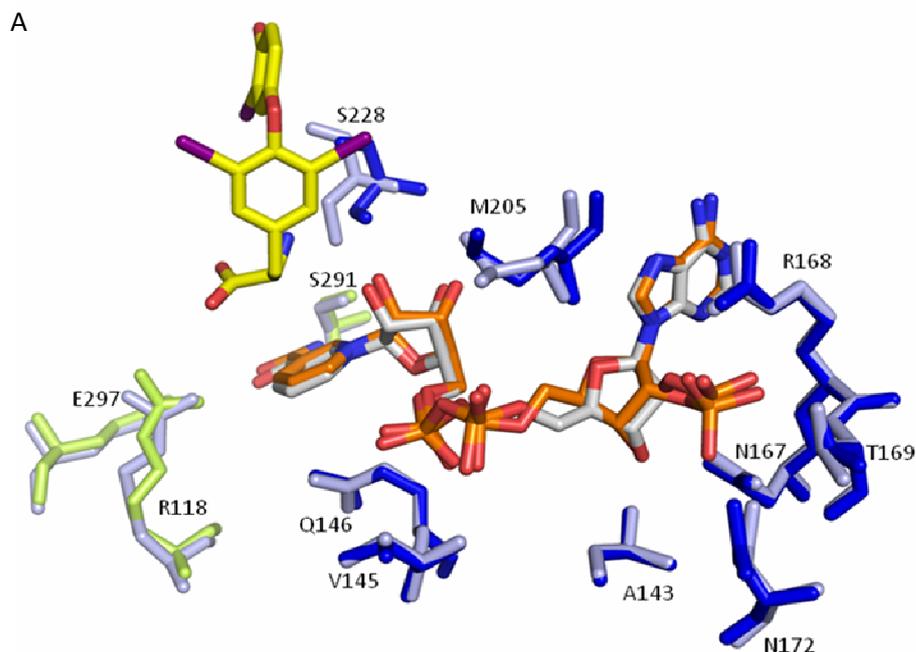


Figure 65 : (A) Superposition des monomères de mCRYM/T3/NADP(H) et de hCRYM/NADPH. Représentation de mCRYM/T3/NADP(H) : en vert citron, le domaine de dimérisation et de fixation de la T3, en bleu, le domaine de fixation du NADP(H), en vert, le domaine βE'-βE'', la T3 en jaune et le NADP(H) en orange et hCRYM/NADPH est représentée en bleu clair et le NADPH en gris. (B) rotation de 90° de la figure A.

A.4.2.1. Site de fixation du NADP(H) : comparaison avec mCRYM/NADP(H)

La superposition des sites de fixation du NADP(H) de mCRYM/T3/NADP(H) et hCRYM/NADP(H) montre que les résidus impliqués dans la fixation du NADP(H) sont équivalents, à l'exception du résidu Met205 de mCRYM (Figure 66.A). Ce résidu est substitué par le résidu Leu206 dans la structure de hCRYM et ne semble pas interagir avec le NADP(H).

La superposition du site de fixation du NADP(H) de mCRYM/NADP(H) et hCRYM/NADPH montre une meilleure superposition que celle de mCRYM/T3/NADP(H) et hCRYM/NADPH, particulièrement au niveau du résidu Ser228 de mCRYM (Ser229 de hCRYM) ainsi qu'au niveau de la molécule de NADP(H), du côté du cycle nicotinamide, portant l'ion hydrure sur le carbone C4, (Figure 66.B). Cependant, les molécules de NADP(H) des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et hCRYM/NADPH présente une meilleure superposition au niveau du cycle adénine et du résidu Arg168 de mCRYM (Arg169 de hCRYM) qui interagit avec ce cycle (Figure 66.A).



B

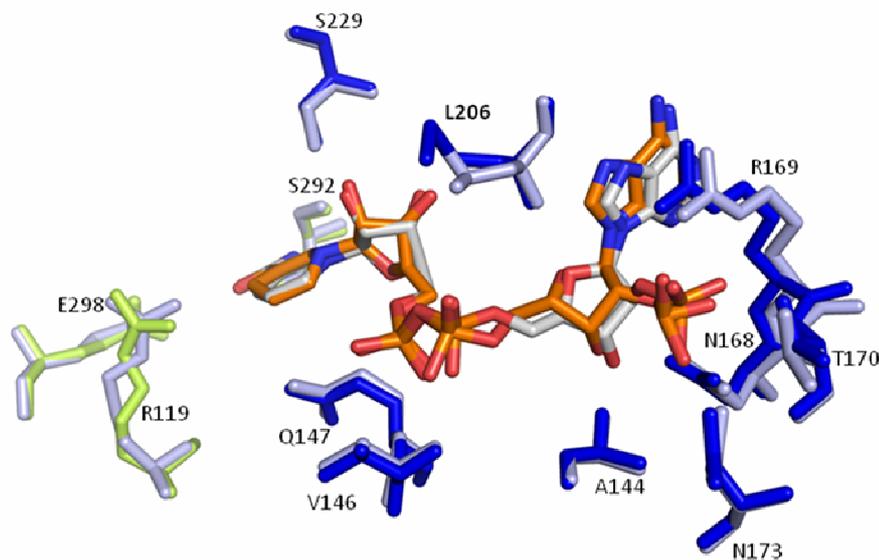


Figure 66 : (A) Superposition des sites de fixation du NADP(H) des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de hCRYM/NADPH. Représentation des résidus (code couleur par domaine) de mCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADP(H) (en orange) et des résidus de hCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADPH (en bleu clair). Les résidus indiqués sur cette figure correspondent sont ceux de mCRYM. (B) Superposition des sites de fixation du NADP(H) des structures de mCRYM/NADP(H) et de hCRYM/NADPH. Représentation des résidus (code couleur par domaine) de mCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADP(H) (en orange) et des résidus de hCRYM impliqués dans l'interaction avec le NADPH (en bleu clair). Les résidus indiqués sur cette figure sont ceux de hCRYM. Les résidus de CRYMs impliqués dans des interactions hydrophobes, avec le NADP(H), ne sont pas représentés pour plus de clarté.

A.4.2.2. Flexibilité de la boucle β 4- β 5

L'organisation des structures secondaires et tertiaires de mCRYM/T3/NADP(H) et de hCRYM/NADP(H) est sensiblement conservée mais des différences significatives de conformations sont présentes, comme cela a été décrit pour les structures de mCRYM apo et mCRYM/NADP(H). La boucle β 4- β 5 n'est pas visible pour les trois structures de mCRYM alors qu'elle l'est pour la structure de hCRYM/NADPH (présentée en introduction, Figure 20, page 57). Les deux séquences d'acides aminés correspondant à cette boucle, de mCRYM (GHSNT-AVP) et hCRYM (DRGITSVVP) comportent uniquement trois résidus conservés (indiqués en

gras). Bien que cette boucle soit visible dans la structure de hCRYM, elle semble également être flexible par la présence de deux conformations différentes pour les deux monomères de l'unité asymétrique (dimère cristallographique). Le résidu Pro90 de chaque monomère présente les deux isomérisations *trans/cis* qui témoignent de la flexibilité de la boucle. Dans les deux structures de CRYMs (hCRYM et mCRYM), aucun résidu de cette boucle ne semble être impliqué dans la fixation du NADP(H) ou de la T3. Cheng et collaborateurs (2007) avaient émis l'hypothèse à partir de la structure de hCRYM/NADPH d'un rôle possible de la T3 dans la stabilisation de cette boucle. Dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), la fixation de la T3 ne permet pas sa stabilisation donc cette hypothèse semble être réfutée par la structure de mCRYM/T3/NADP(H). Par conséquent, l'hypothèse de l'intervention nécessaire d'un partenaire de CRYM pour stabiliser la boucle semble plus plausible.

A.4.2.3. Site de l'ion potassium

Une molécule d'eau a été positionnée, dans la structure de hCRYM, à la place de l'ion potassium présent dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H). Pourtant, les résidus qui forment les liaisons avec l'ion potassium sont tous conservés dans la séquence de hCRYM (Figure 67) et la densité électronique de la carte de différence Fo-Fc (présence d'une densité positive) de hCRYM suggère autre chose qu'une molécule d'eau. Par ailleurs, la condition de cristallisation de hCRYM/NADPH ne contient pas d'ion potassium (0,2 M ammonium formate, 20% PEG 3350 pH 6,5). L'ensemble des observations méritent plus d'investigations sur ce site possible à potassium ou à d'autres ions monovalents ou divalents.

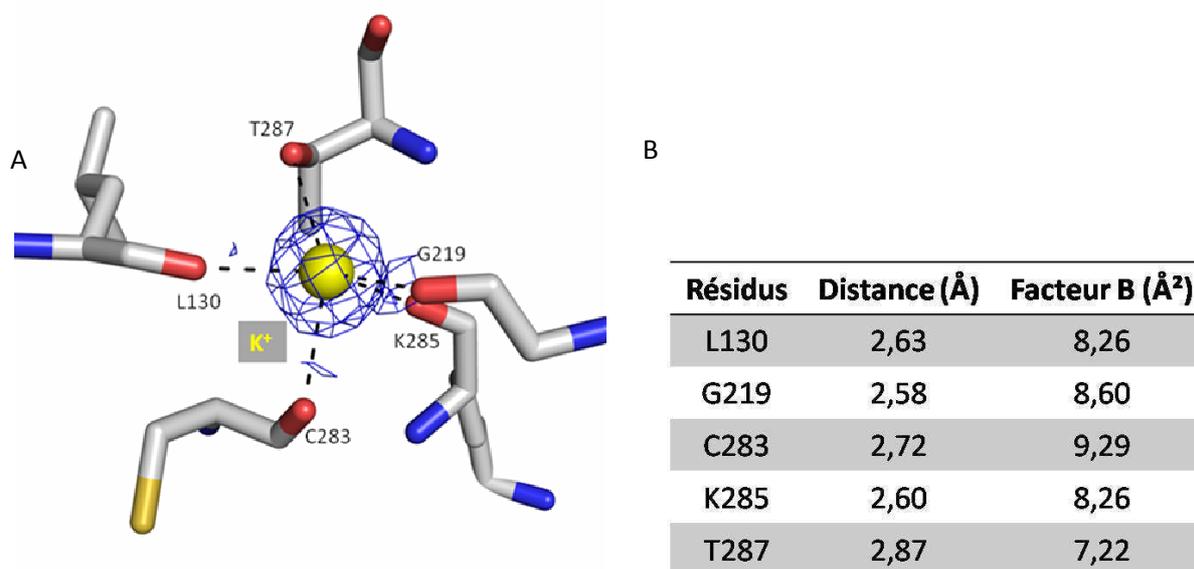
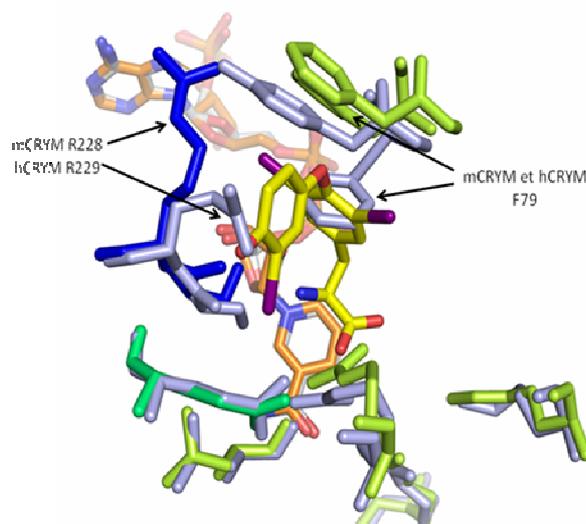


Figure 67 : (A) Représentation de la densité électronique, des cartes de différence 2Fo-Fc à 1 σ (bleu) et Fo-Fc à 3 σ (absente), de l'ion potassium de la structure de mCRYM/T3/NADP(H), (B) Tableau indiquant les distances (\AA) et les facteurs B (\AA^2) des atomes d'oxygènes des résidus de mCRYM impliqués dans la liaison avec l'ion potassium.

A.4.2.4. Superposition du site de la T3 de hCRYM et mCRYM

La superposition des résidus des structures de hCRYM/NADPH et de mCRYM/NADP(H) impliqués dans la fixation de la T3, observés dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), montre une surprenante similitude dans la conformation du site de fixation de la T3 (Figure 68). En effet, la conformation des chaînes latérales des résidus, Phe79 et Arg229, dans la structure de mCRYM/NADP(H) est identique à celle des chaînes latérales des résidus correspondants dans la structure de hCRYM/NADPH (résidus Phe79 et Arg230), cette conformation empêcherait la fixation de la T3 telle qu'elle est positionnée dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H). Par ailleurs, cette identité de conformation, entre mCRYM/NADP(H) et hCRYM/NADPH, conforte l'hypothèse de la présence de la forme réduite NADPH dans la structure de mCRYM/NADP(H) et réfuterait, de la même manière, la présence de cette même forme dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), par les différences de conformations de cette structure avec les deux autres et, si et seulement si, ces différences ne sont pas induites par la fixation de la T3.

A



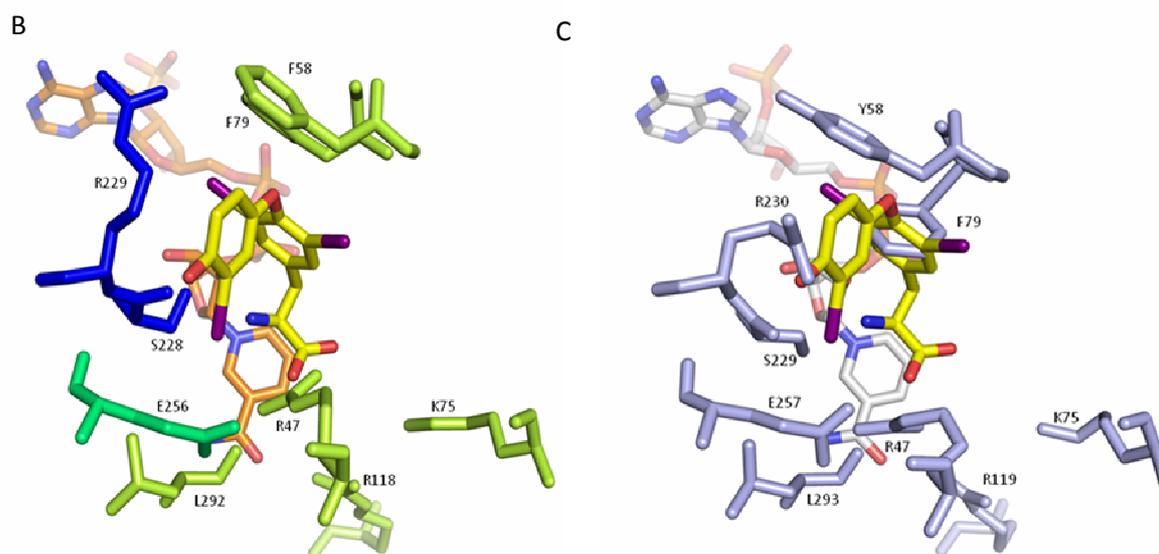


Figure 68 : (A) Superposition des sites de fixation de la T3 des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de hCRYM/NADPH. (B) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de mCRYM impliqués dans l'interaction avec la T3 (en jaune). (C) Représentation du site de fixation de la T3 de hCRYM/NADPH avec les résidus correspondant (en bleu clair) à hCRYM et de la molécule de T3 telle qu'elle est observée dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), (la T3 est indiquée en jaune).

A.4.2.5. Comparaison avec le modèle hCRYM/T3/NADPH

Cheng et collaborateurs (2007) ont établi un modèle de fixation de la T3 à partir de la structure de hCRYM/NADPH qui implique treize résidus de hCRYM. Parmi ces résidus, sept ne sont pas impliqués dans la fixation de la T3 dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), (Gly60, Met62, His91, Thr115, Met205, Trp232). Tous les résidus, y compris ceux impliqués dans la fixation de la T3 dans mCRYM, sont conservés entre les deux séquences des protéines CRYMs sauf les résidus Phe58 et Met205 dans mCRYM qui sont substitués, respectivement, en Tyr58 et Leu206 dans hCRYM. Par ailleurs, la représentation de ces résidus supplémentaires à partir de ce modèle dans la poche de la T3 dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H) impliquerait une fixation de la T3 plus enfouit dans le site (Figure 69.A). Par conséquent, la position de la T3 dans mCRYM est différente de celle proposée dans le modèle de hCRYM/T3. Ceci est en accord avec l'hypothèse émise précédemment qui suggère une fixation de la T3 dans un état peu stable dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H). La représentation des résidus, correspondant au modèle de

hCRYM/NADPH, dans la structure de mCRYM/NADP(H) suggère également une position de la T3 plus enfouie dans le site (Figure 69.B).

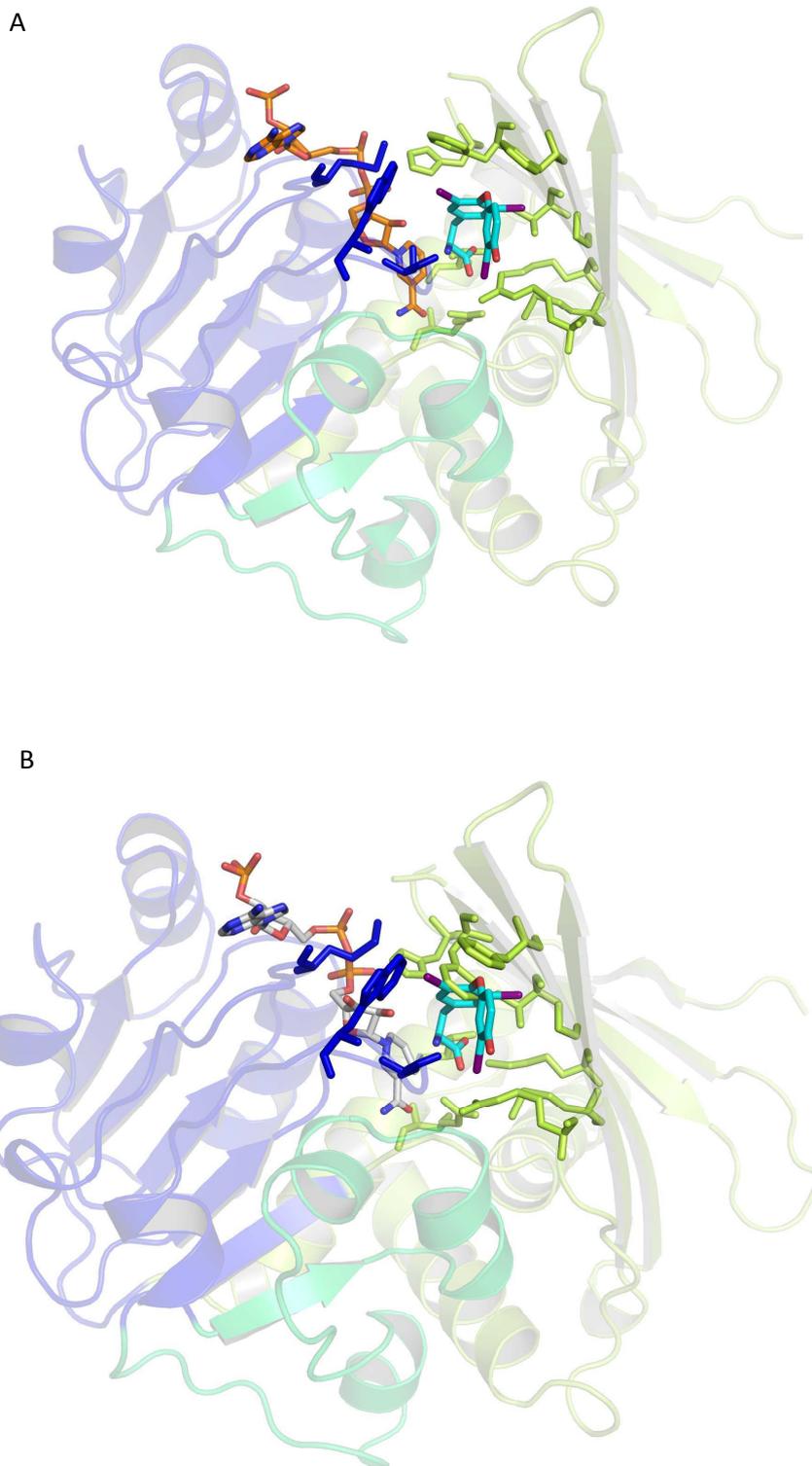


Figure 69 : Représentation du monomère de mCRYM/T3/NADP(H) (A) et de mCRYM/NADP(H) (B) avec les résidus impliqués dans la fixation de la T3 proposés par le modèle de Cheng et collaborateurs (2007) à partir de la structure de hCRYM/NADPH.

A.4.3. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec l'enzyme AfAlaDH

La superposition des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de AfAlaDH/NAD⁺ (Gallagher et al., 2004) montre d'importantes différences (RMSD de 1.4 Å). Au niveau du domaine de fixation du ligand (T3) ou du substrat (Alanine), la majorité des brins β de l'AlaDH qui constituent le feuillet β antiparallèle sont plus longs, sauf les brins β_4 et β_5 , dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), qui sont impliqués dans la fixation de la T3. L'extrémité C-terminale de l'AlaDH possède un brin β supplémentaire (brin β_7), positionné antiparallèlement au brin β_1 localisé à l'extrémité N-terminale. Ce brin β_7 est absent dans la structure de mCRYM et confère à la structure AlaDH un feuillet β antiparallèle avec un brin β supplémentaire que celles de CRYMs.

