



HAL
open science

Étude par RMN de la créatine kinase musculaire et d'un nouveau domaine de liaison à l'ubiquitine dans la protéine STAM2

Gwladys Rivière

► **To cite this version:**

Gwladys Rivière. Étude par RMN de la créatine kinase musculaire et d'un nouveau domaine de liaison à l'ubiquitine dans la protéine STAM2. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10285 . tel-00861128

HAL Id: tel-00861128

<https://theses.hal.science/tel-00861128>

Submitted on 12 Sep 2013

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.

N° Ordre : 285-2011

Année 2011

THESE de l'UNIVERSITE DE LYON

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON1

Ecole doctorale de Chimie

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité Chimie

par

Gwladys RIVIERE

Etude par RMN de la créatine kinase musculaire et
d'un nouveau domaine de liaison à l'ubiquitine dans la protéine
STAM2

Directeur de thèse : Professeur Jean-Marc LANCELIN

Co- encadrante de thèse : Docteur Maggy HOLOGNE

JURY :

Jean-Marc	LANCELIN	Directeur de thèse
Maggy	HOLOGNE	Co- encadrante
Pierre	GANS	Rapporteur
Gildas	BERTHO	Rapporteur
Olivier	COUX	Examineur
Patrice	GOUET	Examineur

THESE de l'UNIVERSITE DE LYON

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON1

Ecole doctorale de Chimie

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité Chimie

par

Gwladys RIVIERE

Etude par RMN de la créatine kinase musculaire et
d'un nouveau domaine de liaison à l'ubiquitine dans la protéine
STAM2

Directeur de thèse : Professeur Jean-Marc LANCELIN

Co- encadrante de thèse : Docteur Maggy HOLOGNE

JURY :

Jean-Marc	LANCELIN	Directeur de thèse
Maggy	HOLOGNE	Co- encadrante
Pierre	GANS	Rapporteur
Gildas	BERTHO	Rapporteur
Olivier	COUX	Examineur
Patrice	GOUET	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

Remerciement

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe ANABIO de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) - UMR5280, dirigée par le Pr. Jean-Marc LANCELIN. Mes travaux ont été subventionnés par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), le pôle mondial de compétitivité LYONBIOPOLE, la Région Rhône-Alpes et son cluster de recherche chimie.

Je remercie Monsieur Pierre GANS, ingénieur de recherche au CEA de Grenoble, ainsi que Monsieur Gildas BERTHO, ingénieur de recherche - CNRS au sein du laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Et également Monsieur Olivier COUX, chercheur CNRS du centre de recherche de biochimie macromoléculaire d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et plus particulièrement Monsieur Patrice GOUET, professeur à l'université Claude Bernard Lyon1 à Villeurbanne, qui a présidé ce jury de thèse. Merci pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien et qui ont rendu possible ce travail. Tout d'abord, le Pr. Jean-Marc LANCELIN qui m'a donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire et de travailler sur cette thèse. Merci pour ses conseils quant à l'évolution de mon travail que pour la rédaction de ce manuscrit. Mes sincères remerciements au Dr Maggy HOLOGNE, co-encadrante de choc, qui m'a initié à la RMN et qui a été présente tout au long de ses trois années. Je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils, et ta présence dans les périodes les plus noires de cette expérience. Merci au Dr Olivier WALKER de m'avoir proposé le sujet sur la caractérisation du domaine SH3 en présence d'ubiquitine, pour ses conseils, ses explications concernant la relaxation ou encore le paramagnétisme.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe ODMB de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire et particulièrement le Pr. Olivier Marcillat sans qui l'acquisition des différents échantillons des protéines étudiées au cours de ma thèse n'aurait pas été possible. Je remercie également le Pr. Oliver MARCILLAT d'avoir été disponible lorsque j'avais des questions à poser.

Enfin un très grand merci à Julien PONS, Florence GUILLERE, Sabine LAURENT, Liberty FRANCOIS, Mouhedine CHENIOUR, Christophe GILBERT, qui ont grandement contribué à rendre ce travail vraiment agréable. Je leur exprime ma profonde sympathie.

Tout ce parcours n'aurait, bien sûr, pas été possible sans la bienveillance de mes parents et surtout de ma mère qui m'a permis de faire mes études, protégé du besoin, et qui m'a chaque jour montré son amour.

Chacun a contribué à sa manière à rendre agréable et passionnant mon 'apprentissage' du métier de chercheur et ma reconnaissance s'adresse à tous ceux qui, de près ou de loin, ont permis que ce travail se réalise. Merci à tous !

Résumé:

L'étude structurale et dynamique de complexes protéine-protéine et protéine-ligand est très importante pour comprendre et élucider la fonction d'une protéine. Au cours de cette thèse, nous avons étudié deux protéines par RMN : la créatine kinase musculaire (CK-MM) et le domaine UIM-SH3 de la protéine STAM2, seuls ou en interaction avec leurs partenaires.