Pour le domaine de fixation du NAD(P), les brins β de l'AlaDH sont plus longs que ceux de mCRYM. De plus, le domaine $\beta E'-\alpha E''$ de l'AlaDH possède des hélices α et des brins β également plus longs. Dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H), un des résidus de ce domaine (Glu256 de l'hélice αE) est impliqué dans la fixation de la T3. L'implication de ce domaine dans la fixation de la T3 et les différences structurales observées entre mCRYM et l'AfAlaDH pourraient suggérer un rôle de ce domaine dans la fixation du ligand (T3) et du substrat (Alanine). Pourrait-il constituer la spécificité de ces protéines pour leur substrat (Alanine) et ligand (T3) respectif ?

La structure de l'AfAlaDH/NAD⁺ présente une boucle β_4 - β_5 visible dans la structure. Elle possède, de la même manière que les structures de CRYMs, un nombre non négligeable de résidus (plus d'une dizaine) et est également exposée à la surface de la protéine. Par ailleurs, cette boucle ne semble pas aussi flexible dans la structure de l'AfAlaDH/NAD⁺ que celles des structures de mCRYM du fait de sa présence dans la structure de l'AfAlaDH/NAD⁺ (Figure 30.C, dans chapitre 1, introduction, page 80).

Enfin, l'AlaDH ne possède pas d'ion potassium comme c'est le cas pour mCRYM/T3/NADP(H). Par contre, un ion sodium est présent, à une position différente, mais cependant proche, de celle du potassium, dans le domaine de fixation du NAD(H). Cet ion n'a pas été décrit comme

ayant un rôle physiologique pour l'AlaDH (Figure 30.C, dans chapitre 1, introduction, page 80).

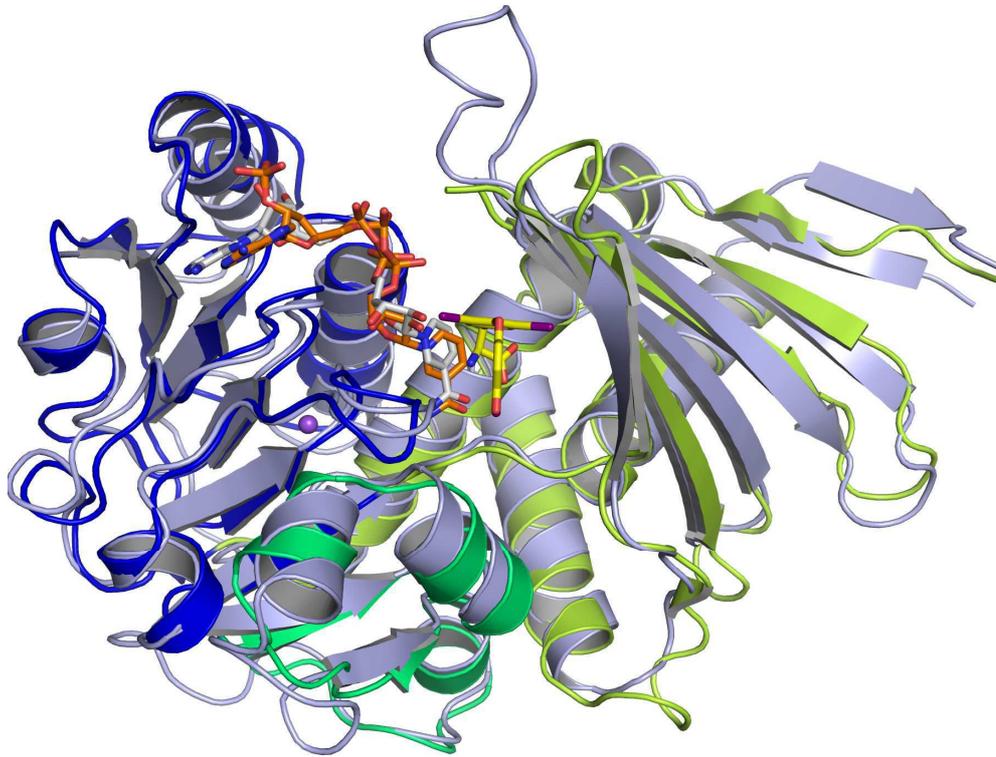


Figure 71 : Représentation des monomères superposés de mCRYM/T3/NADP(H) (en vert citron, le domaine de dimérisation et de fixation de la T3, en bleu, le domaine de fixation du NADP(H), en vert, le domaine $\beta E'-\alpha E''$) et de l'AfAlaDH/NAD⁺ (en bleu clair).

L'analyse du site de fixation de la T3 et de l'alanine (modèle proposé par [Gallagher et al., 2004](#)) montre un positionnement différent des deux molécules dans la poche. La fixation de l'alanine dans la structure de l'AfAlaDH/NAD⁺ est proche du modèle de la fixation de la T3 proposé pour la structure de hCRYM ([Cheng et al., 2007](#)), c'est-à-dire plus enfouit dans le site (Figure 72). Cette position de la T3, proche de l'alanine, n'est pas surprenante car le modèle de fixation de la T3 à hCRYM a été généré en se basant sur le modèle de l'alanine qui lui-même a été généré à partir des données structurales de la structure de l'enzyme *PpOCD/Orn/NADH* qui contient une molécule d'ornithine dans son site actif.

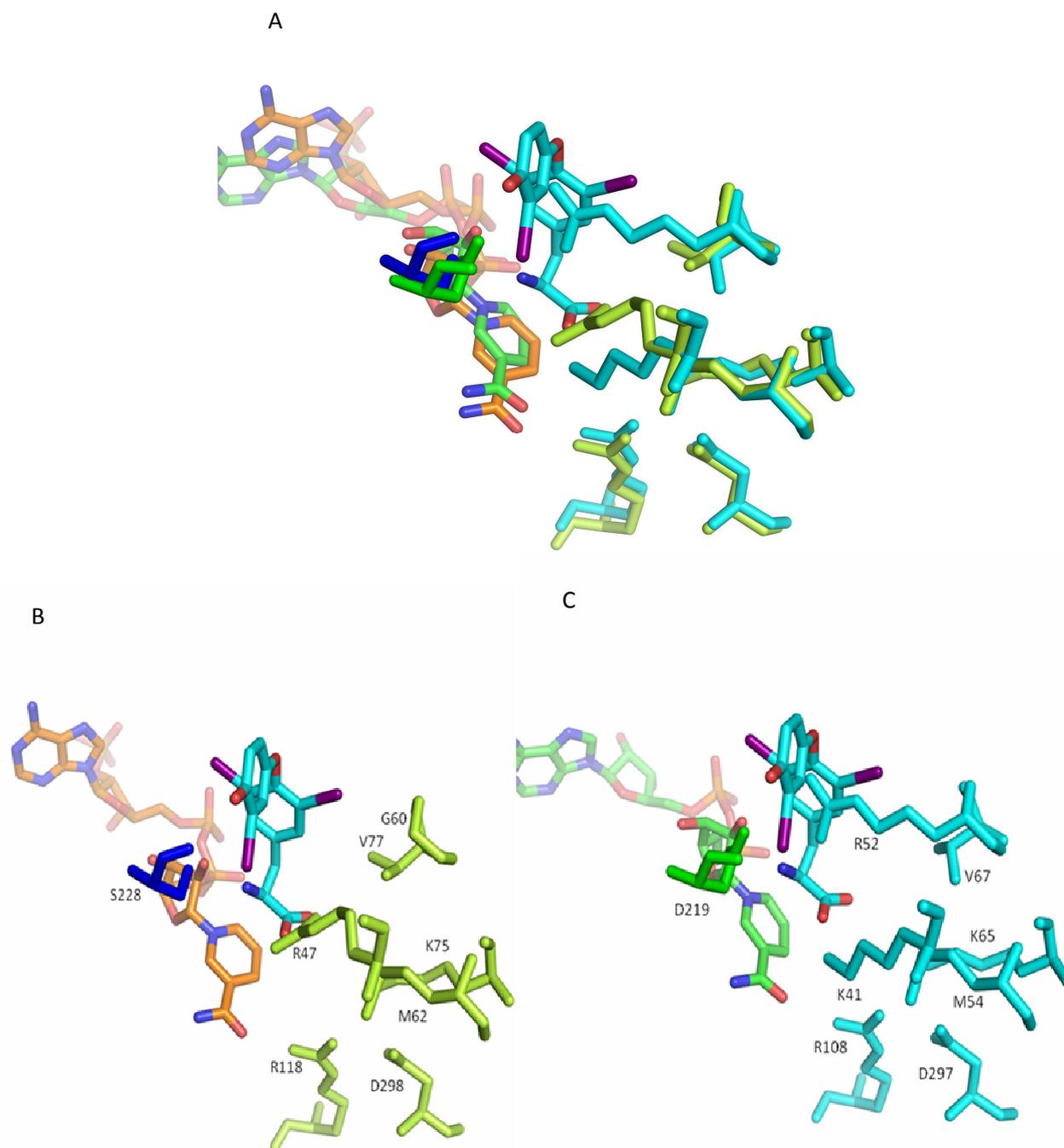
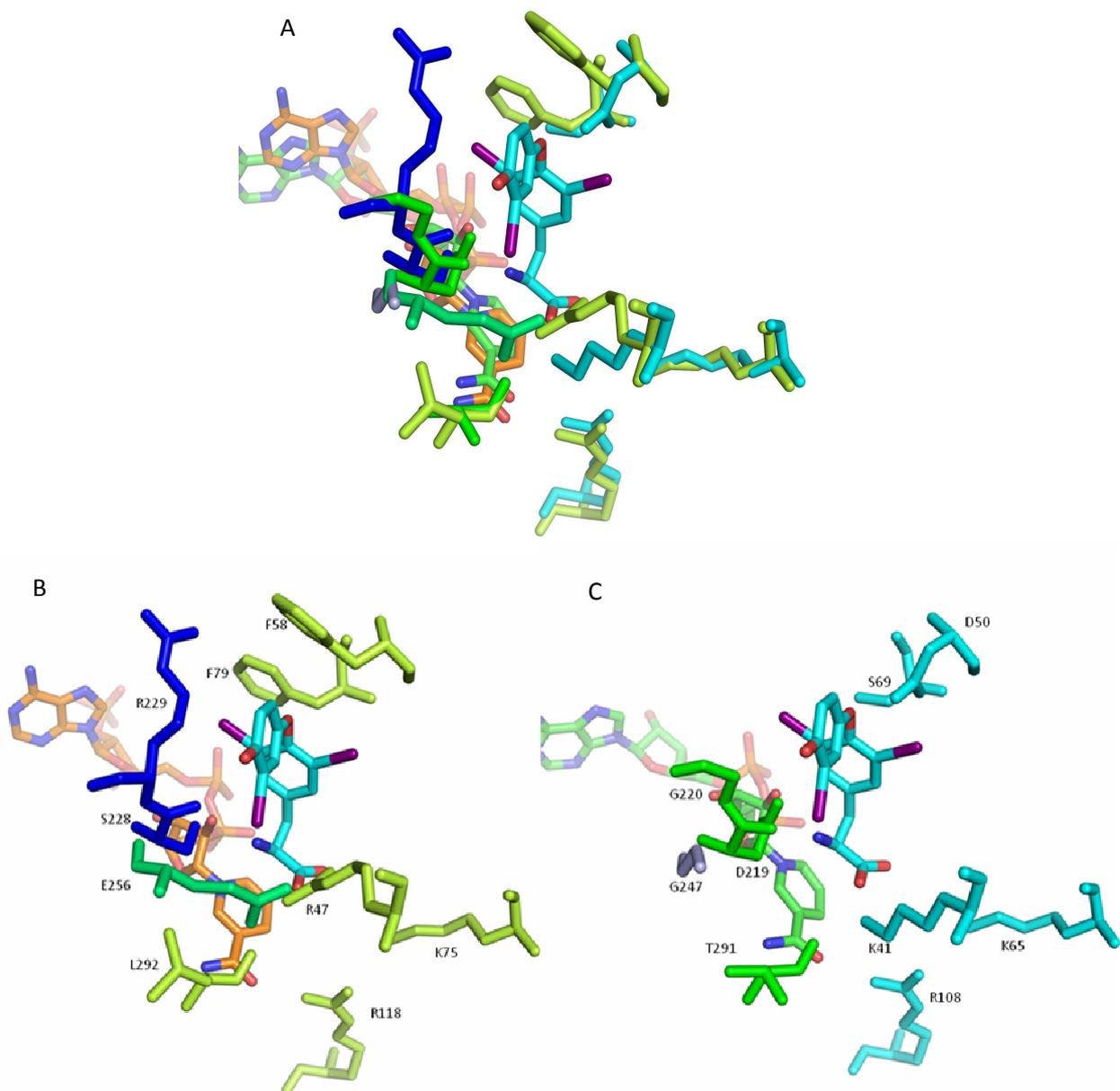


Figure 72 : (A) Superposition des sites de fixation de l'alanine et de la T3 des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de l'*AfAlaDH*/NAD⁺. (B) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de mCRYM correspondant aux résidus du modèle de l'alanine. Représentation de la T3, en cyan, et du NADP(H), en orange, de la structure de mCRYM/T3/NADP(H). (C) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de l'*AfAlaDH*/NAD⁺ correspondant au modèle de l'alanine. Représentation de la T3, en cyan, de la structure de mCRYM/T3/NADP(H) et représentation du NAD⁺, en vert, de la structure de l'*AfAlaDH*/NAD⁺.

Les résidus impliqués dans la fixation de la T3 dans mCRYM/T3/NADP(H) et qui ne le sont pas dans le modèle de fixation de l'alanine sont les résidus Phe58, Phe79 et Leu292 de mCRYM correspondant, respectivement, aux résidus Asp50, Ser69 et Thr291 de l'AlaDH. Les deux premiers résidus aromatiques de mCRYM sont impliqués dans des interactions hydrophobes avec les cycles aromatiques de la T3 et le résidu Leu292 de mCRYM (Thr291 pour l'AlaDH) interagit, par une liaison hydrogène, *via* des molécules d'eau, avec la molécule de T3 (Figure 73). Ces différences sont dues à la nature hydrophobe de la T3 en comparaison avec la nature chimique de l'alanine (absence de cycle aromatique). Ces résidus hydrophobes de mCRYM (Phe58, Phe79) semblent constituer la spécificité de mCRYM pour son ligand, la T3.



l'AlaDH/NAD⁺ correspondant aux résidus impliqués dans la fixation de la T3 (en jaune) dans mCRYM/T3/NADP(H).

Par ailleurs, trois résidus conservés entre les deux séquences (les résidus Met54, Val67 et Asp297 de l'AlaDH correspondant aux résidus Met62, Val77 et Asp298 de mCRYM) sont impliqués dans l'interaction avec l'alanine et ne le sont pas pour la T3. Pourtant, les résidus Met62 et Val77 de CRYM semblent être impliqués dans la fixation de la T3 dans le modèle proposé à partir de la structure de hCRYM/NADPH (Cheng et al, 2007), qui comprend le résidu Gly60 de CRYMs, également impliqués dans la fixation de l'alanine et qui est substitué par le résidu Arg52 dans l'AlaDH.

Malgré la différence de localisation de la T3 et de l'alanine (modèle de fixation de l'alanine présenté en introduction, page 74, Figure 31.A), quatre résidus communs sont impliqués dans la fixation de ces deux molécules. Parmi ces résidus communs, deux sont conservés entre les deux séquences, les résidus Lys65 et Arg108 de l'AlaDH correspondant, respectivement, aux résidus Lys75 et Arg118 dans mCRYM. Les deux autres résidus ne sont pas conservés, les résidus Lys41 et Asp219 de l'AlaDH, sont substitués par les résidus Arg47 et Ser228 dans mCRYM.

Le NADP(H) présent dans la structure de mCRYM est localisé au même endroit que le NAD⁺ présent dans la structure de l'AlaDH. Cependant, la conformation des molécules est différente, due à la nature redox et à la différence chimique qui existe entre les deux dinucléotides (Figure 72.A). En effet, le mécanisme d'action des deux cofacteurs est différent car l'un est accepteur (la forme oxydée NAD⁺, couple redox NAD⁺/NADH, prédominance de la forme oxydée dans la cellule) et l'autre est donneur d'ion hydrure (la forme réduite NADPH, couple redox NADPH/NADP⁺, prédominance de la forme réduite dans la cellule). Cette différence est l'un des arguments qui réfute la possibilité d'une activité alanine déshydrogénase pour mCRYM. Au niveau de l'AlaDH, les résidus spécifiques à la fixation du NAD⁺ et qui par conséquent permettent de discriminer entre le NADPH et le NAD⁺ sont les résidus Asp157 et Val158. A l'opposé, les résidus Arg168 et Asn167 dans la structure de mCRYM permettent de discriminer entre NAD⁺ et le NADPH, en favorisant la fixation de ce dernier. En plus de cette différence au niveau de la nature du couple redox, la structure de mCRYM ne possède pas les deux molécules d'eau impliquées dans l'activité catalytique,

notamment, la molécule d'eau, O503, qui effectue une attaque nucléophile sur le carbone alpha de l'alanine (mécanisme catalytique présenté en introduction, page 74, figure 31.B) ainsi que la substitution des résidus Arg52 et Lys41 de l'AlaDH par les résidus Gly60 et Arg47 dans mCRYM. Le résidu Arg47 de mCRYM pourrait avoir le même rôle que le résidu Lys41, par leur nature basique commune. Cependant, le résidu Gly60 n'est pas capable de substituer le rôle du résidu Arg52 de l'AlaDH, qui semble important dans la stabilisation de ces deux molécules d'eau dans le site actif. Ces observations structurales confortent l'absence d'activité alanine déshydrogénase observée pour hCRYM (Schroder et al., 2004).

A.4.4. Comparaison de mCRYM/T3/NADP(H) avec l'enzyme PpOCD

La superposition des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de PpOCD/Orn/NADH (Goodman et al., 2004) met en évidence un écart important entre les deux structures (RMSD de 1.8 Å), plus important que celui observé avec l'AfAlaDH/NAD⁺ (RMSD de 1.4 Å).

Le domaine de dimérisation et de fixation du substrat ornithine de l'enzyme PpOCD présente des structures secondaires supplémentaires en comparaison aux protéines CRYMs et AfAlaDH. Cette différence est principalement présente au niveau de l'extension C-terminale de l'OCD comprenant le brin β 7 et l'hélice α 6 (Figure 27, chapitre 1, introduction, page 75). Le brin β 7 interagit avec le brin β 1 localisé à l'extrémité N-terminale du même monomère et permet, comme observé pour l'AlaDH, une extension du feuillet β antiparallèle. De plus, une hélice α 6 est uniquement présente pour l'enzyme PpOCD à l'extrémité C-terminale et s'étend jusqu'au domaine de fixation de l'ornithine de l'autre monomère privilégiant ainsi d'une bonne proximité avec le site de fixation du NAD(H) (Figure 74). Cette proximité permet au résidu Lys 331, localisé entre le brin β 7 et l'hélice α 6, d'interagir avec le NAD(H). Cette extension C-terminale, notamment l'hélice α 6 (unique à l'enzyme PpOCD), a été proposé par Goodman et collaborateurs (2004) comme un sous-domaine responsable de la spécificité pour le substrat ornithine, en permettant au NAD⁺ de reconnaître la séquence de l'OCD par rapport à celle de l'AlaDH et des autres protéines membre de la famille des μ -crystallines/OCDs. Cette hypothèse est confortée par les spécificités observées au niveau des structures secondaires des extrémités C-terminales de chacune de ces quatre protéines (CRYMs, AlaDH et OCD). Elle peut-être vérifiée en tronquant ces parties C-terminale caractéristiques de ces protéines et de tester la fixation des substrats (alanine et ornithine)

ou ligand (T3) sur ces protéines tronquées, *versus*, les protéines non tronquées. Par ailleurs, aucune donnée actuelle ne semble favorable à une fixation de ces substrats et ligand aux autres protéines, qui semblent chacune spécifique à son substrat/ligand.