La CK-MM est une enzyme active sous forme dimérique. Elle appartient à la famille des guanidino-kinases et intervient dans le processus énergétique de la cellule en catalysant la conversion de la créatine en phosphocréatine en présence de MgATP. Le but de l'étude était d'élucider le mode de fonctionnement de la CK-MM. Pour cela, nous avons enregistré des expériences de relaxation R_1 , R_2 et des expériences de perturbation de déplacement chimique sur la CK-MM libre et complexée avec MgADP et avec un complexe ternaire inhibiteur MgADP-créatine-nitrate. Ces expériences montrent que la boucle 320s, spécifique à la reconnaissance des substrats, possède une dynamique rapide (de l'ordre de la nanoseconde) en absence de substrats et une dynamique ralentie en présence de substrats. La fixation des substrats dans les sites actifs de la CK-MM induit des modifications conformationnelles importantes.

La protéine STAM2 est composée de deux domaines d'interaction à l'ubiquitine VHS, et UIM et d'un domaine SH3 connu pour interagir avec des déubiquitinasés UBPY et AMSH. Cette protéine est impliquée dans la voie de dégradation lysosomale. L'objectif de cette étude est la caractérisation du complexe SH3/ubiquitine. Pour cela, nous avons enregistré des expériences de perturbation de déplacement chimique et de relaxation R_1 , R_2 et nOes sur le complexe UIM-SH3/ubiquitine. Ces expériences mettent en évidence que les domaines UIM et SH3 sont capables d'interagir chacun avec une ubiquitine. L'interface entre les UBDs et l'ubiquitine implique majoritairement des résidus hydrophobes et conservés. L'affinité de ces domaines pour l'ubiquitine est de l'ordre de la centaine de micromolaire. Afin de mieux caractériser le complexe UIM-SH3/ubiquitine nous avons enregistré des expériences de compétition entre un peptide dérivé d'UBPY et l'ubiquitine sur le domaine SH3. Le peptide d'UBPY et l'ubiquitine interagissent sur la même surface du domaine SH3. Ces expériences mettent en évidence que le peptide UBPY est plus affine pour le domaine SH3 que l'ubiquitine. L'ensemble de ces résultats permettent de comprendre la fonction et la régulation de la protéine STAM2.

Mots clés : Interaction protéine-protéine et protéine-ligands par RMN, créatine kinase, TSAC, UIM-SH3, STAM2, ubiquitine, UBPY.

Abstract:

The structural and dynamical study of protein-protein and protein-ligand interactions is very important to understand and elucidate the function of a protein. In this thesis, we study two proteins by NMR: the muscular creatine kinase (CK-MM) and the SH3 domain of STAM2 protein, in the free and complexed forms.

CK-MM is an active homodimeric enzyme which belongs to the guanidino-phosphagen-kinase family. This enzyme is involved in energetic process in the cell in catalyzing the conversion of creatine into phosphocreatine in the presence of MgATP. The aim of this study is to elucidate the functional mode of the CK-MM. For this purpose, we measured R_1 and R_2 relaxation rates and chemical shift perturbation experiments on the substrate-free CK-MM, the CK-MM/MgADP complex, and the inhibitory ternary complex CK-MM/MgADP-creatine-nitrate. The experiments show that the loop 320s, specific recognition of the substrates, possesses a fast dynamic in absence of substrates (in the order of nano-picosecond) and a slower dynamic in presence of creatine-MgADP-nitrate ion. The binding of the substrate in the two active sites induces of significant conformational modification of the CK-MM.

STAM2 protein consists in two ubiquitin binding domains (VHS and UIM) and a SH3 domain which interacts with deubiquinating enzymes AMSH and UBPY. This protein is involved in the lysosomal degradation pathway. The aim of this study is the characterization of the interaction between SH3 domain of STAM2 and ubiquitin. For this, we recorded the R_1 , R_2 , nOes relaxation experiments and chemical shift perturbation experiments on the UIM-SH3/ubiquitin complex. These experiments show that SH3 and UIM domains interact each with a single ubiquitin. The interface between these UBDs and ubiquitin, involves mainly hydrophobic and conserved amino-acids. The affinity of UBDs (UIM and SH3 domains) for ubiquitin is of hundred micromolars order. For further characterization of the UIM-SH3/ubiquitin complex, we recorded competition experiments between UBPY peptide and single ubiquitin on SH3 domain. The UBPY peptide and ubiquitin interact with SH3 domain on the same surface. These experiments indicate that the UBPY peptide is more affine than ubiquitin. All of the results improve the knowledge about the function and regulation of the protein STAM2.

Key words : protein-protein and protein-ligands interaction by NMR, creatine kinase, TSAC, UIM-SH3, STAM2, ubiquitin, UBPY.