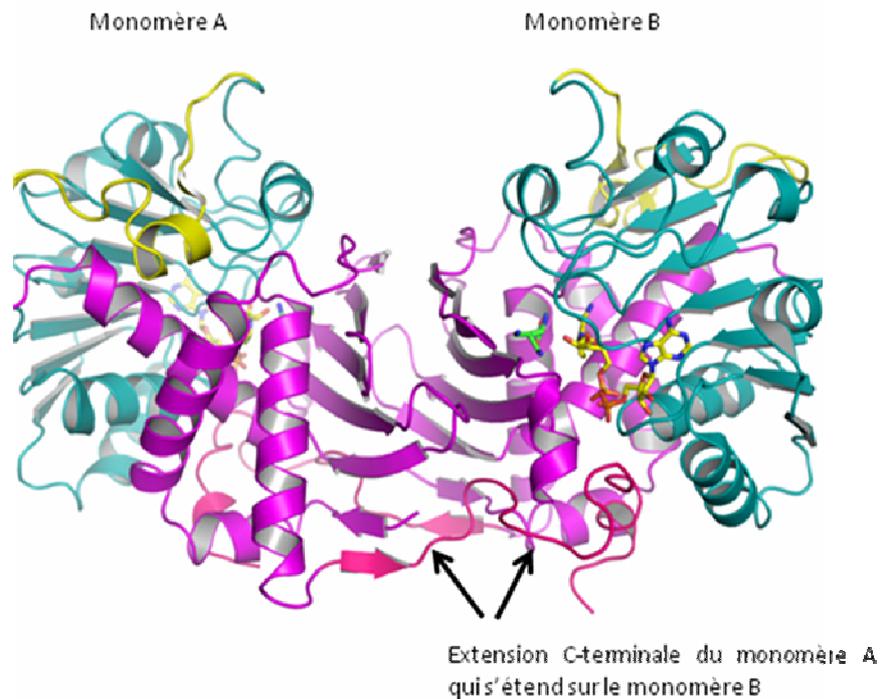


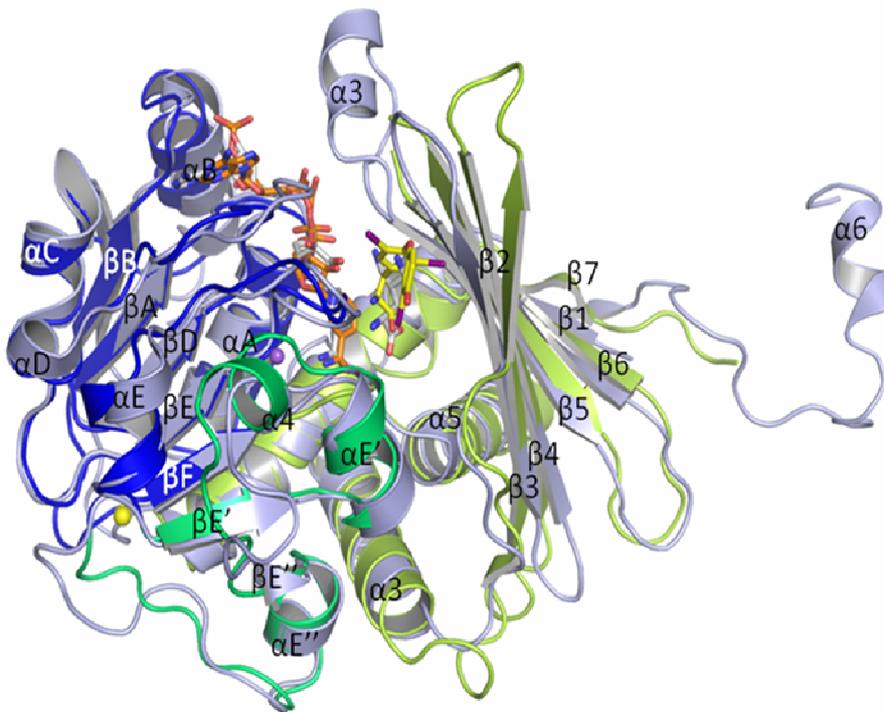
Figure 74 : Structure du dimère de l'enzyme *PpOCD* complexée avec le NADH (en jaune) et l'ornithine (en vert), l'atome de sodium est représenté par une sphère (en pourpre).

Par ailleurs, les feuillet β antiparallèles, des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de la *PpOCD*/Orn/NADH, ont une conformation différente, en particulier les brins β_2 , β_3 , β_4 , β_5 . Dans la structure de mCRYM, le feuillet β antiparallèle est plus orienté vers l'interface de dimérisation, ce qui confère un plus grand volume au site de fixation pour la T3 étant donné sa masse plus importante que celle de l'ornithine. De plus, entre les brins β_4 et β_5 , là où aucune densité électronique n'a été détectée pour la structure de mCRYM, une hélice (α_3) est présente dans la structure de l'OCD. Cette hélice ne semble pas impliquée dans la fixation de l'ornithine car elle en est très éloignée. Par ailleurs, elle est exposée à la surface

de la cellule et pourrait donc être impliquée dans l'interaction de l'OCD avec ses partenaires cellulaires.

Au niveau du domaine de fixation du NAD^+ , l'OCD possède un domaine de Rossmann plus caractéristique de l'organisation connue pour ce domaine comparé à celui des protéines CRYMs et *AfAlaDH*, par la parfaite alternance des brins β et des hélices α . Aussi, le domaine $\beta\text{E}'\text{-}\alpha\text{E}''$ de l'OCD présente d'importants changements de conformation que ceux de CRYMs et *AfAlaDH*, dus à l'absence d'une hélice α (correspondant à l'hélice $\alpha\text{E}''$ de CRYMs et de l'*AfAlaDH*). Notons la différence de numérotation entre les structures secondaires des domaines $\beta\text{E}'\text{-}\alpha\text{E}''$ entre l'OCD et mCRYM par la présence d'une hélice αE supplémentaire dans le domaine de Rossmann de l'OCD, cf. Figure 74 pour l'OCD et Figure 53 pour mCRYM). Ce domaine $\beta\text{E}'\text{-}\alpha\text{E}''$ de l'OCD, se superpose assez bien à celui de mCRYM et présente une organisation générale similaire avec une proportion de structures non ordonnées légèrement plus importante due à l'absence d'une hélice α pour l'OCD.

A



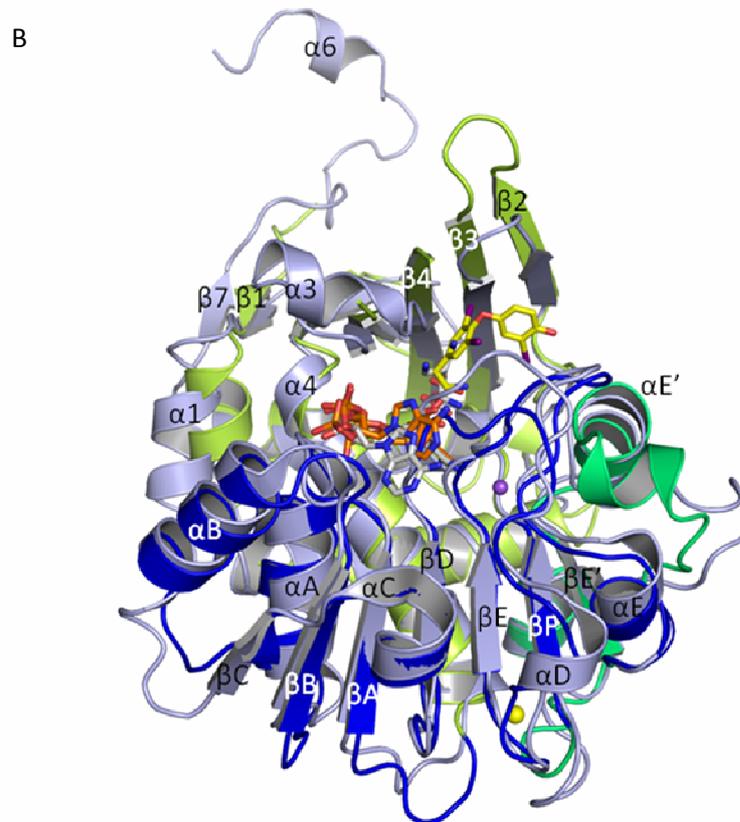


Figure 75 : (A) Superposition des monomères des structures de mCRYM/T3/NADP(H) et de *PpOCD/Orn/NADH*. Représentation des monomères superposés de mCRYM/T3/NADP(H) (en vert citron, le domaine de dimérisation et de fixation de la T3, en bleu, le domaine de fixation du NADP(H), en vert, le domaine $\beta E'-\beta E''$) et *PpOCD/Orn/NADH* (en bleu clair). (B) rotation de 90° de la figure A. La numérotation des structures secondaires reprend celle de l'OCD.

Un ion sodium est également présent dans chaque monomère de la structure de l'OCD. Il est surprenant de constater que cet ion sodium est situé au même endroit que l'ion sodium observé dans la structure de l'*AfAlaDH* (à proximité des extrémités C-terminales des brins βE et βF du domaine de Rossmann). Est-ce une coïncidence ou est-ce que ces protéines possèdent un site physiologique à ion monovalent ? Aucune information n'est disponible à ce sujet dans la littérature. Cette observation est intéressante pour le site à potassium observé dans la structure de mCRYM/T3/NADP(H). Cet ion n'est pas situé au même endroit que les ions sodiums de l'OCD et de l'*AlaDH* mais sa localisation, au niveau des extrémités N-terminales des mêmes brins, le situe dans une zone assez proche de celles des ions sodiums.

Les résidus impliqués dans l'interaction de l'ornithine sont seulement cinq (Arg45, Glu56, Lys69, Arg112, Asp228), (Figure 76.B) et se situent, pour la plupart, dans le domaine de dimérisation et de fixation de l'ornithine à l'exception du résidu Asp228 qui appartient au domaine de fixation du NAD(H). Ces résidus correspondent, respectivement, aux résidus Arg47, Gly60, Lys75, Arg118, Ser228 de mCRYM (Figure 76.C). On note sur ces cinq résidus, deux résidus Glu56 et Asp228 de l'OCD, qui sont substitués par les résidus Gly60 et Ser228 dans mCRYM. Cependant, les trois autres résidus, Arg45, Glu56 et Lys69, sont conservés.

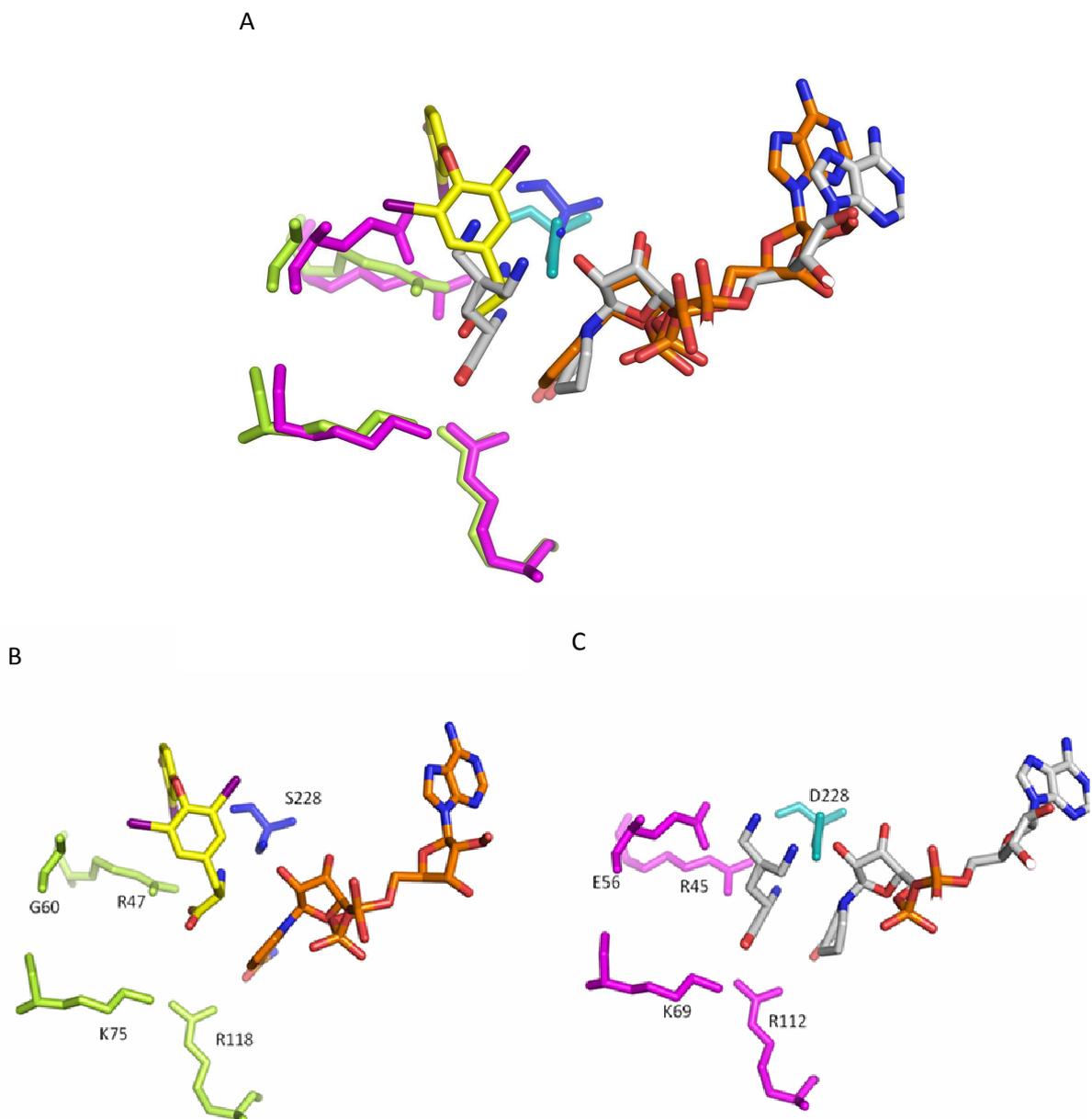
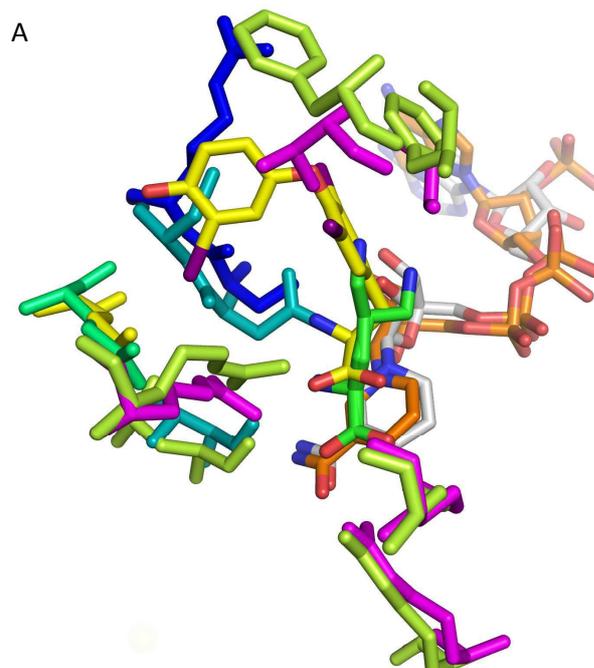


Figure 76 : (A) Superposition des sites de fixation de l'ornithine et de la T3 des structures de mCRYM/T3/NADP(H) (NADP(H) en orange) et de la *PpOCD/Orn/NADH* (NADH en gris). (B) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de mCRYM correspondant aux résidus impliqués dans l'interaction avec l'ornithine, représentation de la T3 dans le site (en cyan). (C) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de la *PpOCD/Orn/NADH* impliqués dans l'interaction avec l'ornithine (en gris).

La comparaison des résidus impliqués dans la fixation de l'ornithine et de la T3 montre quatre résidus communs à ces interactions, Arg45, Lys69, Arg112 et Asp228 de l'OCD, correspondant, respectivement, aux résidus Arg47, Arg75, Arg118 et Ser228 dans mCRYM (Cf. Figure 24, chapitre 1 introduction, page 70). Malgré l'implication de quatre résidus sur les cinq résidus de l'OCD dans la fixation de la T3 (Figure 77), le positionnement de ces deux molécules dans le site est différent. De plus, les résidus catalytiques de l'OCD, impliqués dans le transfert de l'ion hydrure, les résidus Asp228 et Glu56, ne sont pas conservés dans la structure de mCRYM et confirment l'absence d'activité de cyclodésaminase pour cette protéine. Ces observations structurales confortent les essais enzymatiques qui ont été effectués sur l'homologue de CRYM, la μ -crystalline de kangourou (86% d'homologie avec mCRYM et hCRYM) et qui révèle l'absence d'activité de cyclodésaminase pour cette μ -crystalline (Kim et al., 1992). En définitive, la famille des μ -crystallines ne correspondent pas aux enzymes OCDs d'où la nomination de la superfamille μ -crystallines/OCDs.



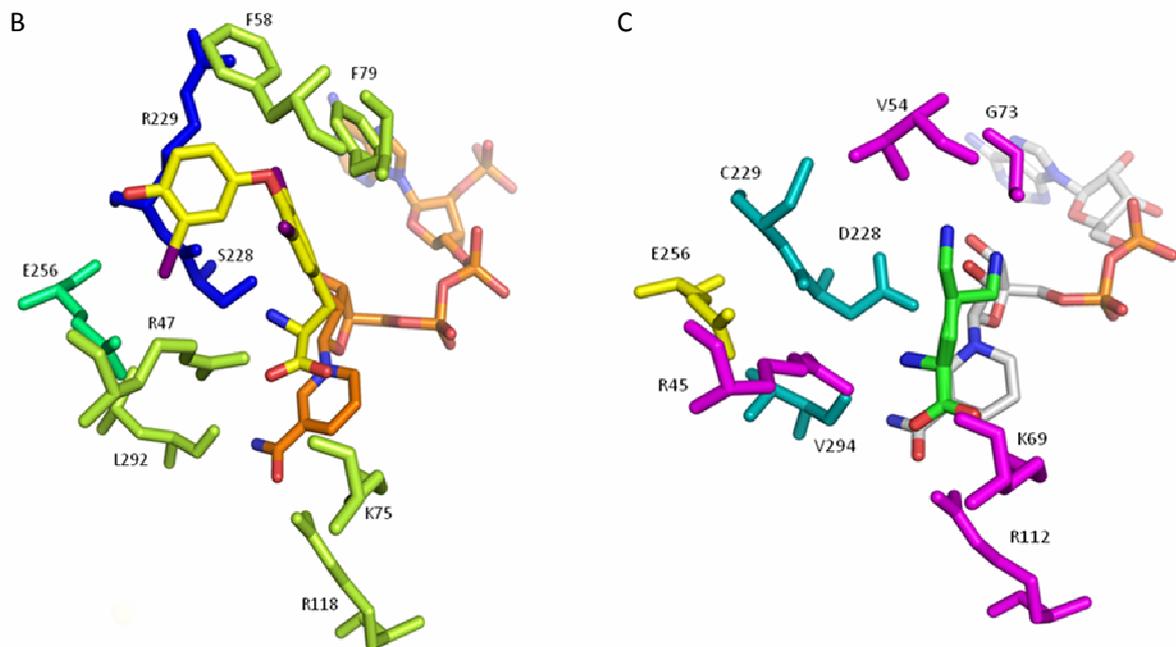


Figure 77 : (A) Superposition des sites de fixation de l'ornithine et de la T3 des structures de mCRYM/T3/NADP(H) (NADP(H) en orange) et de la *PpOCD/Orn/NADH* (NADH en gris). (B) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de mCRYM impliqués dans l'interaction avec la T3 (en jaune). (C) Représentation des résidus (code couleur par domaine) de la *PpOCD/Orn/NADH* correspondant aux résidus impliqués dans l'interaction avec la T3, représentation de l'ornithine dans le site (en vert).

B. CONCLUSION

B.1. Présence de NADPH ou de NADP⁺ dans les structures des complexes mCRYM ?

Avant de répondre à cette question, un tableau récapitulatif des données structurales est présenté ci-dessous. Il présente les arguments en faveur d'un complexe mCRYM/T3/NADP⁺ et ceux en faveur d'un complexe mCRYM/NADPH.

B.1.1. Tableau de synthèse des données structurales

Arguments pour la forme mCRYM/T3 complexée à la forme oxydée NADP⁺	Arguments pour la forme mCRYM complexée à la forme réduite NADPH
Fixation de faible affinité de la T3 (peu de liaisons chimiques avec les neuf résidus de mCRYM, occupation non totale dans la structure, difficulté d'obtention de la forme complexée à la T3)	La conformation du site de la T3 dans ce complexe permet une position de la T3 plus enfouit, proche du modèle de fixation de la T3 proposé pour hCRYM.
Conformation fermée par rapport à mCRYM apo et plus ouverte que mCRYM/NADPH, ce qui suggère que le NADP ⁺ est capable d'induire un changement de conformation en faveur de la fixation de la T3	Conformation du site de la T3 pour mCRYM/NADPH et hCRYM/NADPH identique, conformation fermée. Le NADPH seul est donc capable d'induire la conformation fermée plus favorable à une fixation de forte affinité de la T3
Répartition des charges en faveur d'une conformation ouverte du site de la T3 et du NADP(H), la protéine mCRYM adopte une répartition de charge dite « relâchée »	Répartition des charges en faveur d'une conformation fermée du site de T3 et du NADP(H), la protéine mCRYM adopte une répartition de charge dite « rétractée »
Conformation qui semble plus planaire du cycle nicotinamide comparée à celle de la structure de mCRYM/NADPH et hCRYM/NADPH	Conformation qui semble non planaire du cycle nicotinamide de mCRYM et similaire de celui de hCRYM/NADPH

B.1.2. Présence du complexe mCRYM/T3/NADP⁺ et du complexe mCRYM/NADPH

Toutes ces données structurales sont favorables pour suggérer la présence d'un complexe mCRYM/T3 avec la forme NADP⁺ et d'un complexe mCRYM avec la forme réduite NADPH. Si l'hypothèse est vraie, comment s'est effectuée la conversion du NADPH en NADP⁺ dans la structure de mCRYM/T3/NADP⁺? En sachant, que les mêmes essais de co-cristallisation que j'ai effectué en présence de la forme oxydée NADP⁺, n'ont pas permis la fixation de la T3.