Sommaire:

Introduction générale	1
Chapitre I : La Créatine Kinase (CK)	4
I. Contexte biologique et biochimique.....	4
I.1.Base de connaissance actuelle de la créatine kinase.....	4
I.1.1.Les isoenzymes de la créatine kinase.....	6
I.1.1.1.Les isoenzymes cytoplasmiques	6
I.1.1.2.Les isoenzymes mitochondriales.....	6
I.1.1.3.Homologie de séquence des isoenzymes de la créatine kinase	7
I.1.1.4.La navette phosphocréatine : "phosphocreatine shuttle"	9
I.1.2.Le mécanisme enzymatique de la CK.....	11
I.1.2.1.La catalyse enzymatique	11
I.1.2.2.Les constantes d'affinités	12
I.1.2.3.Les inhibiteurs.....	15
I.1.3.Etude structurale et fonctionnelle de la CK-MM	16
I.1.3.1.Structure cristallographique de la CK-MM.....	16
I.1.3.2.Le site actif.....	19
I.1.3.2.1.Changement conformationnel dû à la fixation des substrats dans le site actif : mouvement des boucles 60s et 320s.....	19
I.1.3.2.2.Site de fixation nucleotide	22
I.1.3.2.3.Site d'interaction de la créatine.....	24
I.1.3.2.4.Le cation Mg²⁺ et l'anion NO³⁻	27
I.2.Le rôle de la structure quaternaire dans la catalyse enzymatique de la CK- MM : dimère ou monomère actif ?.....	29
II. Matériels et méthodes	31
II.1.Obtention de la CK-MM pure, marquée et stable.....	31
II.1.1.Matériel biologique.....	31
II.1.1.1.Plasmide codant pour la CK-MM de lapin	31
II.1.1.2.Souche bactérienne d'expression.	32
II.1.2.Production et purification de la protéine CK-MM de lapin.....	33
II.1.2.1.Production de la CK-MM non marquée et marquée uniformément en ¹⁵N.....	33

II.1.2.2.Stratégie de marquage d'une protéine de haut poids moléculaire la CK-MM (86 kDa).....	34
II.1.2.2.1... Marquage isotopique U- ² H/ ¹⁵ N ou U- ² H/ ¹⁵ N/ ¹³ C de la CK-MM	38
II.1.2.2.2.Marquage U- ² H et ¹⁵ N- {Gly, Val Ala} de la CK-MM.....	39
II.1.2.2.3.Purification	40
II.1.3.Etape de dénaturation / renaturation de la CK-MM deutérée	42
II.1.4.Mesure d'activité enzymatique par le « pH-stat ».....	44
II.2.Méthodes RMN : Etude dynamique de la CK-MM.....	45
II.2.1.Méthodes générales :	45
II.2.2.Les expériences 2D : HSQC et HSQC-TROSY.	46
II.2.2.1.HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).....	46
II.2.2.2.Séquence TROSY	46
II.2.3.Attribution de la CK-MM.....	47
II.2.4.Expériences de relaxation R_1 , R_2	49
III. Résultats et discussion.....	51
III.1.Attribution de la créatine kinase (CK-MM).....	51
III.2.Etude dynamique de la boucle 320s en présence de MgADP, nitrate et créatine.....	64
III.2.1.Perturbation des déplacements chimiques de la boucle 320s de la CK-MM lors de l'ajout des constituants du complexe de l'état analogue de transition.....	64
III.2.2.Mesure des vitesses de relaxations R_1 et R_2 de la boucle 320s lors de l'ajout des constituants du TSAC.....	70
IV. Conclusion :	84
Chapitre II : Le domaine UIM-SH3 de STAM2	95
I Contexte biologique de la protéine STAM2.....	95
I.1.La voie de dégradation lysosomale	96
I.1.1.Ubiquitination et reconnaissance des récepteurs ubiquitinés	96
I.1.1.1.L'ubiquitination	96
I.1.1.2.Reconnaissance des récepteurs ubiquitinés par des UBDs.....	99

I.1.2.Les voies d'internalisation.....	102
I.1.2.1.L'endocytose.....	102
I.1.2.1.1.Diversité des voies d'endocytose chez les cellules eucaryotes supérieures.....	102
I.1.2.1.2. Mécanisme de l'endocytose : modèle endocytose du récepteur EGFR.....	104
I.1.2.2.Synthèse des corps multi-vésiculaires : les complexes ESCRTs	106
I.1.2.2.1.ESCRTs	106
I.1.2.2.2.Le rôle des DUBs : AMSH et UBPY dans la formation des MVBs.....	110
I.1.2.3.Régulation de la voie de dégradation lysosomale.....	112
I.1.2.3.1.La mono-ubiquitination couplée	112
I.1.2.3.2.UBPY et AMSH.	114
I.2.La protéine STAM 2.....	114
I.2.1.Le domaine UIM	116
I.2.2.Le domaine SH3	119
I.2.2.1.SH3 en interaction avec les motifs riches en proline.....	120
I.2.2.2.SH3 est un domaine en interaction avec l'ubiquitine (UBDs).....	121
I.2.2.3.Le domaine SH3 de STAM2.....	123
II. Matériels et méthodes	127
II.1.Matériel biologique.....	127
II.1.1.Production et purification des domaines UIM-SH3 de STAM2.....	127
II.1.1.1.Production UIM-SH3 non marquée et marquée uniformément en ¹⁵ N et ou ¹³ C.	127
II.1.1.2.Purification.....	128
II.1.2.Production et purification de l'enzyme de clivage TEV.	131
II.1.3.Production et purification de Ub ¹⁴ N et ¹⁵ N.	131
II.1.3.1.Production d'ubiquitine sauvage ou mutée, non marquée ou uniformément marquée en ¹⁵ N.....	131
II.1.3.2.Purification.....	132
II.2.Méthodes RMN.	133
II.2.1.Méthodes générales.....	133
II.2.2.Attribution de la protéine UIM-SH3	133

II.2.3. Etude structurale des complexes UIM-SH3/ubiquitine et UIM-SH3 / ubiquitine /peptide UBPY	133
II.2.3.1. Expérience de titration et analyses	133
II.2.3.2. Détermination de la stœchiométrie de l'interaction : mesure des vitesses de relaxation longitudinale R_1 et transversale R_2 et mesure de paramètre nOe	135
II.2.3.3. Détermination de distance : expérience de perturbation de relaxation par paramagnétique et marquage Ub (K48C) par MTSL.....	138
III. Résultats et discussion.....	141
III.1. Attribution de la protéine UIM-SH3	141
III.2. Le complexe UIM-SH3/ ubiquitine.....	143
III.2.1. Caractérisation du complexe UIM-SH3/ ubiquitine.....	144
III.2.1.1. Surface d'interaction sur la protéine UIM-SH3.	144
III.2.1.2. Surface d'interaction sur l'ubiquitine.....	152
III.2.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe UIM-SH3/ ubiquitine.	156
III.3. Expériences de compétition entre le dérivé UBPY et l'ubiquitine sur UIM-SH3	160
III.3.1. Compétition entre le peptide UBPY et l'ubiquitine.....	162
III.3.2. Expériences de relaxation.....	165
III.4. Construction d'un modèle structural du complexe UIM-SH3/Ub (Résultats préliminaires)	169
IV. Conclusion et perspectives:	174
Bibliographie:	177
Conclusion générale	184
Liste des abréviations.....	189
Annexes	191

Introduction générale

Les protéines assurent une grande majorité des fonctions cellulaires et sont essentielles à la vie d'un organisme complexe ou d'une simple cellule (procaryote ou eucaryote). Les protéines peuvent être classées selon leurs fonctions (1, 2):

- Les protéines de structure : elles assurent le maintien de l'intégrité structurale dans l'espace par le biais du cytosquelette (actine) et la protection contre le milieu extérieur.
- Les protéines de transport : elles assurent le transport des différentes molécules telles que l'oxygène (hémoglobine) et les ions métalliques (pompes ioniques et canaux ioniques).
- Les enzymes : elles peuvent catalyser des réactions chimiques du métabolisme telles que la glycolyse, le cycle de l'urée, etc. D'autres peuvent catalyser des modifications post traductionnelles des protéines telles que l'ubiquitination ou la phosphorylation.
- Les protéines de signalisation : elles assurent la reconnaissance, l'analyse et la réponse de la cellule face à un stimulus extérieur ou à une information qu'elle reçoit au sein d'un organisme. Elles reconnaissent spécifiquement des modifications de l'environnement extérieur comme la température, la pression, mais peuvent aussi interagir avec des molécules comme les hormones, les neuromédiateurs, les facteurs de croissance, etc. Ces protéines sont localisées soit à la surface cellulaire, soit dans le cytoplasme ou sur d'autres cellules appelées 'cellules cibles'.
- Les protéines de régulation : elles assurent un rôle dans la régulation de la compaction de l'ADN (histone) ou l'expression des gènes via les facteurs de transcription.

Une protéine est souvent impliquée dans des complexes protéiques ou dans des interactions avec de petites molécules telles que les hormones, les facteurs de croissance, ou les substrats dans le cas d'une enzyme. Ces interactions biomoléculaires sont responsables de la régulation de la fonction, de la localisation cellulaire de la protéine, et de sa dégradation si elle est rendue non fonctionnelle. Les interactions biomoléculaires peuvent être stables (matrice extracellulaire), transitoires (anticorps-antigène) ou facilitées par des domaines de reconnaissance protéique tels que SH2 (3), SH3 (4, 5) ou PDZ (6).