Par ailleurs, malgré la proximité entre la T3 et le NADP^+ , aucune donnée structurale n'a pu être extraite et qui irait dans le sens d'un mécanisme enzymatique conduit par la protéine mCRYM. En effet, la distance entre la T3 et le NADP^+ ne permet pas d'établir de liaisons chimiques (distance supérieure à 4 Å) entre les deux molécules et aucun résidu de mCRYM ou molécule d'eau, dans cette structure, ne permettent de former un pont pour permettre une liaison possible entre la T3 et le NADP^+ . De plus, les cristaux ont été obtenus à partir d'une solution de NADPH, par conséquent, la conversion aurait-elle pu se dérouler avant ou bien pendant la soumission du cristal aux rayons X ? L'utilisation de la propriété d'absorption du couple NADPH/ NADP^+ peut nous permettre de répondre à cette question. En effet, la forme oxydée NADP^+ absorbe uniquement à 260 nm alors que la forme réduite absorbe à cette même longueur d'onde (due au groupement adénine, identique pour les deux formes) mais aussi à 340 nm, due à l'absorption du groupement nicotinamide du NADPH. Cette absorption spécifique du NADPH à 340 nm permet de différencier son absorbance de celle du NADP^+ . L'utilisation de la spectrométrie d'absorbance sur cristaux, réalisable grâce au Cryobench (technique disponible à l'IBS) permettrait de mesurer l'absorbance directement sur le cristal avant, pendant et après irradiation aux rayons X, ce qui permettrait de détecter le moment où la conversion aurait lieu. Par ailleurs, il est possible que cette conversion se soit déroulée dans la goutte et dans ce cas, le cristal contient déjà la forme oxydée NADP^+ .

Malgré cette interrogation, ces données permettent de suggérer un modèle de régulation de la T3 par la protéine mCRYM qui semble différent des autres modèles déjà proposés pour les autres CTBPs. Rappelons la diversité de ces protéines notamment par la présence de différents mécanismes de régulations de la concentration de T3 libre dans la cellule par ces CTBPs (présentés en introduction page 25). Notre protéine mCRYM dévoile des propriétés de fixation de la T3, qui semblent différer des autres CTBPs. En effet, elle serait capable de fixer la T3 en présence de NADP^+ alors que la majorité des CTBPs décrites ne semblent pas pouvoir fixer la T3 en présence de cette forme oxydée, sauf, dans des conditions bien particulières. En effet, Hashizume et collaborateurs (1989) ont montré qu'une CTBP, nommée CTBP 4,7S (PM de 58 kDa, non homologue à mCRYM), est capable de fixer la T3 en présence de NADP^+ et de conditions contenant du DTT. Cela voudrait dire que le DTT, par son action réductrice sur les ponts disulfures, provoque l'effet inverse que celui observé avec le NADP^+ (car la même expérience sans DTT conduit à une absence de fixation). La protéine

mCRYM contient trois cystéines qui sont localisées au niveau du domaine de Rossmann (Cys 139 et Cys187) et une cystéine au niveau du domaine $\beta E'-\alpha E''$ (Cys283). Les cystéines du domaine de Rossmann semblent assez proches pour former un pont disulfure (distance entre les deux cystéines de 6,7 Å).

La réduction de ce pont aurait-elle une influence sur la conformation de ce domaine qui aurait pour conséquence de modifier l'effet physiologique du $NADP^+$? Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour répondre à cette question.

En définitive, la protéine mCRYM semble fixer la T3 avec une affinité très modérée en présence de $NADP^+$. Les observations structurales du complexe mCRYM/NADPH suggèrent une affinité augmentée avec cette forme réduite NADPH. Cependant, la conformation fermée du site suggère une fixation préalable de la T3, sans quoi, une fois le NADPH fixé, la T3 ne peut plus accéder au site de mCRYM complexée au NADPH. Si cela est vrai, la protéine mCRYM devrait fixer la T3 avant la NADPH. Par ailleurs, aucune CTBP connue pour le moment n'est capable de fixer la T3 en absence de NADPH. Les mesures d'affinité de la T3 pour la protéine mCRYM par ITC et l'influence des cofacteurs NADPH et $NADP^+$ sur cette affinité devraient nous permettre d'élucider ce dilemme.

B.2. Spécificité du domaine de fixation du NAD(P) des μ -crystallines/OCDs/AfAlaDH

La comparaison des structures de mCRYM, AfAlaDH/ NAD^+ et PpOCD/Orn/ $NADH$ ont permis de mettre en avant des observations très intéressantes quant à la spécificité du domaine de fixation du NAD(P)(H). Toutes les protéines de cette famille présente un domaine de Rossmann caractéristique. Cependant, les domaines de ces protéines comportent des particularités qui semblent spécifique à la superfamille des μ -crystallines/OCDs/AfAlaDH. Tout d'abord, ce domaine ne présente pas une organisation stricte du domaine de Rossmann par l'alternance des brins β et des hélices α , notamment pour les protéines CRYMs et AfAlaDH, ce qui n'empêche pas de conserver sa fonction. Aussi, le domaine est interrompu par un sous-domaine, le domaine $\beta E'-\alpha E''$ qui présente une homologie de 20% entre ces protéines. Par ailleurs, les données structurales semblent suggérer des spécificités propres à chaque protéine. La structure de mCRYM/T3/ $NADP^+$ a mis en évidence l'implication du

résidu Glu256 de ce domaine (localisé au niveau de l'hélice αE de mCRYM) dans la fixation de la T3. Les observations structurales semblent suggérer un rôle possible de ce domaine dans la fixation du ligand/substrat de ces protéines, même si aucun résidu du domaine de l'OCD n'est impliqué dans la fixation du substrat. Cependant, l'hélice $\alpha E'$ du domaine de l'OCD (correspondant à l'hélice αE de mCRYM) interagit avec le brin $\beta 2$ qui, ce dernier, chevauche de nombreux résidus impliqués dans le site actif de l'OCD. Ces observations suggèrent davantage un rôle important de ce domaine dans la fixation des substrats (ornithine et alanine) ou ligand (T3) de ces protéines. Afin de vérifier cette hypothèse, une mutation ponctuelle du résidu Glu256 de mCRYM permettrait de comprendre l'influence de ce domaine sur la fixation de la T3.

D'autre part, il est surprenant qu'aucune protéine ne soit capable de fixer le substrat ou le ligand d'une autre alors que la conformation des sites de fixations des substrats et ligand est sensiblement similaire. Aucune étude détaillée n'a permis de mettre en évidence ce genre de fixations croisées. Chacune de ces protéines possèdent donc une signature qui lui ait spécifique, lui permettant de fixer son propre ligand ou substrat. Les observations structurales au niveau des sites de fixations des substrats (ornithine et alanine) et ligand (T3) révèlent de nombreux résidus non conservés, entre ces protéines, qui pourraient être à l'origine de cette spécificité. Il serait cependant intéressant de vérifier si la protéine mCRYM est capable de fixer d'autres ligands que la T3. Il est connu que mCRYM est capable de fixer la forme inactive de la T4, avec une affinité plus faible que la T3. Les essais de co-cristallisation avec la T4 n'ont pas permis l'obtention de cristaux en sa présence. Par ailleurs, on pourrait imaginer que la protéine mCRYM, par son expression sélective dans la région striatale, pourrait fixer des molécules, autre que la T3, caractéristique de cette région cérébrale.

B.3. Interaction avec des partenaires physiologiques : la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ et l'extrémité C-terminale

Les observations structurales, de la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ et de l'extrémité C-terminale des protéines CRYMs, AlaDH et OCDs suggèrent un rôle possible de ces structures dans l'interaction de ces protéines avec leur partenaire physiologique. Dans la structure de mCRYM, la lysine à l'extrémité C-terminale et l'effet de sa mutation K314T dans hCRYM suggère fortement un

rôle possible de cette extrémité dans l'interaction avec des partenaires de CRYMs. Cette mutation pourrait provoquer une modification de l'intéactome de CRYM qui aurait une influence sur l'affinité du NADPH et par conséquent sur l'affinité de la T3, qui est diminuée. De plus, toutes les extrémités C-terminales des quatre protéines sont exposées à la surface des protéines et chacune présente une extrémité différente qui semble d'autant suggérer une signature spécifique à chaque protéine qui pourrait constituer un motif de reconnaissance par des partenaires spécifiques de chaque protéine.

Par ailleurs, les observations structurales pour la boucle β 4- β 5 tendent vers la même conclusion. La boucle des protéines CRYMs est flexible avec une flexibilité plus importante pour mCRYM, due à l'absence de cette boucle dans la structure. Celle de l'AlaDH semble moins flexible et est autant exposée à la surface de la protéine que celle de hCRYM. Enfin, la protéine OCD possède une hélice entre les brins β 4 et β 5. La présence d'une structure secondaire pour l'OCD au niveau d'une séquence d'une dizaine d'acides aminés (avec deux résidus homologues pour les quatre protéines) pourrait suggérer un rôle physiologique de cette structure secondaire.

Toutes ces observations méritent de plus amples investigations par l'exploration de l'intéactome de CRYM. Très peu de données pour ne pas dire aucune décrivent les partenaires de CRYM. La connaissance de ses partenaires nous permettrait, sans doute, d'en savoir un peu plus sur la fonction physiologique de CRYM.

B.4. Site à ions monovalents : physiologiques ou artefacts cristallographiques ?

Enfin, les trois structures mCRYM, AfAlaDH et PpOCD présentent un site à ions monovalents par monomères. Le dimère de mCRYM possède deux sites à potassium alors que les dimères de l'AlaDH et de l'OCD possèdent deux sites à sodium et qui sont, d'une façon aléatoire ou non aléatoire, localisés au même endroit pour les deux protéines. L'implication de l'AlaDH et de l'OCD dans la régulation d'ions monovalents n'a jamais été décrite. Quant à la protéine CRYM, par sa fonction de CTBP, un lien avec le potassium pourrait être envisageable. Cependant, le niveau actuel de connaissance, ne permet pas d'affirmer un rôle physiologique de ce site à potassium. Des investigations plus poussées, notamment, par l'exploration des partenaires de CRYM permettraient d'envisager un rôle de CRYM dans

l'homéostasie du potassium. Une stratégie, *in vitro*, pourrait apporter des informations sur ce site à potassium par l'analyse de la thermostabilité de mCRYM en présence et en absence d'ions potassium par la technique de Thermal Shift Assay (TSA). Le principe de la technique repose sur l'analyse de la thermostabilité d'une protéine (par la mesure de la température de fusion T_m pour *Melting Temperature*) qui est déterminée en fonction de la mesure de fluorescence d'un fluorochrome (par exemple Sypro-Orange), ajouté à la solution de protéine, et qui a la propriété de se fixer sur les régions hydrophobes accessibles des protéines. Par conséquent, la mesure de fluorescence est proportionnelle aux régions hydrophobes accessibles qui témoignent de l'état de dénaturation des protéines.

Chapitre 4

Etude thermodynamique de la fixation de la T3

A. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des expériences d'ITC, qui suivent, sont illustrés sous forme de graphiques et de tableaux récapitulatifs des données thermodynamiques.

Chaque expérience comporte deux graphiques, le graphique de dessus présente les pics de chaleur dégagée en fonction du temps (exprimée en $\mu\text{cal/sec}$), lors des 30 injections de ligand (T3) ou de cofacteur (NADPH ou NADP^+), contenus dans la seringue de l'ITC. Ce graphique est constitué de deux courbes : la courbe en noir correspond à l'expérience, en présence de protéines, appelée « expérience de titration de la protéine avec le ligand » et la courbe en rouge (située, sur le même graphique, au-dessus de la courbe de titration de la protéine) correspond à l'expérience, en absence de protéine, qui mesure le dégagement de chaleur dû à la dilution du ligand. Elle est appelée « expérience de dilution du ligand ».

Les données expérimentales, après correction et normalisation en fonction de la concentration de ligand, sont présentées sur le graphique de dessous (indiquées par des carrés noirs). Ces données sont ajustées par analyse de ces données avec un modèle correspond à « une classe de site de fixation ». Les données théoriques qui en résultent sont représentées par la ligne continue (en rouge).

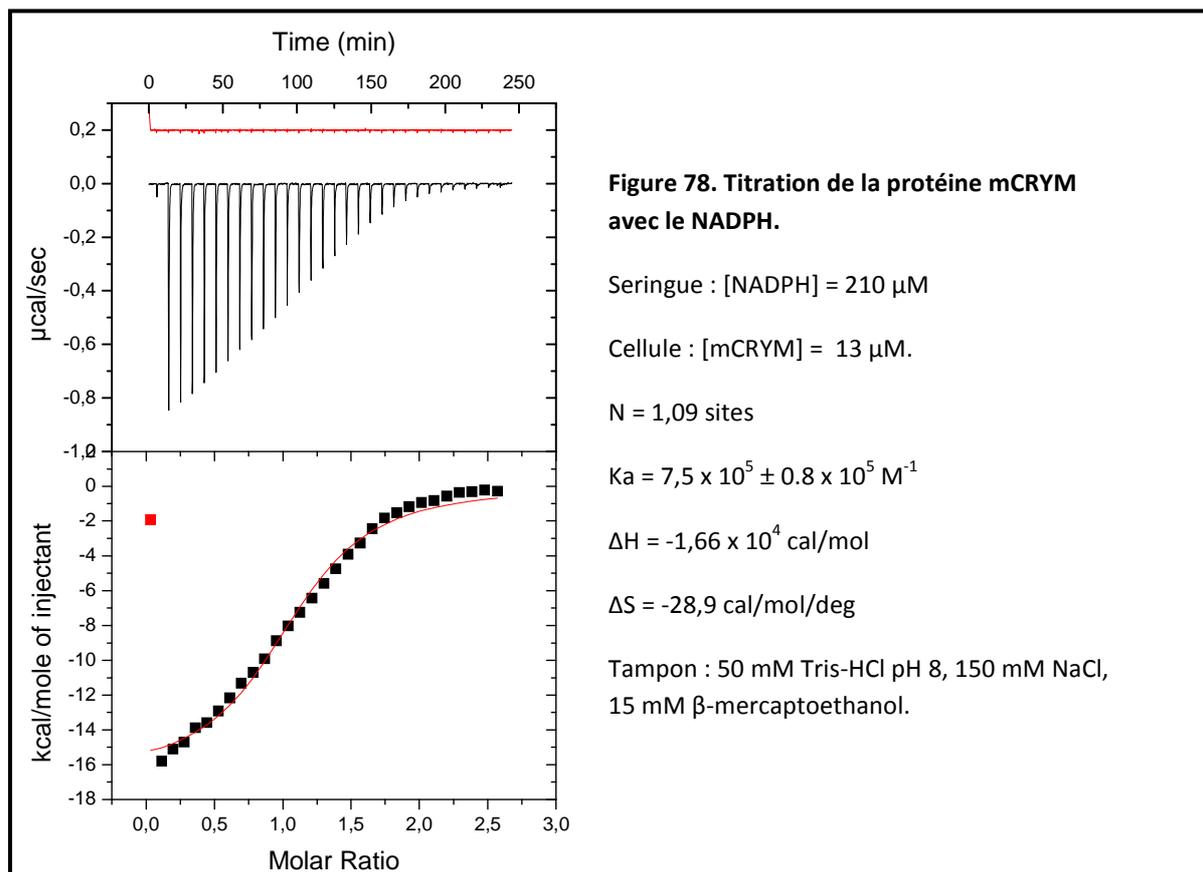
A.1. Caractérisation thermodynamique de la fixation du NADPH et du NADP^+ sur mCRYM

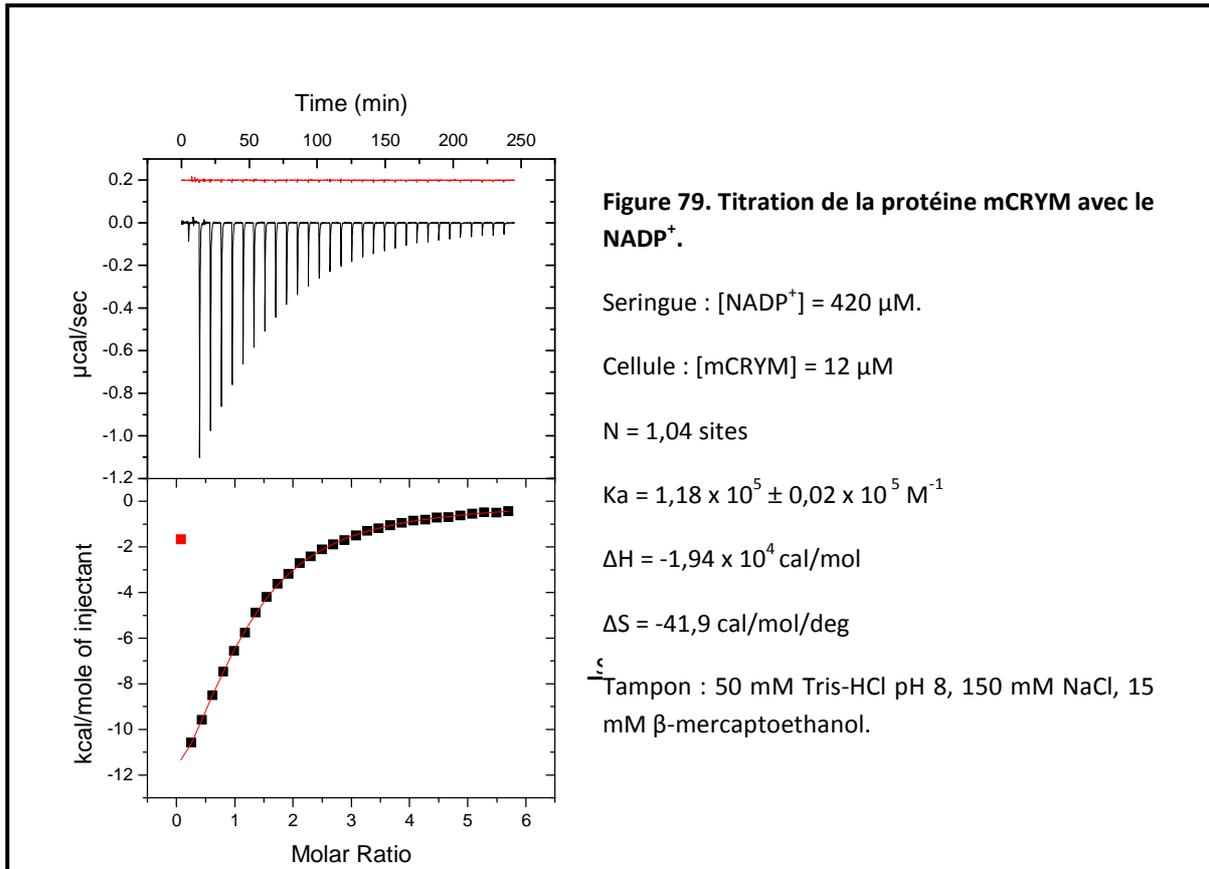
A.1.1. Condition en présence de sels et à pH 8,0

Les deux cofacteurs, dans les conditions de tampon suivantes : 50 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl et 15 mM de β -Mercaptoethanol, se fixent à la protéine mCRYM en absence de T3 (Figure 78 et 79) avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire. Le NADPH semble avoir une constante d'affinité K_a pour la protéine mCRYM significativement plus élevée ($0,75 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) que celle du NADP^+ ($0,12 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

Ces conditions de tampon n'ont pas permis de poursuivre la caractérisation thermodynamique de la fixation de la T3 du fait de sa faible solubilité. Par conséquent, d'autres conditions plus favorables à sa solubilisation ont été recherchées (détaillées dans la