Afin de comprendre la fonction d'une protéine, il est nécessaire d'étudier la structure tridimensionnelle et la dynamique de la protéine seule et en interaction avec ses partenaires. Pour cela, il existe plusieurs méthodes d'investigations (7, 8) :

- Les méthodes biophysiques : elles permettent d'obtenir des informations structurales et dynamiques sur les interactions biomoléculaires. La taille du complexe peut être déterminée par centrifugation analytique. Son affinité peut être obtenue par plusieurs techniques comme : la fluorescence, la résonance plasmonique de surface (SPR) et la calorimétrie (ITC). Sa dynamique peut être étudiée par plusieurs méthodes telles que des expériences d'échange isotopique $^1\text{H}/^2\text{H}$ couplées à la spectrométrie de masse (μs à la ms).
- Les méthodes physiques : la cristallographie et la RMN permettent d'obtenir une caractérisation des interactions biomoléculaires à l'échelle atomique.

La résonance magnétique nucléaire a été la principale technique utilisée ici pour l'étude de deux interactions biomoléculaires : protéine - ligand et protéine - protéine. Cette technique a été choisie car elle présente de nombreux avantages tels que : la résolution atomique, l'étude dans des conditions non destructrices pour l'échantillon et dans des conditions proches de l'environnement physiologique (liquide). Elle permet également une étude complète d'un complexe biomoléculaire grâce à une combinaison d'expériences qui permettent la caractérisation des sites d'interaction et l'étude structurale et dynamique (à différentes échelles de temps expérimentales). En effet, l'expérience de perturbation de déplacement chimique (CSP : *Chemical Shift Perturbation*) permet de caractériser dans certains cas les sites d'interaction en identifiant les résidus impliqués dans l'interaction et en déduire la constante de dissociation du complexe. Pour étudier la dynamique (9, 10), des expériences de relaxation R_1 , R_2 et nOes permettent de visualiser des mouvements rapides de l'ordre de la ps – ns. Des expériences de types CPMG ou la mesure des couplages dipolaires résiduels (RDC) permettent de caractériser des mouvements plus lents (ms à μs) (11). La structure du complexe peut être modélisée à partir des contraintes de distances et d'orientation obtenues à partir des expériences de paramagnétisme, de nOes et des mesures de RDC.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre est consacré à l'étude de l'interaction de la créatine kinase musculaire (CK-MM) avec ses substrats, notamment le complexe inhibiteur : créatine-nitrate-MgADP. Nous réaliserons également une étude des modifications dynamiques induites par la fixation de ces substrats. La CK-MM est une enzyme homodimérique qui intervient dans le métabolisme énergétique de la cellule. L'étude dynamique de cette enzyme en présence de ses ligands apporte des éléments complémentaires à ceux existant pour une meilleure compréhension de son mécanisme fonctionnel.

Dans le second chapitre, nous étudions l'interaction entre deux protéines, le domaine UIM-SH3 d'une protéine modulaire STAM2 et l'ubiquitine. Ces deux protéines jouent un rôle essentiel dans la voie de dégradation lysosomale. STAM2 est capable de reconnaître les récepteurs membranaires destinés à la dégradation grâce à leur modification post-traductionnelle : l'ubiquitination. Sa fonction peut être modulée par l'interaction de différents partenaires tels que les protéines UBPY et AMSH. L'étude de ces différentes interactions permettra d'approfondir nos connaissances sur la fonction de la protéine STAM2 et plus précisément sur celle de son domaine SH3.

Bibliographie :

1. Campbell, N. a. R., J. (2007) *Biologie*, Pearson Education France, Paris, France.
2. Voet, D. a. V., J.G. (1995) *Biochemistry second edition*, John wiley & sons, USA.
3. Filippakopoulos, P., Muller, S., and Knapp, S. (2009) SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity, *Curr Opin Struct Biol* 19, 643-649.
4. Mayer, B. J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation, *J Cell Sci* 114, 1253-1263.
5. Boggon, T. J., and Eck, M. J. (2004) Structure and regulation of Src family kinases, *Oncogene* 23, 7918-7927.
6. Nourry, C., Grant, S. G., and Borg, J. P. (2003) PDZ domain proteins: plug and play!, *Sci STKE* 2003, RE7.
7. Schuck, P. (2007) *Protein interactions: Biophysical approaches for the study of complex reversible systems.*, Springer, USA.
8. Zhang, A. (2009) *Protein interaction networks: computational analysis.*, Cambridge university press, USA.
9. Boehr, D. D., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2006) An NMR perspective on enzyme dynamics, *Chem Rev* 106, 3055-3079.
10. Jarymowycz, V. A., and Stone, M. J. (2006) Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences, *Chem Rev* 106, 1624-1671.
11. Akke, M. (2002) NMR methods for characterizing microsecond to millisecond dynamics in recognition and catalysis, *Curr Opin Struct Biol* 12, 642-647.