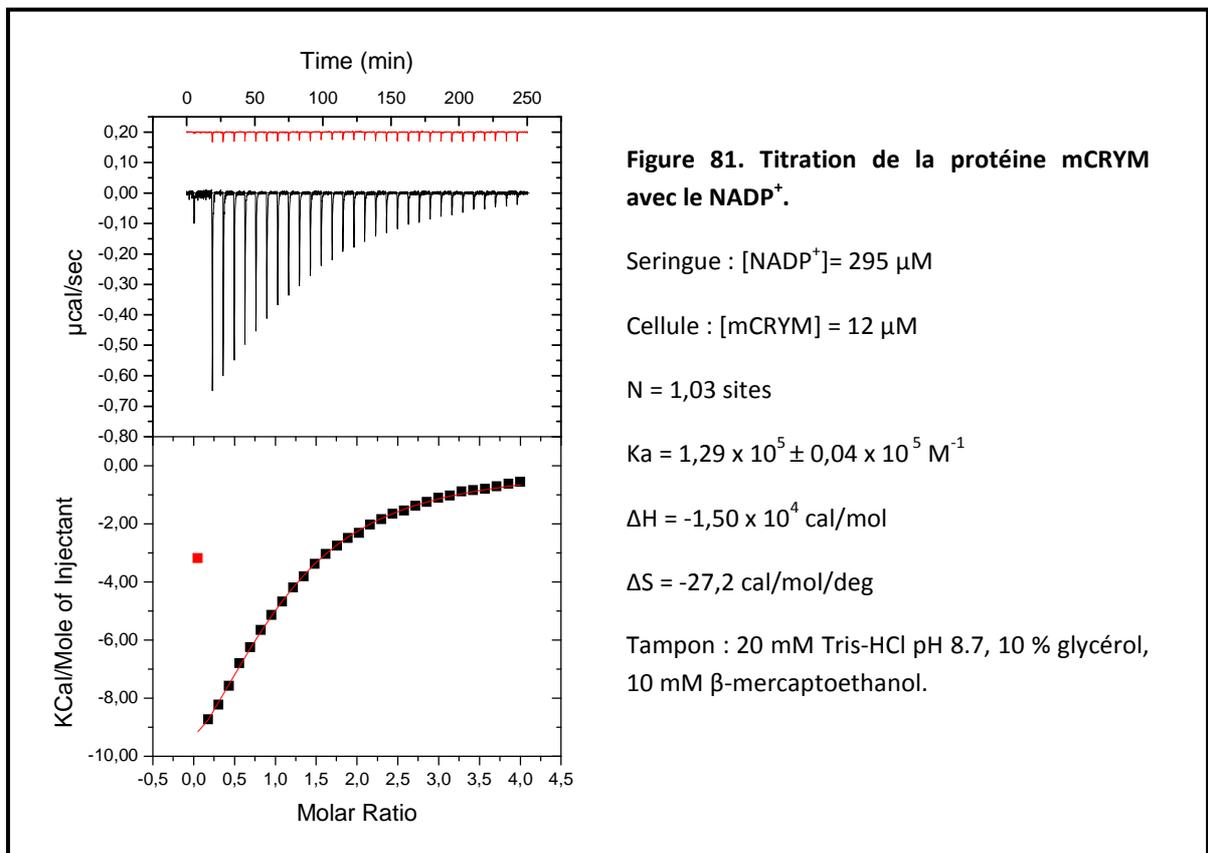
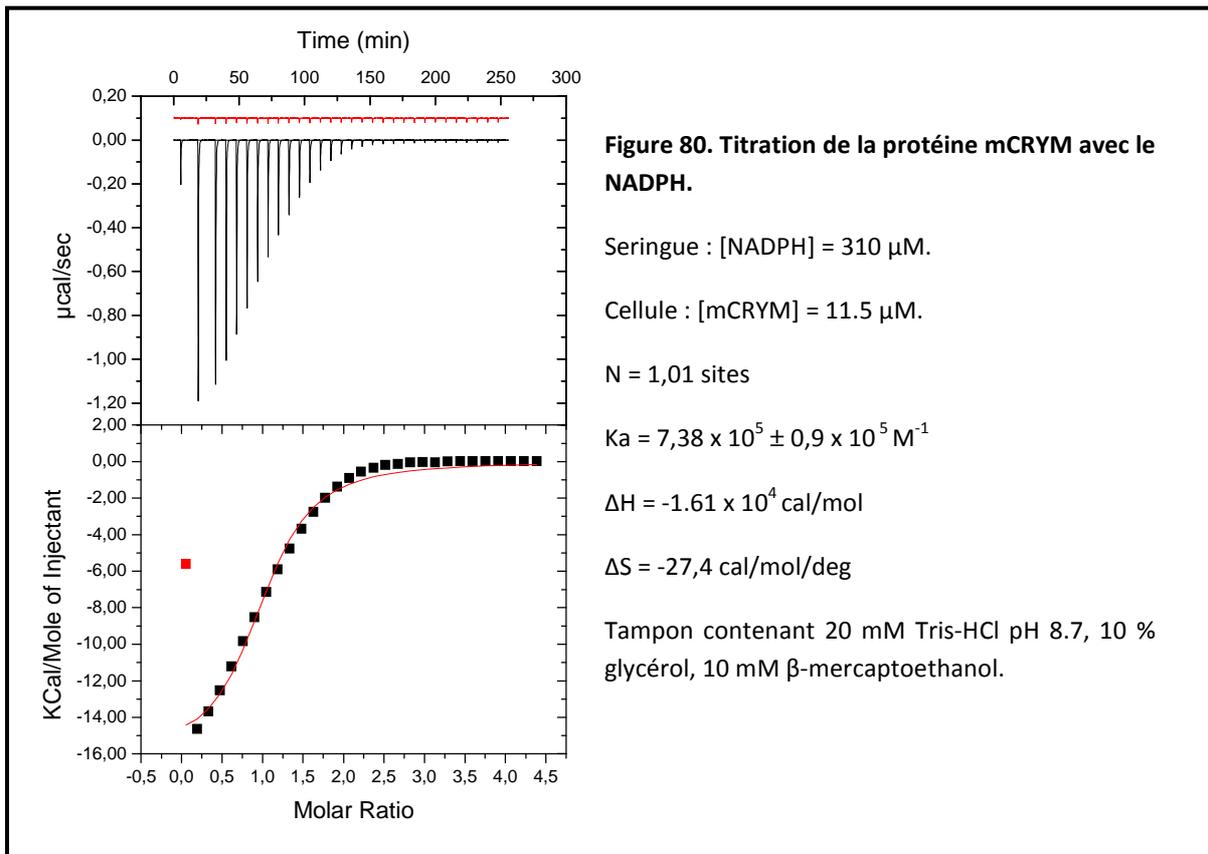
partie Matériel et Méthodes, page 103) et ont aboutit aux conditions de tampon suivantes : 20 mM de Tris-HCl pH 8.7, 10 % de glycérol, 10 mM de β -mercaptoethanol.





A.1.2. Condition en absence de sels et à pH 8.7

Les expériences de fixation des cofacteurs NADPH/NADP⁺ ont été reproduites afin de vérifier si les nouvelles conditions de tampon, favorables à une bonne solubilité de la T3, ont une influence sur l'affinité des cofacteurs pour la protéine mCRYM (Figure 80 et 81). Ces résultats ne sont pas significativement différents des résultats obtenus avec les premières conditions de tampon. Par conséquent, les sels et le pH n'ont pas d'influence sur la fixation des cofacteurs à la protéine mCRYM.



Les résultats, présentés dans le tableau (Figure 82), sont obtenus à partir de la moyenne de deux expériences pour chaque cofacteur. A partir des valeurs de la variation d'enthalpie (ΔH) et de la variation d'entropie (ΔS) obtenues expérimentalement, l'énergie libre (ΔG) a été calculée à partir de la formule suivante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

T correspond à la température, ΔS la variation d'entropie, ΔH la variation d'enthalpie et ΔG l'énergie libre.

Fixation ligand	N (site)	Ka ($10^6 M^{-1}$)	Kd ($10^{-6} M$)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	-T ΔS (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (kcal.mol ⁻¹ .deg ⁻¹)
NADPH	101 ± 0.01	0.64 ± 0.15	1.7 ± 0.42	-17.7 ± 2.1	-16.9 ± 1.9	0.8	-32.8 ± 1.9
NADP ⁺	103 ± 0.01	0.17 ± 0.06	6.2 ± 2.2	-14.8 ± 0.4	-14.2 ± 0.4	0.7	-25.7 ± 2.1

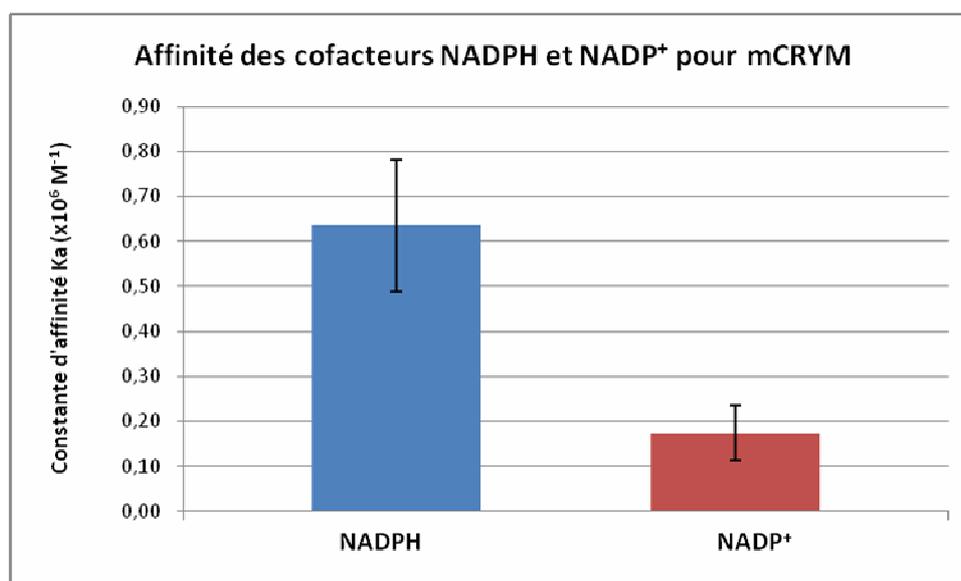


Figure 82. (A) Tableau récapitulatif des paramètres thermodynamiques de fixation des cofacteurs NADPH ou NADP⁺ sur la protéine mCRYM. Les valeurs thermodynamiques indiquées pour chaque cofacteur correspondent à la moyenne de deux expériences. (B) Graphique représentant l'affinité du NADPH (en bleu) et du NADP⁺ (en rouge) pour la protéine mCRYM.

Les énergies libres ΔG et les variations d'enthalpie ΔH de chaque expérience sont négatives, par conséquent la réaction est exothermique par la contribution favorable de l'enthalpie (ΔH

<0) et spontanée ($\Delta G < 0$). Par ailleurs, le terme $(-T\Delta S)$ est positif, donc sa contribution à la réaction est défavorable. Du fait que les expériences de fixation soient conduites par la variation d'enthalpie (ΔH), cela suggère que l'interaction du ligand (NADPH ou NADP^+) avec la protéine mCRYM est principalement conduite par des interactions de types polaires, soit des liaisons hydrogènes, de van der Waals ou des interactions électrostatiques qui contribuent à la stabilisation du complexe mCRYM/NADP(H).

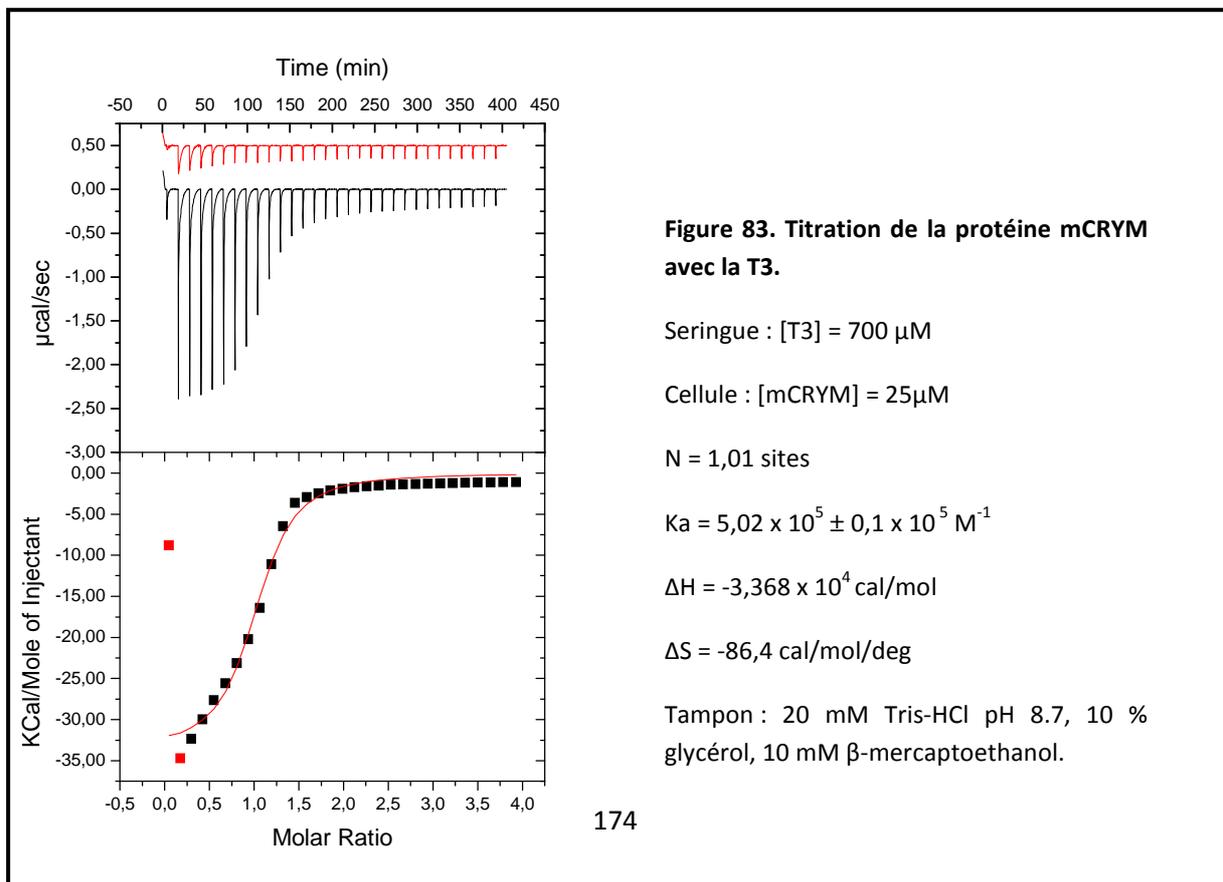
La constante K_a du NADPH est presque quatre fois supérieure à celle du NADP^+ (Figure 82). Ce couple redox (NADPH/ NADP^+) est utilisé par les enzymes anaboliques pour des réactions de biosynthèse réductrices, par la mise à disposition de l'énergie par l'ion hydrure présent sur le carbone C4 du cycle nicotinamide du NADPH. Par conséquent, pour favoriser cette réaction, la forme réduite NADPH est prédominante dans la cellule par rapport à la forme oxydée NADP^+ . Dans une cellule, le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ est estimé à 0,25 (Pollak et al., 2007). Il n'est pas possible d'estimer la concentration des deux formes, réduite (NADPH) et oxydée (NADP^+), car leur concentration est très variable d'un phénotype cellulaire à un autre qui dépend des besoins énergétiques du phénotype cellulaire. Par exemple, les neurones font parti des cellules contenant une concentration élevée en NADPH par la présence d'un haut potentiel électrique, consommateur d'énergie (valeur non renseignée dans la littérature). Donc, la protéine mCRYM, *in vivo*, est très certainement majoritairement sous sa forme complexée avec le NADPH. Même si dans l'hypothèse où le NADPH est converti en NADP^+ , par mCRYM ou par un de ses partenaires, l'abondance du NADPH dans la cellule et son affinité pour mCRYM supérieure à celle du NADP^+ , favoriserait très probablement, *in vivo*, le complexe mCRYM/NADPH.

Afin de comprendre l'influence des cofacteurs NADPH et NADP^+ sur l'affinité de la T3 pour mCRYM, une caractérisation thermodynamique de fixation de la T3 en absence et en présence de NADPH ou de NADP^+ a été entreprise.

A.2. Caractérisation thermodynamique de l'interaction de la T3 avec la protéine mCRYM : effet des cofacteurs

A.2.1. Interaction de la T3 avec mCRYM en absence des cofacteurs

La T3 est capable de se fixer à la protéine mCRYM en absence de NADPH et de NADP^+ avec une constante d'affinité équivalente à celle observée pour le NADPH, (Figure 83). Cette forme de CTBPs complexée uniquement avec la molécule T3 n'a jamais été décrite pour les autres CTBPs. Les données de la littérature ne nous permettent pas de savoir si cette forme, complexée uniquement avec la molécule de T3 est physiologiquement possible. Si c'est le cas, le rôle physiologique des cofacteurs seraient encore plus intrigant si la forme active de mCRYM (capable de fixer la T3) ne nécessite pas le cofacteur NADPH pour la fixation de la T3. En définitive, cette expérience montre que la forme active de mCRYM, *in vitro*, est possible en absence de NADPH. Afin de vérifier l'existence physiologique du complexe mCRYM/T3, au niveau du cerveau, il suffirait d'extraire la protéine mCRYM fusionnée à un tag FLAG d'une lignée neuronale exprimant d'une manière stable mCRYM-FLAG. Puis, à partir de la fraction purifiée de mCRYM-FLAG, vérifier, par analyse en spectrométrie de masse dénaturante (ESI-MS), si le NADPH est absent et si la T3 est présente.



A.2.2. Interaction de la T3 avec mCRYM en présence des cofacteurs

Pour mesurer l'influence des cofacteurs sur la constante d'affinité K_a de la T3 pour mCRYM, les mêmes expériences de caractérisation de l'affinité de la T3 ont été réalisées pour la protéine mCRYM saturée avec les cofacteurs NADPH ou NADP^+ (Figure 84). Les résultats montrent que la T3 est capable de se fixer à la protéine mCRYM en présence de NADP^+ . La constante K_a de la T3, en présence de NADP^+ , est proche de l'affinité mesurée pour la T3 seule. De plus, la constante K_a de la T3, en présence de NADPH, est augmentée (environ trente fois) par rapport à celle mesurée en présence de NADP^+ , (Figure 84).

Fixation ligand	N (site)	K_a (10^6M^{-1})	K_d (10^{-6}M)	ΔH (kcal.mol $^{-1}$)	ΔG (kcal.mol $^{-1}$)	$-T\Delta S$ (kcal.mol $^{-1}$)	ΔS (kcal.mol $^{-1}$.deg $^{-1}$)
T3 seule	102±001	0.67±0.02	1.5±0	-24.4±13.2	-23.0±12.0	1.4	-55.0±12.0
T3 a.ec/NADPH	103±0003	15.0±1.9	0.1	-10.0±0.05	-10.4	0.02	-0.8
T3 a.ec/NADP $^+$	102±002	0.50±0.05	2.0	-20.5±0.6	-19.4	1.1	-42.7

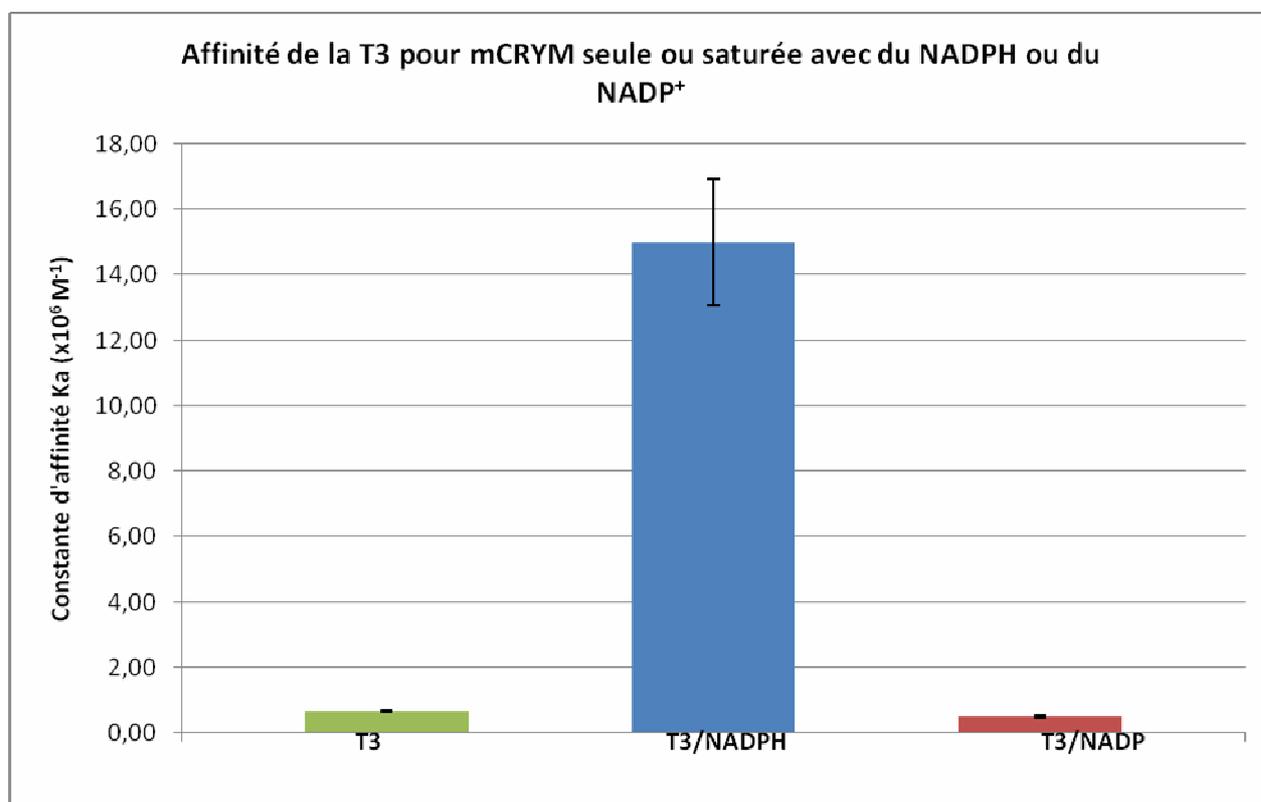


Figure 84 : (A) Tableau récapitulatif des paramètres thermodynamiques de fixation de la T3 en présence et en absence de NADP⁺ ou de NADPH. Les valeurs thermodynamiques indiquées pour la titration de mCRYM en présence de T3 et en absence de cofacteurs correspondent à la moyenne de deux expériences. Pour les deux autres expériences, les valeurs représentent celle d'une seule expérience. Cependant, les expériences ont été réalisées à différentes concentrations en cofacteurs et présentent une bonne corrélation entre les différentes valeurs. Figure 10 et 11. (B) Graphique représentant l'affinité de la T3 pour mCRYM en absence ou en présence de NADPH ou NADP⁺.