Chapitre I : La Créatine Kinase (CK)

I. Contexte biologique et biochimique

I.1. Base de connaissance actuelle de la créatine kinase

Tous les processus permettant la croissance et le fonctionnement cellulaires nécessitent un apport d'énergie. L'adénosine triphosphate (ATP) constitue la réserve d'énergie universelle dans le monde vivant. Dans les tissus excitables tels que les muscles squelettique et cardiaque, la concentration d'ATP est relativement faible (3 à 5mM). Elle permet de répondre à une augmentation de l'activité cellulaire durant seulement quelques secondes. Pourtant, lors de l'activation des cellules pour lesquelles la demande en énergie est fluctuante et importante, aucune baisse immédiate de la concentration en ATP n'est observée indiquant l'existence d'une autre forme de réserve énergétique. De fortes quantités de phosphagènes sont accumulées dans ces cellules ou tissus excitables (jusqu'à 40mM dans les muscles squelettiques). Ce sont des réservoirs de "phosphate à haute énergie" qui, grâce aux guanidino-phosphagènes kinases, permettent de maintenir constants par interconversion les niveaux d'ATP intracellulaire. Ces enzymes (GdnK EC 2.7.3.X) catalysent le transfert réversible du groupement γ -phosphate de l'ATP vers l'accepteur guanidilique générant de l'ADP et le phosphagène correspondant (Pgdn) selon la réaction suivante:



Neuf phosphagènes ont été identifiés dans plusieurs espèces animales. Ce sont tous des dérivés guanidiliques qui se différencient par leurs substituants. A chacun des phosphagènes correspond une phosphotransférase (Figure1).

L'enzyme étudiée dans ce premier chapitre est la créatine kinase (CK). Elle a été découverte en 1928 par Eggleton (1), puis caractérisée pour la première fois en 1934 par Lohman (2). Le composé guanidilique utilisé par la créatine kinase est présent uniquement chez les vertébrés, il s'agit de la créatine. Toutefois, la CK est aussi présente chez certains invertébrés incluant les spongiaires (éponges). Il existe cinq isoenzymes de la créatine kinase : trois sont localisées dans le cytoplasme et deux dans les mitochondries.