Le cofacteur NADPH influence donc la fixation de la T3 pour mCRYM en induisant une augmentation de son affinité. Cependant, cette affinité de la T3, en présence de NADPH n'atteint pas les constantes d'affinité observées pour certaines CTBPs et comme celle observée pour la protéine hCRYM exprimée au niveau des reins (K_a de la T3 de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). Rappelons que les CTBPs sont caractérisées par une forte diversité par leurs propriétés de fixation de la T3 qui semblent être tissu-spécifique aux CTBPs exprimées. L'affinité de la T3 pour mCRYM, en présence de NADPH, est tout de même comparable à certaines CTBPs comme celle exprimée au niveau du carcinome de la thyroïde (la protéine CTBPs/kinase p58 PKM₂ chez l'Homme, K_a de la T3 de $50 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) et est supérieure à la CTBP exprimée chez certains amphibiens comme la grenouille taureau (CTBP dépendante d'ions métalliques, K_a de la T3 de $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), (les propriétés des CTBPs sont présentées en introduction, page 25). Par ailleurs, toutes ces protéines ne présentent pas de fixation de la T3 en présence de NADP⁺ comme c'est le cas pour mCRYM. Cette dernière montre des propriétés de fixation de la T3 encore jamais décrites auparavant et reflète, davantage, la diversité au sein d'une même famille de protéines. La fixation de la T3, en absence et en présence des deux formes de cofacteurs, amène une interrogation sur le mécanisme mis en jeu par mCRYM pour libérer la T3 afin de lui permettre d'avoir son action génomique (au niveau du noyau) et/ou non génomique (au niveau du cytoplasme, non identifiée à ce jour). Même si mCRYM est capable de convertir le NADPH en NADP⁺, cette réaction enzymatique ne permettrait pas, *in vitro*, de libérer la T3. Par conséquent, ceci amène une hypothèse sur la possibilité d'une intervention extérieure pour permettre la libération de la T3 du site de mCRYM. Cette libération de la T3 pourrait être accomplie par des partenaires physiologiques de mCRYM et/ou des ligands qui rentreraient en compétition avec la T3. Ce qui amène l'hypothèse de l'existence possible d'autre(s) ligand(s) physiologique(s) pour la protéine mCRYM étudiée.

Par ailleurs, différentes concentrations de NADPH ont été testées (80, 170, 580, 1360 μM). La concentration de 80 μM a été déterminée à partir des expériences de titration de la protéine mCRYM avec le NADPH (Figure 80). Cette concentration correspond à la concentration finale de NADPH présente dans la cellule en fin d'expérience, où tous les sites de NADPH de mCRYM ont été saturés. Cette concentration aurait dû être suffisante pour saturer tous les sites de fixation du NADPH de mCRYM dans notre expérience de titration de mCRYM avec la T3, en présence de 80 μM de NADPH. L'allure de la courbe obtenue à 80 μM et 170 μM de NADPH présente deux points d'inflexions qui ne sont pas présents aux concentrations les plus élevées de NADPH (580 et 1360 μM), (Figure 85). Il est clairement visible que plus la concentration en NADPH augmente, plus ce deuxième point d'inflexion s'estompe. De plus, pour les mêmes expériences en présence de NADP^+ (dont la concentration saturante a été déterminée de la même manière que le NADPH, Figure 86), ce point d'inflexion n'est pas observé aux concentrations les plus faibles de NADP^+ . Les données actuelles d'ITC ne permettent pas de comprendre le phénomène thermodynamique ou physico-chimique responsable de ces résultats obtenus aux faibles concentrations de NADPH. Cependant, deux hypothèses peuvent être émises, il s'agirait soit d'une incomplète saturation des sites aux concentrations les plus faibles en NADPH, soit à un effet de coopérativité entre le NADPH et la T3. Pour savoir si un tel phénomène de coopérativité est présent entre la T3 et le NADPH, c'est-à-dire, que le T3 puisse avoir un effet sur l'affinité du NADPH comme c'est le cas du NADPH sur la T3, il suffirait de mesurer l'affinité du NADPH pour mCRYM saturée en T3 et de voir si l'affinité du NADPH est modifiée en comparaison avec l'expérience de NADPH seul (Figure 80). Si la T3 a une influence sur la fixation du NADPH, alors, cela permettrait de confirmer le phénomène de coopérativité supposé. Cela voudrait dire, également, que ce phénomène de coopérativité est significativement plus important entre la T3 et le NADPH que celui entre la T3 et le NADP^+ . Est-ce suffisant pour suggérer une activité catalytique possible par la protéine mCRYM ?

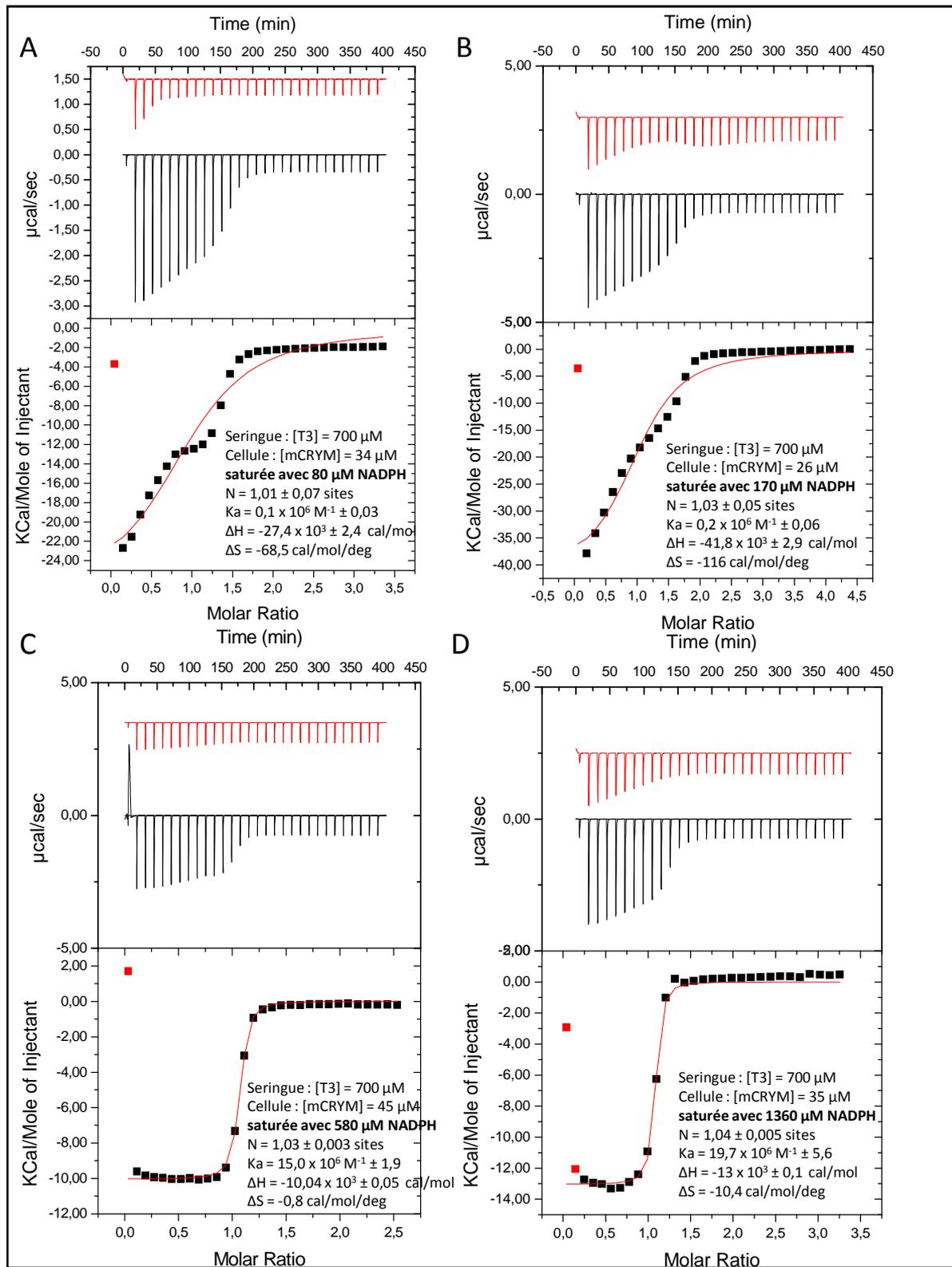


Figure 85 : Expériences de titration de mCRYM avec la T3, en présence de NADPH. Protéine mCRYM saturée avec différentes concentrations de NADPH : 80 μM (A), 170 μM (B), 580 μM (C), 1360 μM (D). Tampon : 20 mM Tris-HCl pH 8,7, 10 % glycérol, 10 mM β -mercaptoethanol.

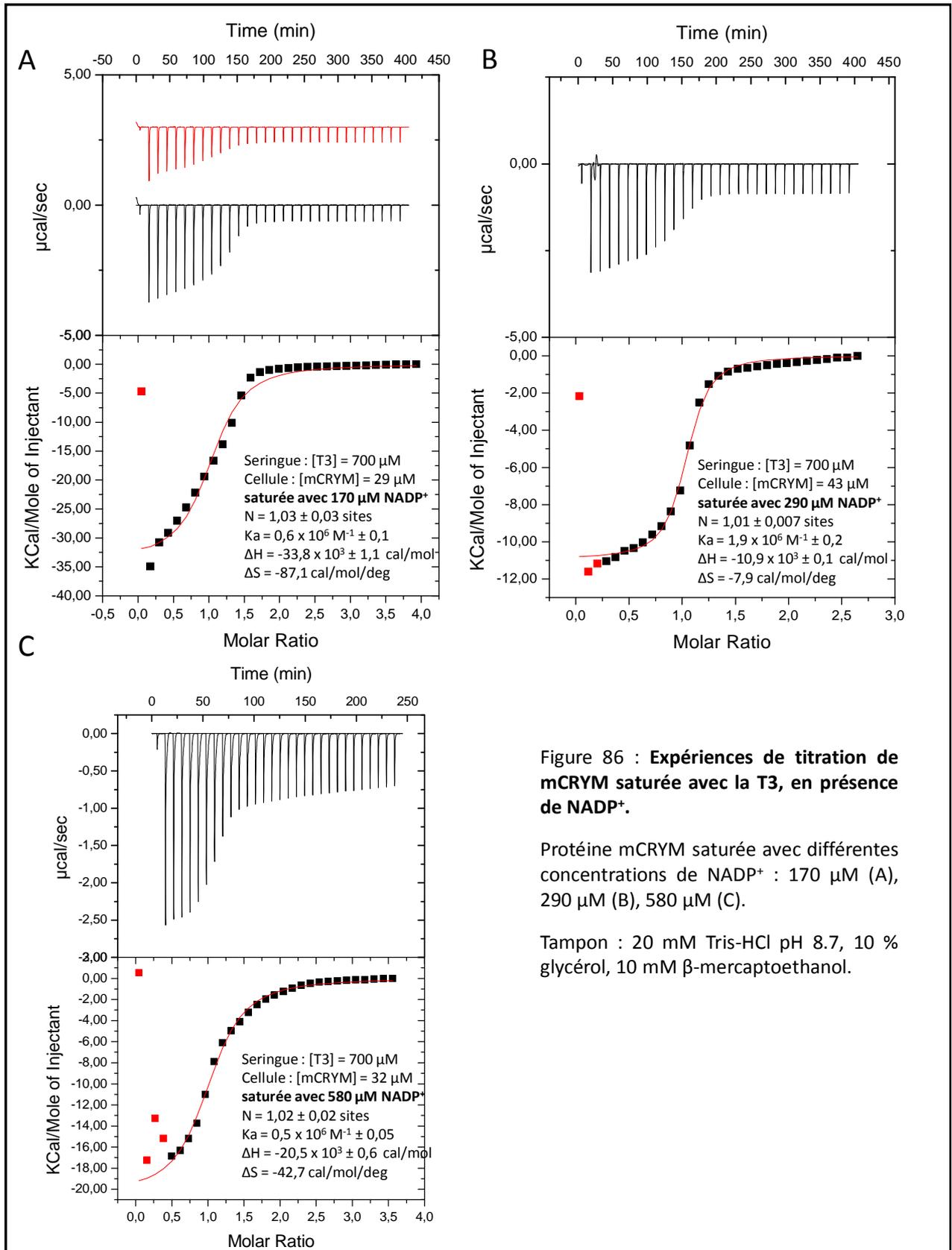


Figure 86 : Expériences de titration de mCRYM saturée avec la T3, en présence de NADP⁺.

Protéine mCRYM saturée avec différentes concentrations de NADP⁺ : 170 µM (A), 290 µM (B), 580 µM (C).

Tampon : 20 mM Tris-HCl pH 8.7, 10 % glycérol, 10 mM β-mercaptoethanol.

B. CONCLUSION

La caractérisation thermodynamique de la fixation du NADPH, NADP^+ et de la T3 ainsi que l'effet de ces cofacteurs sur la fixation de la T3 sur la protéine mCRYM révèle de nouvelles propriétés de fixation de la T3 par cette CTBP. En effet, la protéine mCRYM est capable de fixer la T3, *in vitro*, en absence des cofacteurs NADPH et NADP^+ (K_a de $0,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) et ceci semble être une spécificité propre à cette CTBP. L'influence des cofacteurs révèle une affinité de la T3 pour mCRYM augmentée en présence de NADPH (K_a de $15 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). De plus, en présence de NADP^+ , la T3 est capable de se fixer à la protéine mCRYM et son affinité est similaire ($0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) à celle obtenue en absence de ce cofacteur ($0,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). La plupart des CTBPs caractérisées, ne sont pas capables de fixer la T3 en présence de NADP^+ . La seule CTBP décrite avec cette propriété de fixation de la T3 en présence de la forme oxydée NADP^+ est la CTBP 4,7S (Hashizume et al., 1989). Cette fixation, en présence de NADP^+ , se fait avec des conditions expérimentales contenant un agent réducteur de ponts disulfures, le dithiothreitol (DTT). Ce dernier semble favoriser la fixation de la T3, car, dans les mêmes conditions expérimentales, sans DTT, la fixation de la T3 est inhibée, en présence de NADP^+ . Nos conditions expérimentales contiennent un agent réducteur équivalent au DTT, le β -mercaptoethanol. Ce dernier est indispensable pour la solubilité de la protéine mCRYM car, en absence de cet agent réducteur, la protéine s'agrège en raison, très probablement, de l'exposition d'une cystéine à sa surface. Par conséquent, il n'est pas possible d'envisager la même expérience sans agent réducteur pour confirmer le même effet du β -mercaptoethanol sur l'affinité de la T3 pour mCRYM, en présence de NADP^+ . Il est cependant indispensable de pouvoir extrapoler ces résultats de thermodynamique aux propriétés physiologiques de fixation de la T3 sur la protéine mCRYM. Pour cela, l'identification de la forme complexée de mCRYM physiologiquement majoritaire (mCRYM/T3 ou mCRYM/T3/ NADP^+ ou mCRYM/T3/NADPH) permettrait de comprendre un peu mieux le modèle de fixation de la T3 par mCRYM. Enfin, la recherche de partenaires de mCRYM, serait une stratégie indirecte, mais très certainement fructueuse, pour élucider le mécanisme d'action de mCRYM et d'établir un modèle de régulation de la T3 par mCRYM et du rôle des cofacteurs dans cette régulation, ont-ils uniquement un rôle de régulateurs de la fixation de la T3 ? La protéine mCRYM, n'est-elle pas capable d'avoir un double rôle, avec un deuxième rôle qui impliquerait le couple redox NADPH/ NADP^+ ? Telles que la protéine

CTBP/ALDH du Xénope ou la protéine CTBP/kinase p58 PKM₂ de l'Homme avec leur double fonction. Toutes ces questions nécessitent des investigations, *in vivo*, pour y répondre.

CHAPITRE 5

Conclusion

Et

Perspectives

A. Intégration des études structurale et thermodynamique

Les données thermodynamiques semblent être en accord avec les hypothèses structurales émises pour les structures cristallographiques des complexes de la protéine mCRYM. Elles révèlent une affinité de la T3 significativement augmentée en présence de NADPH (K_a de $15 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) à celle obtenue en présence de NADP^+ ($0,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Ces résultats sont en corrélation avec les observations structurales sur mCRYM/T3/NADP⁺ qui montrent une faible interaction de la T3 avec les résidus de mCRYM, révélant une conformation ouverte du site de fixation de la T3. En effet, l'interaction de la T3 avec mCRYM est principalement conduite par des liaisons hydrogènes, principalement concentrées, au niveau de la fonction carboxylique de la T3. La révélation par ITC d'une réaction dépendante du terme ΔH est en accord avec la nature des liaisons chimiques qui sont générées entre la molécule de T3 et la protéine mCRYM. A l'inverse, la structure de mCRYM/NADPH révèle une conformation fermée du site de fixation de la T3, identique à celle de hCRYM/NADPH, qui est induite par la position des chaînes latérales des résidus impliqués dans l'interaction avec la T3. Cette conformation conduit, inévitablement, à une position de la T3 plus enfouie dans le site de ce complexe. De plus, le volume disponible au fond de la poche de la T3 est favorable à une telle fixation. En définitive, ces observations structurales suggèrent une affinité augmentée en présence du NADPH et sont confortées par les données thermodynamiques qui montrent une fixation de la T3 augmentée, en présence de NADPH.

Par ailleurs, les données structurales de mCRYM/NADPH, par la conformation fermée du site de la T3, ne semblaient pas permettre l'accès de la T3 au site. L'hypothèse émise suite à ces observations était que la molécule T3 devait se fixer sur mCRYM avant l'induction de la conformation fermée par la fixation du NADPH. Les données d'ITC montrent que la T3 est capable de se fixer sur la protéine mCRYM préalablement complexée au NADPH. Ce résultat est très intéressant compte-tenu de la conformation fermée dans la structure de mCRYM/NADPH et pourrait suggérer un changement de conformation pour permettre la fixation de la T3. Ces résultats suscitent, par conséquent, une question : par quel mécanisme la T3 est capable d'accéder au site de mCRYM complexée au NADPH ? Nous n'avons pas de réponse claire à ce sujet mais les résultats d'ITC, effectués en présence de différentes concentrations saturantes de NADPH pour mCRYM, semblent suggérer une possible

coopérativité entre la T3 et le NADPH, qui pourrait permettre une conformation du site de la T3 plus favorable à sa fixation. Cependant, pourquoi et comment ce phénomène de coopérativité interviendrait uniquement aux plus faibles concentrations de NADPH? Peut-être par un excès de T3 qui favoriserait l'action de la T3 sur la fixation du NADPH. Cette action provoquerait une partielle libération du NADPH de son site pour permettre la fixation de la T3 et/ou un changement de conformation des chaînes latérales du site de la T3 qui conduirait à une conformation plus favorable à sa fixation. Afin de vérifier le mécanisme mis en jeu pour permettre une conformation favorable pour la fixation de la T3, en présence de NADPH, la détermination de l'influence de la T3 sur la fixation du NADPH, par ITC, pourrait apporter des réponses. En effet, si l'affinité du NADPH est modifiée en présence de T3, cela pourrait suggérer une coopérativité entre les deux molécules qui favoriserait la fixation de la T3, en présence de NADPH. Cependant, la connaissance du mécanisme impliqué dans cette coopérativité ne sera pas élucidée. De plus, un mécanisme qui passerait par une conversion du NADPH en NADP^+ semble peut probable compte-tenu de la forte augmentation de l'affinité de la T3 en présence de NADPH en comparaison avec celle obtenue, en présence de NADP^+ . Si une telle conversion se produisait, on devrait obtenir les mêmes affinités de la T3 pour mCRYM en présence des deux cofacteurs.

De la même façon, il serait intéressant de continuer les tests de cristallisation des complexes mCRYM/T3 et mCRYM/T3/ NADP^+ . La résolution des structures cristallographiques de ces complexes permettrait de confirmer de nombreuses observations, notamment au sujet de la nature redox des molécules de NADP(H) observées dans les deux structures cristallographiques de mCRYM.