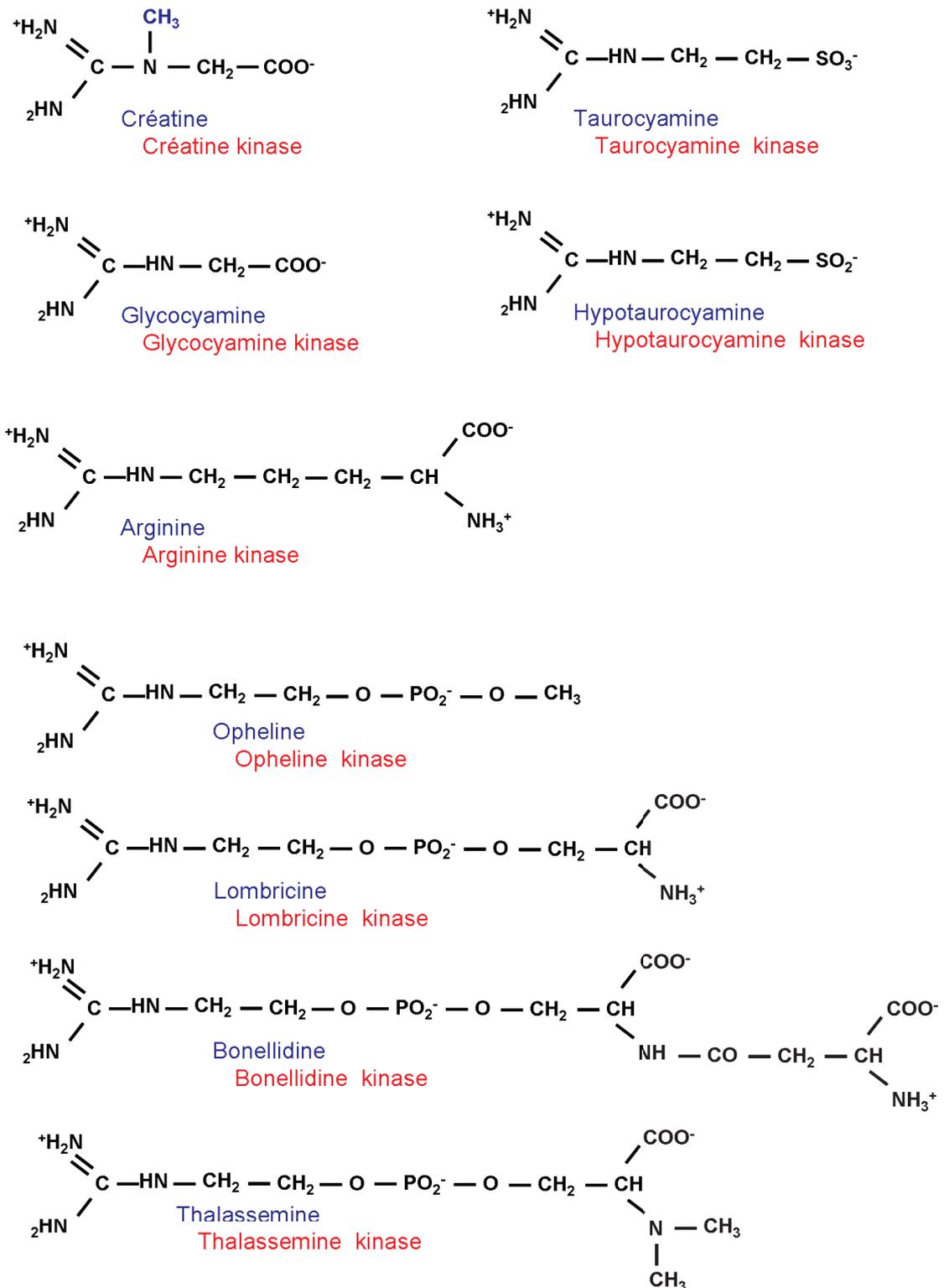


Figure 1 : Récapitulatif des neuf "précurseurs de phosphagènes" naturels. Le nom de chaque composé guanidilique est écrit en bleu et ceux des guanidino-kinases (phosphotransférases) associées sont en rouge.

I.1.1. Les isoenzymes de la créatine kinase

I.1.1.1. Les isoenzymes cytoplasmiques

Ces isoenzymes existent exclusivement sous forme dimérique et se caractérisent par leurs sous-unités M et B (3). Chez l'homme, ces sous-unités sont codées par deux gènes distincts localisés sur les chromosomes 19 et 14, respectivement (4, 5). Les sous-unités M et B s'associent pour former trois types d'isoenzymes:

- CK-MM présente dans les cellules musculaires ; cette isoenzyme a été purifiée pour la première fois en 1954 à partir de muscle de lapin (6).
- CK-BB présente dans les tissus nerveux et du cerveau.
- CK-MB présente en petite quantité dans les cellules cardiaques, les poumons et l'estomac (7). Cet hétéro-dimère peut être obtenu artificiellement par dénaturation et renaturation d'un mélange de dimère CK-MM et CK-BB (8, 9).

Bien qu'elles soient dimériques et qu'elles aient la même masse moléculaire (entre 42 et 43 kDa pour un monomère selon l'espèce et les isoformes), les CK cytosoliques peuvent facilement être séparées par électrophorèse en condition non dénaturantes grâce à leur point isoélectrique différent. Le point isoélectrique (pI) de la CK-MM et CK-BB varie de 7,2 à 7,8, et 5,2 à 5,6 respectivement, selon les espèces. Cette différence est due principalement aux 14 lysines supplémentaires de la sous-unité M. Le pI de l'hybride CK-MB a une valeur intermédiaire.

I.1.1.2. Les isoenzymes mitochondriales

Dans le génome humain, les deux isoenzymes mitochondriales (CKmt) sont codées par deux gènes distincts localisés sur le chromosome 5 pour l'isoforme sarcomérique (sCKmt) (10) et sur le chromosome 15 pour l'isoforme ubiquitaire (uCKmt) (11). Cette dernière est exprimée principalement dans le rein, le placenta, les intestins et le cerveau, alors que la sCKmt est localisée dans le myocarde, et les muscles squelettiques (12, 13). La uCKmt diffère de la sCKmt par 10 à 30 résidus N-terminaux. Il existe deux formes stables interconvertibles actives, une forme dimérique et une forme octamérique.

Les isoenzymes mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol sous forme de précurseur avec un peptide de transit à l'extrémité N-terminale clivable. Il permet l'adressage vers l'espace inter-membranaire des mitochondries (14, 15) où les dimères ou octamères sont formés. Les formes mitochondriales sont toujours co-exprimées avec des formes cytosoliques, la CK-mt sarcomérique avec la CK-MM et la CK-mt ubiquitaire avec la CK-BB.

I.1.1.3. Homologie de séquence des isoenzymes de la créatine kinase

Un monomère de créatine kinase est constitué de 381 acides aminés. Des travaux comparatifs de séquence ont permis de mettre en évidence une grande homologie au sein des isoenzymes de la CK :

- de 77 à 82 % entre la CK-MM et la CK-BB selon les espèces,
- de 82 à 84 % entre les CK-mt sarcomérique et ubiquitaire,
- de 60 à 65% entre les isoformes cytosoliques et mitochondriales.

La comparaison de séquence entre la CK et d'autres guanidino kinases montre une homologie plus faible. Par exemple, entre l'arginine kinase et la CK il y a environ 38 à 44 % d'homologie. Néanmoins, 48 résidus sont conservés dans toutes les phosphagènes kinases dont certains résidus clefs. L'alignement des séquences protéiques des différentes isoenzymes de la CK met en évidence six régions de forte similitude séparées par sept régions moins conservées, notamment dans les régions N et C- terminales (16) (Figure 2). Les régions conservées sont impliquées essentiellement dans les fonctions catalytiques et dans la zone de contact monomère- monomère.

I.1.1.4. La navette phosphocréatine : "phosphocreatine shuttle"

Le système créatine kinase/phosphocréatine forme un réseau de distribution d'énergie cellulaire complexe, appelé navette phosphocréatine, connectant les sites intracellulaires de production d'ATP (mitochondrie et glycolyse) avec les sites de consommation d'ATP (ATPase) (9) (Figure 3).