B. La T3 est-elle le seul ligand physiologique de la protéine CRYM ?

Des approches plus variées sont nécessaires pour comprendre de quelle manière le NADPH régule la T3 et comment la libération de la T3 s'effectue étant donné que les deux formes de cofacteurs sont capables de maintenir, *in vitro*, la T3 dans son site. Etant donné que l'affinité en présence des deux cofacteurs est modérée (K_d de l'ordre du micromolaire) et par la forte similitude du site de fixation de la T3 de mCRYM avec ses homologues; cette dernière pourrait fixer d'autres ligands qui rentreraient en compétition avec la T3 et permettrait sa libération du site de mCRYM. En effet, d'autres CTBPs, présentent cette propriété qui dévoile

un double rôle médié par la fixation des cofacteurs. Par exemple, la protéine CTBP/ALDH du Xénope est capable de fixer la T3, en absence de NAD^+ , et, de fixer le rétinol, en présence de NAD^+ (Yamauchi et al., 1999). Par conséquent, cette protéine révèle un double rôle sur deux ligands différents. Un rôle de protéine structurale qui permettrait la régulation de la concentration de T3 libre dans la cellule ainsi que son transport dans le noyau, et, d'autre part, un rôle d'enzyme cytoplasmique, par la conversion du rétinol en acide rétinoïque (Yoshida et al., 1998). Les deux molécules, la T3 et le rétinol, interviennent dans la même voie de signalisation, par leur fixation sur leur récepteur nucléaire respectif (TR pour la T3 et RAR pour le rétinol), lesquels forment un hétérodimère (RAR-TR) ligands-dépendant (rétinol-T3) qui conduit à l'activation de gènes cibles. L'activation de ces deux récepteurs est donc régulée par la même protéine, CTBPs/ALDH. Cette dernière révèle un mécanisme de régulation de ces deux ligands sous le contrôle du NAD^+ , donc la concentration de ce cofacteur dans la cellule est un facteur critique pour favoriser la fixation de l'un des deux ligands physiologiques de la protéine CTBPs/ALDH. Ce mécanisme dépendant de la concentration de NAD^+ suggère donc, une affinité différente de ces deux ligands pour la CTBPs/ALDH, en présence et en absence de NAD^+ , avec très certainement une affinité plus importante du rétinol en présence de NAD^+ et à l'inverse, une affinité plus élevée de la T3 en absence de NAD^+ . Ces données ainsi que nos données structurales et thermodynamiques amènent vers une hypothèse d'un double rôle de mCRYM, influencé par les cofacteurs NADP(H) , qui conduirait à la fixation possible d'autres molécules sur mCRYM. Cette dernière pourrait-elle fixer le rétinol ou d'autres ligands de récepteurs nucléaires de la même famille ? Un lien a été émis entre les récepteurs aux androgènes (AR) et la protéine hCRYM (Malinowska et al., 2009). Il a été montré que l'expression de hCRYM est régulée par les récepteurs ARs. Peut-être que ce lien entre hCRYM et les ARs pourrait suggérer une fixation possible de certaines hormones androgènes sur les protéines CRYMs ?

Par ailleurs, les données sur les CTBPs montrent un lien entre leur fonction et leur localisation tissulaire, qui suggèrerait une fixation d'un ligand tissu-spécifique à la CTBP exprimée dans le tissu. Aussi, la diversité de l'action de la T3 (génomique et non génomique) et la localisation diffuse, cytoplasmique et nucléaire, de mCRYM peuvent envisager une action cytoplasmique de mCRYM médiée par un autre ligand physiologique ou tout

simplement par une action non génomique de la T3, par exemple, une action de mCRYM au niveau des mitochondries et qui est régulée par la fixation du NADP(H).

Pour explorer cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer un criblage, *in vitro*, d'une chimiothèque contenant des molécules spécifiques du tissu cérébral (par exemple des neurotransmetteurs) et de tester la fixation de ces molécules sur les différents complexes de mCRYM : mCRYM apo, mCRYM/NADPH, mCRYM/NADP⁺.

C. Double rôle fonctionnel de la protéine CRYM dans le cerveau ?

Par ailleurs, l'une des hypothèses sur les mécanismes à l'origine de l'apparition de la mort neuronale dans la MH et la MP est la présence d'un dysfonctionnement mitochondrial qui pourrait être associé à un phénomène d'excitotoxicité* neuronale impliquant « indirectement » les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), un type de récepteurs glutamatergiques ionotropes* conduisant à une entrée délétère de Ca²⁺ dans les neurones.

Rappelons, que les neurones glutamatergiques, impliqués dans la boucle motrice, sont localisés dans le cortex cérébral, se projetant vers les neurones GABAergiques de la région striatale. L'activation des récepteurs NMDA de ces neurones serait « indirectement » déclenchée par l'atteinte du métabolisme énergétique, par la présence de concentrations physiologiques de glutamate dans l'espace extra-synaptique (l'espace extracellulaire, entre deux synapses). La première hypothèse mécanistique avancée dans les années 90, appelée hypothèse « d'excitotoxicité indirecte » (Beal 1992; Brouillet et al., 1999) proposait une altération mitochondriale chronique qui pouvait induire une diminution de la disponibilité en ATP. Cette diminution affecterait l'échange de cations au niveau des pompes telles que les ATPase à Ca²⁺ et celles à Na⁺ /K⁺. Ce qui conduirait à une dépolarisation partielle de la membrane cytoplasmique qui pourrait à son tour activer « indirectement » les canaux à Ca²⁺ voltage-dépendants associés aux récepteurs NMDA ionotropes. L'entrée accrue de calcium dans la cellule induirait, à son tour, la cascade excitotoxique conduisant à la mort cellulaire.

Ce mécanisme hypothétique a été récemment re-examiné par des approches variées *in vivo* et *in vitro* (Jacquard et al., 2006). Il semblerait que l'atteinte même partielle du système mitochondrial, sans effet majeur sur la survie cellulaire, rend les mitochondries incapables de gérer correctement les augmentations transitoires en concentrations de calcium

cytosoliques induit par la libération de concentration physiologique de glutamate à la synapse. Ainsi, il a été montré que même de faibles concentrations de glutamate deviennent extrêmement toxiques *via* leur interaction avec les récepteurs NMDA lorsque la chaîne respiratoire de la mitochondrie est partiellement bloquée. Contrairement à l'hypothèse des années 1990, l'atteinte énergétique ne provoque pas d'entrée accrue de calcium. Mais plutôt, un dysfonctionnement mitochondrial tel que, le peu de calcium rentrant, n'est pas capturer normalement par les mitochondries, ce qui conduit à des concentrations intracytoplasmique de Ca^{2+} rapidement très élevées, ce qui déclenche la cascade excitotoxique et la mort cellulaire (Jacquard et al., 2006).

Cette hypothèse pourrait être intégrée aux propriétés de la protéine mCRYM, mises en évidence dans ce vaste projet, et nous amène vers une autre hypothèse de travail qui relie ce phénomène de dysfonctionnement mitochondrial à la fonction physiologique de mCRYM dans le cerveau. Rappelons, que cette protéine a été identifiée comme étant sélectivement exprimée dans le striatum, c'est-à-dire au niveau des neurones GABAergiques, qui, lors de ce dysfonctionnement mitochondrial, subissent un désordre énergétique qui conduit à une incapacité des mitochondries à réguler la concentration de calcium intracytosolique. Le site de potassium, observé, structurellement sur mCRYM, peut-il être un site physiologique de potassium ou de calcium ? Un défaut d'expression de mCRYM dans des situations pathologiques, telles que la MH et la MP, peut-il avoir un lien avec le métabolisme énergétique ? Par sa capacité à fixer le couple redox NADPH/NADP⁺, cette protéine est-elle capable de porter un rôle de sensor énergétique ? Ces questions méritent des investigations, *in vivo*, pour y répondre. La première investigation, serait d'observer la localisation cellulaire de mCRYM dans une situation physiologique et dans une situation de stress énergétique, par exemple par le traitement, par une toxine mitochondriale (par exemple le l'acide 3-nitropionique, 3NP), d'une lignée cellulaire exprimant d'une manière stable mCRYM fusionnée à un tag HA. Si la localisation de mCRYM est perturbée dans la situation de stress énergétique, alors, il est possible de suggérer une implication de mCRYM dans la fonction mitochondriale. Par ailleurs, la recherche des partenaires physiologiques de mCRYM pourrait être la seconde stratégie par la recherche de ses partenaires en fonction du compartiment cellulaire. Pour le compartiment cytoplasmique, il serait intéressant de cibler les mitochondries en les isolants des autres organelles cytoplasmiques. Si la protéine mCRYM

est retrouvée dans cette préparation mitochondriale, avec l'identification de ses partenaires mitochondriaux, alors le lien peut être clairement établi. Par ailleurs, ce lien peut être également établi dans le cas où la protéine mCRYM possède des partenaires cytoplasmiques ayant une implication dans le métabolisme énergétique telles que les Na^+/K^+ ATPases dont le lien avec hCRYM a été proposé (Oshima et al., 2006).

La découverte de ligands physiologiques de la protéine CRYM, spécifique d'une région cérébrale, ouvre certaines perspectives thérapeutiques. En effet, ces molécules ainsi que la protéine CRYM pourraient constituer des marqueurs qui pourraient être utilisés dans différentes stratégies thérapeutiques (thérapie génique, thérapie chimique) et/ou de diagnostic, notamment par l'exploration du potentiel de l'imagerie par résonance magnétique, pour le diagnostic des maladies neurodégénératives.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, A. B.; Andersen, P. & Ljungqvist, L. Structure and function of a 40,000-molecular-weight protein antigen of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.*, 1992, 60, 2317-2323.
- Andrews, T. C. & Brooks, D. J. Advances in the understanding of early Huntington's disease using the functional imaging techniques of PET and SPET. *Molecular Medicine Today*, 1998, 4, 532 – 539.
- Araki, O.; Ying, H.; Furuya, F.; Zhu, X. & Cheng, S.-y. Thyroid hormone receptor β mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor γ action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102, 16251-16256.
- Aronin, N.; Chase, K.; Young, C.; Sapp, E.; Schwarz, C.; Matta, N.; Kornreich, R.; Lanwehrmeyer, B.; Bird, E.; Beal, M. F.; Vonsattel, J.-P.; Smith, T.; Carraway, R.; Boyce, F. M.; Young, A. B.; Penney, J. B. & DiFiglia, M. CAG expansion affects the expression of mutant huntingtin in the Huntington's disease brain. *Neuron*, 1995, 15, 1193 – 1201.
- ASHIZAWA, K. & CHENG, S. Y. Regulation of Thyroid-hormone Receptor-mediated Transcription By A Cytosol Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89, 9277-9281
- Baker, P. J.; Sawa, Y.; Shibata, H.; Sedelnikova, S. E. & Rice, D. W. Analysis of the structure and substrate binding of Phormidium lapideum alanine dehydrogenase. *Nat Struct Mol Biol*, 1998, 5, 561-567
- Banno H.; Katsuno M.; Suzuki K.; Tanaka F.; Sobue G. Neuropathology and therapeutic intervention in spinal and bulbar muscular atrophy. *Int J Mol Sci.*, 2009 Mar;10(3):1000-12.
- BARTALENA, L. & ROBBINS, J. Variations in Thyroid Hormone Transport Proteins and Their Clinical Implications. *Thyroid*, 1992, 2, 237-245
- Baumann, C. T.; Maruvada, P.; Hager, G. L. & Yen, P. M. Nuclear Cytoplasmic Shuttling by Thyroid Hormone Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, 11237-11245
- Beal, MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol.* 1992 Feb;31(2):119-30.
- Bergh, J. J.; Lin, H.Y.; Lansing, L.; Mohamed, S. N.; Davis, F. B.; Mousa, S. & Davis, P. J. Integrin α V β 3 Contains a Cell Surface Receptor Site for Thyroid Hormone that Is Linked to Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Induction of Angiogenesis. *Endocrinology*, 2005, 146, 2864-2871

BIBLIOGRAPHIE

- Berni, R.; Clerici, M.; Malpeli, G.; Cleris, L. & Formelli, F. Retinoids: in vitro interaction with retinol-binding protein and influence on plasma retinol. *FASEB J.*, 1993, 7, 1179-1184
- Bookout, A. L.; Jeong, Y.; Downes, M.; Yu, R. T.; Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network. *Cell*, 2006, 126, 789 - 799
- Bradley, D. J.; Towle, H. C. & Young, W. S. Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91, 439-443
- Brand, M. D. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, 33, 897-904
- Brochier, C.; Gaillard, M.-C.; Diguët, E.; Caudy, N.; Dossat, C.; Segurens, B.; Wincker, P.; Roze, E.; Caboche, J.; Hantraye, P.; Brouillet, E.; Elalouf, J.-M. & de Chaldee, M. Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiol. Genomics*, 2008, 33, 170-179
- Brouillet, E.; Condé, F.; Beal, M. F. & Hantraye, P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals; *Progress in Neurobiology*, 1999, 59, 427 - 468
- Brunger, A.T.; Adams, P.D.; Clore, G.M.; DeLano, W.L.; Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W.; Jiang, J.S.; Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S.; Read, R.J.; Rice, L.M.; Simonson, T. and Warren, G.L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt5): 905-21.
- Buchholz, D. R.; Paul, B. D.; Fu, L. & Shi, Y.-B. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145, 1 - 19
- Bunn, C. F.; Neidig, J. A.; Freidinger, K. E.; Stankiewicz, T. A.; Weaver, B. S.; McGrew, J. & Allison, L. A. Nucleocytoplasmic Shuttling of the Thyroid Hormone Receptor alpha. *Mol Endocrinol*, 2001, 15, 512-533
- Cadenas, S.; Echtay, K. S.; Harper, J. A.; Jekabsons, M. B.; Buckingham, J. A.; Grau, E.; Abuin, A.; Chapman, H.; Clapham, J. C. & Brand, M. D. The Basal Proton Conductance of Skeletal Muscle Mitochondria from Transgenic Mice Overexpressing or Lacking Uncoupling Protein-3. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 2773-2778
- Cao, J.H.; Lin, H.Y.; Luidens, M. K.; Davis, F. B. & Davis, P. J. Cytoplasm-To-Nucleus Shuttling Of Thyroid Hormone Receptor β 1 (Tr β) Is Directed From A Plasma Membrane Integrin Receptor By Thyroid Hormone. *Endocrine Research*, 2009, 34, 31-42

BIBLIOGRAPHIE

- Cheng, S.Y. Multiple Mechanisms for Regulation of the Transcriptional Activity of Thyroid Hormone Receptors. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2000, 1, 9-18
- Cheng, S.-Y.; Leonard, J. L. & Davis, P. J. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocr Rev*, 2010, 31, 139-170
- Cheng, Z.; Sun, L.; He, J. & Gong, W. Crystal structure of human mu-crystallin complexed with NADPH. *Protein Science*, 2007, 16, 329-335
- Craelius W.; Green WL.; Harris DR. Acute effects of thyroid hormone on sodium currents in neonatal myocytes. *Biosci Rep*. 1990 Jun;10(3):309-15.
- Damiano, M.; Galvan, L.; Déglon, N. & Brouillet, E. Mitochondria in Huntington's disease *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802, 52 - 61
- Darimont, B. D.; Wagner, R. L.; Apriletti, J. W.; Stallcup, M. R.; Kushner, P. J.; Baxter, J. D.; Fletterick, R. J. & Yamamoto, K. R. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & Development*, 1998, 12, 3343-3356
- Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models 2003, 39, 889-909
- Davis, F. B.; Tang, H.Y.; Shih, A.; Keating, T.; Lansing, L.; Hercbergs, A.; Fenstermaker, R. A.; Mousa, A.; Mousa, S. A.; Davis, P. J. & Lin, H.-Y. Acting via a Cell Surface Receptor, Thyroid Hormone Is a Growth Factor for Glioma Cells. *Cancer Research*, 2006, 66, 7270-7275
- Davis, P. J.; Handwerger, B. S. & Glaser, F. Physical Properties of a Dog Liver and Kidney Cytosol Protein That Binds Thyroid Hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249, 6208-6217
- DeGroot LJ, Nakai A, Sakurai A, Macchia E. The molecular basis of thyroid hormone action. *J Endocrinol Invest*. 1989 Dec;12(11):843-61.
- Estébanez-Perpiná, E.; Arnold, L. A.; Nguyen, P.; Rodrigues, E. D.; Mar, E.; Bateman, R.; Pallai, P.; Shokat, K. M.; Baxter, J. D.; Guy, R. K.; Webb, P. & Fletterick, R. J. A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104, 16074-16079
- Fanjul, A. N. & Farias, R. N. Novel cold-sensitive cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding proteins in human red blood cell. Isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266, 16415-16419
- Fisher, R. P.; Lisowsky, T.; Parisi, M. A. & Clayton, D. A. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267, 3358-3367

BIBLIOGRAPHIE

- Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, Curran T. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J.* 1996 Jun 17;15(12):3006-15.
- Francon J.; Osty J.; Chantoux F.; Lennon AM. Cellular location of cytosolic triiodothyronine binding protein in primary cultures of fetal rat brain. *Mol Cell Endocrinol.* 1985 Mar;39(3):197-207.
- Gallagher, D.; Monbouquette, H.; Schröder, I.; Robinson, H.; Holden, M. & Smith, N. Structure of Alanine Dehydrogenase from *Archaeoglobus*: Active Site Analysis and Relation to Bacterial Cyclodeaminases and Mammalian mu Crystallin. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 342, 119 - 130
- Georgievska, B.; Kirik, D. & Björklund, A. Aberrant Sprouting and Downregulation of Tyrosine Hydroxylase in Lesioned Nigrostriatal Dopamine Neurons Induced by Long-Lasting Overexpression of Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor in the Striatum by Lentiviral Gene Transfer. *Experimental Neurology*, 2002, 177, 461 - 474
- Goodman, J. L.; Wang, S.; Alam, S.; Ruzicka, F. J.; Frey, P. A. & Wedekind, J. E. Ornithine Cyclodeaminase: Structure, Mechanism of Action, and Implications for the μ -Crystallin Family. *Biochemistry*, 2004, 43, 13883-13891
- Gordon, J. T.; Kaminski, D. M.; Rozanov, C. B. & Dratman, M. B. Evidence that 3,3',5-triiodothyronine is concentrated in and delivered from the locus coeruleus to its noradrenergic targets via anterograde axonal transport. *Neuroscience*, 1999, 93, 943 - 954
- Guadano-Ferraz, A.; Escamez, M. J.; Rausell, E. & Bernal, J. Expression of Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Hypothyroid Rat Brain Indicates an Important Role of Thyroid Hormone in the Development of Specific Primary Sensory Systems. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 3430-3439
- Hadj-Sahraoui, N.; Seugnet, I.; Ghorbel, M. T. & Demeneix, B. Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neuroscience Letters*, 2000, 280, 79 - 82
- Han, I.; You, Y.; Kordower, J. H.; Brady, S. T. & Morfini, G. A. Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *Journal of Neurochemistry*, 2010, 113, 1073-1091
- Hashizume K, Miyamoto T, Nishii Y, Kobayashi M. Evidence for the presence of active and inactive forms of cytosolic triiodothyronine binding protein in rat kidney: cooperative action of Ca^{2+} in NADPH activation. *Endocrinol Jpn.* 1987 Aug;34(4):479-87.
- Hashizume, K.; Miyamoto, T.; Ichikawa, K.; Yamauchi, K.; Kobayashi, M.; Sakurai, A.; Ohtsuka, H.; Nishii, Y. & Yamada, T. Purification and characterization of NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine binding protein in rat kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264, 4857-4863

BIBLIOGRAPHIE

- Hashizume, K.; Miyamoto, T.; Ichikawa, K.; Yamauchi, K.; Sakurai, A.; Ohtsuka, H.; Kobayashi, M.; Nishii, Y. & Yamada, T. Evidence for the presence of two active forms of cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (CTBP) in rat kidney. Specialized functions of two CTBPs in intracellular T3 translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264, 4864-4871
- HASHIZUME, K.; MIYAMOTO, T.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, S.; ICHIKAWA, K.; YAMAUCHI, K.; OHTSUKA, H. & TAKEDA, T. Cytosolic 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine (T3)-Binding Protein (CTBP) Regulation of Nuclear T3 Binding: Evidence for the Presence of T3-CTBP Complex-Binding Sites in Nuclei. *Endocrinology*, 1989, 124, 2851-2856
- Heiman, M.; Schaefer, A.; Gong, S.; Peterson, J. D.; Day, M.; Ramsey, K. E.; Suárez-Fariñas, M.; Schwarz, C.; Stephan, D. A.; Surmeier, D. J.; Greengard, P. & Heintz, N. A Translational Profiling Approach for the Molecular Characterization of CNS Cell Types 2008, 135, 738-748
- Hennemann, G. Notes on the History of Cellular Uptake and Deiodination of Thyroid Hormone. *Thyroid*, 2005, 15, 753-756
- Heuer, H.; Maier, M. K.; Iden, S.; Mittag, J.; Friesema, E. C. H.; Visser, T. J. & Bauer, K. The Monocarboxylate Transporter 8 Linked to Human Psychomotor Retardation Is Highly Expressed in Thyroid Hormone-Sensitive Neuron Populations. *Endocrinology*, 2005, 146, 1701-1706
- Hodges, A.; Strand, A. D.; Aragaki, A. K.; Kuhn, A.; Sengstag, T.; Hughes, G.; Elliston, L. A.; Hartog, C.; Goldstein, D. R.; Thu, D.; Hollingsworth, Z. R.; Collin, F.; Synek, B.; Holmans, P. A.; Young, A. B.; Wexler, N. S.; Delorenzi, M.; Kooperberg, C.; Augood, S. J.; Faull, R. L.; Olson, J. M.; Jones, L. & Luthi-Carter, R. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.*, 2006, 15, 965-977
- Incerpi, S.; Luly, P.; De Vito, P. & Farias, R. N. Short-Term Effects of Thyroid Hormones on the Na/H Antiport in L-6 Myoblasts: High Molecular Specificity for 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine. *Endocrinology*, 1999, 140, 683-689
- Ishigaki S, Abramovitz M, Listowsky I. Glutathione-S-transferases are major cytosolic thyroid hormone binding proteins. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Sep;273(2):265-72.
- Itoh N & Morikawa, R. Crystallization and properties of L-alanine dehydrogenase from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Agric.Biol.Chem*, 1983, 47, 2511-2519.
- Jacquard, C.; Trioulier, Y.; Cosker, F.; Escartin, C.; Bizat, N.; Hantraye, P.; Cancela, J. M.; Bonvento, G. & Brouillet, E. Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.*, 2006, 20, 1021-1023.
- Jaffe, R. C. Physicochemical properties of the cytoplasmic triiodothyronine binding protein from tadpole liver and tail fin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1978, 11, 205 - 211

BIBLIOGRAPHIE

- Jansen, J.; Friesema, E. C. H.; Kester, M. H. A.; Milici, C.; Reeser, M.; Gruters, A.; Barrett, T. G.; Mancilla, E. E.; Svensson, J.; Wemeau, J.-L.; Busi da Silva Canalli, M. H.; Lundgren, J.; McEntagart, M. E.; Hopper, N.; Arts, W. F. & Visser, T. J. Functional Analysis of Monocarboxylate Transporter 8 Mutations Identified in Patients with X-Linked Psychomotor Retardation and Elevated Serum Triiodothyronine *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92, 2378-2381
- Jansen, J.; Friesema, E. C.; Milici, C. & Visser, T. J. Thyroid Hormone Transporters in Health and Disease. *Thyroid*, 2005, 15, 757-768
- Jones, I.; Ng, L.; Liu, H. & Forrest, D. An Intron Control Region Differentially Regulates Expression of Thyroid Hormone Receptor beta2 in the Cochlea, Pituitary, and Cone Photoreceptors. *Mol Endocrinol*, 2007, 21, 1108-1119
- Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26: 795-800.
- KAPLAN, M. M. & SHAW, E. A. Type II Iodothyronine 5'-Deiodination by Human and Rat Placenta in Vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59, 253-257
- Kato, H.; Fukuda, T.; Parkison, C.; McPhie, P. & Cheng, S. Y. Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86, 7861-7865
- Kim, R. Y.; Gasser, R. & Wistow, G. J. mu-crystallin is a mammalian homologue of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase and is expressed in human retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89, 9292-9296
- Kitagawa, S.; Obata, T.; Hasumura, S.; Pastan, I. & Cheng, S. Y. A cellular 3,3',5-triiodo-L-thyronine binding protein from a human carcinoma cell line. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262, 3903-3908.
- KOBAYASHI, M.; HASHIZUME, K.; SUZUKI, S.; ICHIKAWA, K. & TAKEDA, T. A Novel NADPH-Dependent Cytosolic 3,5,3'-Triiodo-LThyronine- Binding Protein (CTBP; 5.IS) in Rat Liver: A Comparison with 4.7S NADPH-Dependent CTBP. *Endocrinology*, 1991, 129, 1701-1708
- Koller, K. J.; Wolff, R. S.; Warden, M. K. & Zoeller, R. T. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84, 7329-7333
- Larsen PR, D.T., Schlumberger MJ, Hay ID. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders, in Williams Textbook of Endocrinology. 2002 : 331-365.
- Laurberg, P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism*, 1984, 33, 379 - 392

BIBLIOGRAPHIE

- Leavitt, S. & Freire, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11, 560 - 566
- Lei, J.; Mariash, C. N.; Bhargava, M.; Wattenberg, E. V. & Ingbar, D. H. T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294, L749-754
- Lennon AM.; Osty J.; Nunez J. Cytosolic thyroxine-binding protein and brain development. *Mol Cell Endocrinol.*, 1980 Jun;18(3):201-14.
- LENNON, A. M. Purification and characterization of rat brain cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 210, 79-85
- Leonard, J. L.; Siegrist-Kaiser, C. A. & Zuckerman, C. J. Regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. Inhibition of actin polymerization blocks enzyme inactivation in cAMP-stimulated glial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265, 940-946
- Lin, H.-Y.; Sun, M.; Tang, H.-Y.; Lin, C.; Luidens, M. K.; Mousa, S. A.; Incerpi, S.; Drusano, G. L.; Davis, F. B. & Davis, P. J. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296, C980-991
- Malinowska, K.; Cavarretta, I. T.; Susani, M.; Wrulich, O. A.; Überall, F.; Kenner, L. & Culig, Z. Identification of μ -crystallin as an androgen-regulated gene in human prostate cancer *The Prostate*, 2009, 69, 1109-1118
- Marin-Garcia, J.; Ananthakrishnan, R. & Goldenthal, M. J. Heart mitochondrial DNA and enzyme changes during early human development. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2000, 210, 47-52
- Mori, J.-i.; Suzuki, S.; Kobayashi, M.; Inagaki, T.; Komatsu, A.; Takeda, T.; Miyamoto, T.; Ichikawa, K. & Hashizume, K. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Cytosolic T3 Binding Protein as a Regulator for T3-Mediated Transactivation. *Endocrinology*, 2002, 143, 1538-1544
- Mousses, S.; Bubendorf, L.; Wagner, U.; Hostetter, G.; Kononen, J.; Cornelison, R.; Goldberger, N.; Elkahloun, A. G.; Willi, N.; Koivisto, P.; Ferhle, W.; Raffeld, M.; Sauter, G. & Kallioniemi, O.-P. Clinical Validation of Candidate Genes Associated with Prostate Cancer Progression in the CWR22 Model System using Tissue Microarrays. *Cancer Research*, 2002, 62, 1256-1260.
- Napoli JL. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr Rev.* 2000 Aug;58(8):230-6.
- Napoli, J. L. Biochemical Pathways of Retinoid Transport, Metabolism, and Signal Transduction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996, 80, S52 - S62

BIBLIOGRAPHIE

- Nicoll, J. B.; Gwinn, B. L.; Iwig, J. S.; Garcia, P. P.; Bunn, C. F. & Allison, L. A. Compartment-specific phosphorylation of rat thyroid hormone receptor [alpha]1 regulates nuclear localization and retention. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2003, 205, 65 - 77
- Pagliarini, D. J.; Calvo, S. E.; Chang, B.; Sheth, S. A.; Vafai, S. B.; Ong, S.-E.; Walford, G. A.; Sugiana, C.; Boneh, A.; Chen, W. K.; Hill, D. E.; Vidal, M.; Evans, J. G.; Thorburn, D. R.; Carr, S. A. & Mootha, V. K. A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell*, 2008, 134, 112 - 123
- Palacios-Romero R, Mowbray J. Evidence for the rapid direct control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine in rats. *Biochem J.* 1979 Dec 15;184(3):527-38.
- Pinna, G.; Brodel, O.; Visser, T.; Jeitner, A.; Grau, H.; Eravci, M.; Meinhold, H. & Baumgartner, A. Concentrations of Seven Iodothyronine Metabolites in Brain Regions and the Liver of the Adult Rat. *Endocrinology*, 2002, 143, 1789-1800
- Pizzagalli, F.; Hagenbuch, B.; Stieger, B.; Klenk, U.; Folkers, G. & Meier, P. J. Identification of a Novel Human Organic Anion Transporting Polypeptide as a High Affinity Thyroxine Transporter. *Mol Endocrinol*, 2002, 16, 2283-2296
- Pollak, N.; Niere, M. & Ziegler, M. NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 33562-33571
- Rozanov, C. B. & Dratman, M. B. Immunohistochemical mapping of brain triiodothyronine reveals prominent localization in central noradrenergic systems. *Neuroscience*, 1996, 74, 897 - 915
- Schroder, I.; Vadas, A.; Johnson, E.; Lim, S. & Monbouquette, H. G. A Novel Archaeal Alanine Dehydrogenase Homologous to Ornithine Cyclodeaminase and micro-Crystallin. *J. Bacteriol.*, 2004, 186, 7680-7689
- SEGAL, J. & INGBAR, S. H. Evidence that an Increase in Cytoplasmic Calcium Is the Initiating Event in Certain Plasma Membrane-Mediated Responses to 3,5,3'-Triiodothyronine in Rat Thymocytes. *Endocrinology*, 1989, 124, 1949-1955
- Shank LC & Paschal BM. Nuclear transport of steroid hormone receptors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2005; 15(1):49-73.
- Shupnik, M. A.; Chin, W. W.; Habener, J. F. & Ridgway, E. C. Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone.. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260, 2900-2903
- Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, *Fed Proc.* 17(4):1107-15

BIBLIOGRAPHIE

- St Germain DL. Development effects of thyroid hormone: the role of deiodinases in regulatory control. *Biochem Soc Trans.* 1999 Feb;27(2):83-8.
- St. Germain, D. L. S. Iodothyronine deiodinase. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 1994, 5, 36 - 42
- Tu, H. M.; Legradi, G.; Bartha, T.; Salvatore, D.; Lechan, R. M. & Larsen, P. R. Regional Expression of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Central Nervous System and Its Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology*, 1999, 140, 784-790
- VANCURA, A.; VANCUROVÁ, I.; VOLC, J.; JONES, S. K. T.; FLIEGER, M.; BASAROVÁ, G. & BAHAL, V. Alanine dehydrogenase from *Streptomyces fradiae*. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 179, 221-227
- Velculescu VE.; Zhang L.; Vogelstein B.; Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.*, 1995 Oct 20;270(5235):484-7.
- Vie, M.-P.; Evrard, C.; Osty, J.; Breton-Gilet, A.; Blanchet, P.; Pomerance, M.; Rouget, P.; Francon, J. & Blondeau, J.-P. Purification, Molecular Cloning, and Functional Expression of the Human Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-Regulated Thyroid Hormone-Binding Protein. *Mol Endocrinol*, 1997, 11, 1728-1736
- Wagner, R. L.; Apriletti, J. W.; McGrath, M. E.; West, B. L.; Baxter, J. D. & Fletterick, R. J. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 1995, 378, 690-697
- Wakabayashi, K.; Tanji, K.; Mori, F. & Takahashi, H. The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology*, 2007, 27, 494-506
- Wei, L.-N.; Chang, L. & Hu, X. Studies of the type I cellular retinoic acid-binding protein mutants and their biological activities. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999, 200, 69-76
- Williams, G. R. Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor beta Isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20, 8329-8342
- WISTOW, G. & KIM, H. Lens Protein Expression In Mammals - Taxon-specificity and the Recruitment of Crystallins. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, 32, 262-269
- Wistow, G. J. & Piatigorsky, J. Lens Crystallins: The Evolution and Expression of Proteins for a Highly Specialized Tissue. *Annual Review of Biochemistry*, 1988, 57, 479-504
- Wistow, G. Lens crystallins: gene recruitment and evolutionary dynamism. *Trends in Biochemical Sciences*, 1993, 18, 301 - 306
- Wu, Z.; Puigserver, P.; Andersson, U.; Zhang, C.; Adelmant, G.; Mootha, V.; Troy, A.; Cinti, S.; Lowell, B.; Scarpulla, R. C. & Spiegelman, B. M. Mechanisms Controlling Mitochondrial

BIBLIOGRAPHIE

Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1
Cell, 1999, 98, 115 - 124

- Yamauchi, K. & Tata, J. R. Characterization of Xenopus cytosolic thyroid-hormone-binding protein (xCTBP) with aldehyde dehydrogenase activity. *Chemico-Biological Interactions*, 2001, 130-132, 309 – 321.
- Yamauchi, K.; Nakajima, J.-i.; Hayashi, H.; Horiuchi, R. & Tata, J. R. Xenopus Cytosolic Thyroid Hormone-binding Protein (xCTBP) Is Aldehyde Dehydrogenase Catalyzing the Formation of Retinoic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 8460-8469
- Yen, P. M. Thyroid Hormones and 3,5-Diiodothyropropionic Acid: New Keys for New Locks. *Endocrinology*, 2006, 147, 1598-1601
- Ying, H.; Araki, O.; Furuya, F.; Kato, Y. & Cheng, S.-Y. Impaired Adipogenesis Caused by a Mutated Thyroid Hormone alpha1 Receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, 27, 2359-2371
- Yonkers, M. A. & Ribera, A. B. Sensory Neuron Sodium Current Requires Nongenomic Actions of Thyroid Hormone During Development. *J Neurophysiol*, 2008, 100, 2719-2725
- Yoshida, A.; Rzhetsky, A.; Hsu, L. C. & Chang, C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 251, 549-557
- Yoshizato, K.; Kistler, A. & Frieden, E. Metal ion dependence of the binding of triiodothyronine by cytosol proteins of bullfrog tadpole tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250, 8337-8343
- ZHANG, X. K. & PFAHL, M. Regulation of Retinoid and Thyroid-hormone Action Through Homodimeric and Heterodimeric Receptors. *Trends In Endocrinology and Metabolism*, 1993, 4, 156-162.

RESUME

Mon projet de thèse s'inscrit dans un vaste projet de caractérisation de protéines nouvellement identifiées dont l'expression est sélective à certaines régions du cerveau. Cette expression sélective pouvant être liée aux phénomènes de dégénérescence neuronale qui caractérisent les maladies neurodégénératives, ces protéines constituent donc des biomarqueurs potentiels. Une étude structurale et physico-chimique a été effectuée sur une dizaine de protéines, dont la protéine CRYM murine (mCRYM) qui fait parti de la famille des Cytosolic- 3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein car elle régule la concentration en hormone thyroïdienne T3 libre dans la cellule. mCRYM appartient également à la famille des μ -crystallines et à la superfamille des μ -crystallines/Ornithines Cyclodésaminases. Les protéines présentant des homologues pour ces trois familles sont la plupart différentes par leur fonction (enzymatique ou structurale), leur localisation tissulaire et leurs caractéristiques physico-chimiques. Cette diversité est due au recrutement de gènes de la superfamille des crystallines pour diverses fonctions métaboliques tout en conservant le taxon spécifique des crystallines.

Je suis parvenue à résoudre sa structure cristallographique complexée au NADP(H) et à l'hormone thyroïdienne T3 à une résolution de 1,75 Å. La protéine mCRYM est un exemple intéressant d'évolution par son appartenance à différentes familles de protéines et, à ce jour, aucune activité enzymatique n'a été identifiée. Sa caractérisation structurale et thermodynamique a donc permis de mettre en évidence les différences et les similitudes avec ses homologues enzymatiques et d'émettre des hypothèses quant à son évolution moléculaire. Ces résultats soulèvent de nouvelles questions concernant son rôle physiologique : mCRYM est-elle une enzyme ou une protéine structurale ? Comment intervient le couple redox NADPH/NADP⁺ pour réguler l'action génomique et/ou non génomique de l'hormone T3 ? L'hormone T3 est-il le seul ligand physiologique de CRYM dans le cerveau ?

Mots Clés : CRYM, 3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3), NADPH/ NADP⁺, superfamille μ -crystallines/OCDs, biomarqueurs de maladies neurodégénératives, Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein (CTBP).

ABSTRACT

My Ph.D. work takes part of a larger project dedicated to the characterization of proteins newly involved into selective expression of certain mouse brain regions. This selective expression being potentially linked to neuronal degeneration associated with neurodegenerative diseases, the corresponding proteins are therefore potential biomarkers.

A structural and physico-chemical study has been performed on about ten proteins including CRYM of mouse (mCRYM), which belongs to the Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein family since it regulates the concentration of free thyroid hormone, T3, in the cell. mCRYM also belongs to the μ -crystallin family and to the μ -crystallins/Ornithin Cyclodesaminases superfamily. Proteins displaying sequence homologies to these three families of proteins have generally different functions (enzymatic or structural), different tissue localisation and different physico-chemical properties. This diversity is due to the recruitment of genes of the crystalline superfamily to carry different metabolic functions while preserving the taxon-specific crystallins.

I have managed to resolve the crystallographic structure of mCRYM in complex with NADP(H) and the thyroid hormone, T3, to 1.75 Å resolution. mCRYM is a very interesting evolution specimen as it belongs to a different family of proteins. However, no enzymatic function has ever been demonstrated for mCRYM. Its structural and thermodynamical characterization has revealed similitudes and divergences with the enzymatic homologues of CRYM and has allowed us to make hypothesis relative to its molecular evolution. These results raise new questions concerning the physiological role of mammalian CRYM: is CRYM an enzyme or a structural protein? How does the NADPH/NADP⁺ redox couple regulates the genomic and/or non genomic action of the T3 hormone? Is the T3 hormone the only physiological ligand of CRYM in the brain?

Keys words: mCRYM, 3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3), NADPH/NADP⁺, μ -crystallins/ Ornithin Cyclodesaminases, superfamily, biomarkers of neurodegenerative disease, Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein (CTBP).

RESUME

Mon projet de thèse s'inscrit dans un vaste projet de caractérisation de protéines nouvellement identifiées dont l'expression est sélective à certaines régions du cerveau. Cette expression sélective pouvant être liée aux phénomènes de dégénérescence neuronale qui caractérisent les maladies neurodégénératives, ces protéines constituent donc des biomarqueurs potentiels. Une étude structurale et physico-chimique a été effectuée sur une dizaine de protéines, dont la protéine CRYM murine (mCRYM) qui fait parti de la famille des Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein car elle régule la concentration en hormone thyroïdienne T3 libre dans la cellule. mCRYM appartient également à la famille des μ -crystallines et à la superfamille des μ -crystallines/Ornithines Cyclodésaminases. Les protéines présentant des homologies pour ces trois familles sont la plupart différentes par leur fonction (enzymatique ou structurale), leur localisation tissulaire et leurs caractéristiques physico-chimiques. Cette diversité est due au recrutement de gènes de la superfamille des cristallines pour diverses fonctions métaboliques tout en conservant le taxon spécifique des cristallines.

Je suis parvenue à résoudre sa structure cristallographique complexée au NADP(H) et à l'hormone thyroïdienne T3 à une résolution de 1,75 Å. La protéine mCRYM est un exemple intéressant d'évolution par son appartenance à différentes familles de protéines et, à ce jour, aucune activité enzymatique n'a été identifiée. Sa caractérisation structurale et thermodynamique a donc permis de mettre en évidence les différences et les similitudes avec ses homologues enzymatiques et d'émettre des hypothèses quant à son évolution moléculaire. Ces résultats soulèvent de nouvelles questions concernant son rôle physiologique : mCRYM est-elle une enzyme ou une protéine structurale ? Comment intervient le couple redox NADPH/NADP⁺ pour réguler l'action génomique et/ou non génomique de l'hormone T3 ? L'hormone T3 est-il le seul ligand physiologique de CRYM dans le cerveau ?

Mots Clés : CRYM, 3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3), NADPH/NADP⁺, superfamille μ -crystallines/OCDs, biomarqueurs de maladies neurodégénératives, Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein (CTBP).

ABSTRACT

My Ph.D. work takes part of a larger project dedicated to the characterization of proteins newly involved into selective expression of certain mouse brain regions. This selective expression being potentially linked to neuronal degeneration associated with neurodegenerative diseases, the corresponding proteins are therefore potential biomarkers.

A structural and physico-chemical study has been performed on about ten proteins including CRYM of mouse (mCRYM), which belongs to the Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein family since it regulates the concentration of free thyroid hormone, T3, in the cell. mCRYM also belongs to the μ -crystallin family and to the μ -crystallins/Ornithin Cyclodesaminases superfamily. Proteins displaying sequence homologies to these three families of proteins have generally different functions (enzymatic or structural), different tissue localisation and different physico-chemical properties. This diversity is due to the recruitment of genes of the crystalline superfamily to carry different metabolic functions while preserving the taxon-specific crystallins.

I have managed to resolve the crystallographic structure of mCRYM in complex with NADP(H) and the thyroid hormone, T3, to 1.75 Å resolution. mCRYM is a very interesting evolution specimen as it belongs to a different family of proteins. However, no enzymatic function has ever been demonstrated for mCRYM. Its structural and thermodynamical characterization has revealed similitudes and divergences with the enzymatic homologues of CRYM and has allowed us to make hypothesis relative to its molecular evolution. These results raise new questions concerning the physiological role of mammalian CRYM: is CRYM an enzyme or a structural protein? How does the NADPH/NADP⁺ redox couple regulates the genomic and/or non genomic action of the T3 hormone? Is the T3 hormone the only physiological ligand of CRYM in the brain?

Keys words: mCRYM, 3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3), NADPH/NADP⁺, μ -crystallins/ Ornithin Cyclodesaminases, superfamily, biomarkers of neurodegenerative disease, Cytosolic-3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)-Binding Protein (CTBP).