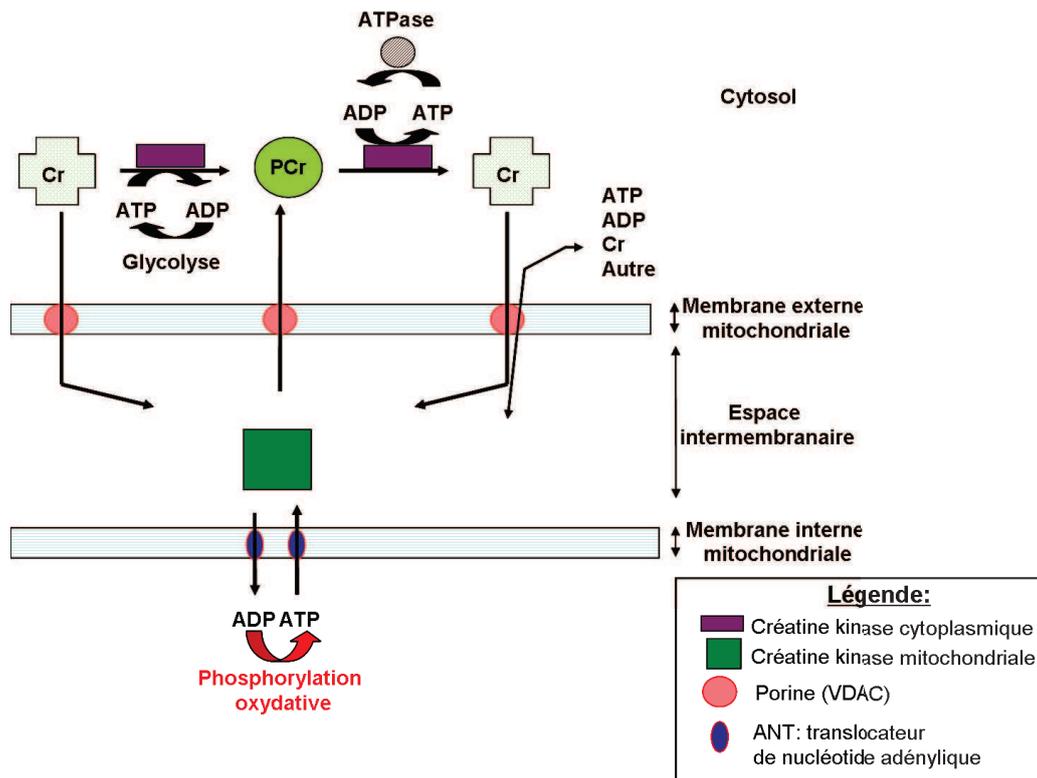


Figure 3 : Schéma de la navette phosphocréatine (issue de (17)).

Ce système permet à la fois la régulation temporelle et la distribution spatiale de l'énergie disponible. En effet, dans l'espace intermembranaire des mitochondries, la CK mitochondriale utilise l'ATP produit dans la matrice mitochondriale par les phosphorylations oxydatives. L'ATP est alors exporté dans l'espace intermembranaire grâce au translocateur des nucléotides adényliques (ANT) situé dans la membrane interne. La créatine kinase mitochondriale, localisée dans l'espace intermembranaire, catalyse le transfert du groupement γ -phosphate de l'ATP vers la créatine. La phosphocréatine (PCr) ainsi formée, plus petite que l'ATP, quitte alors la mitochondrie par diffusion à travers les porines. Ainsi la phosphocréatine véhicule "la liaison riche en énergie" jusqu'aux sites utilisateurs où la régénération de l'ATP est alors rendue possible par les CK cytosoliques. La créatine alors libérée peut rediffuser jusqu'à la mitochondrie, bouclant ainsi le circuit (9). Les isoformes

cytosoliques, solubles ou associées à des structures submembranaires, utilisent la PCr pour régénérer l'ATP au niveau des sites très demandeurs en énergie comme la myosine ATPase (9).

Le système CK/PCr permettrait de maintenir localement un rapport ATP/ADP idéal pour sa fonction biologique (18). En effet, les CK cytosoliques maintiennent un rapport ATP/ADP élevé au niveau des sites subcellulaires où la CK est fonctionnellement couplée aux processus ou aux enzymes consommant l'ATP (ATPase par exemple), ce qui augmente l'efficacité de l'hydrolyse de l'ATP. Inversement, les CK mitochondriales maintiennent un rapport ATP/ADP faible (par l'intermédiaire d'une concentration en ADP élevée) au niveau des sites produisant l'énergie. Dans ces sites, l'enzyme est couplée aux systèmes régénérant l'ATP provenant de la phosphorylation oxydative et à ceux transportant l'ATP c'est-à-dire les translocateurs des nucléotides adényliques (19). Ce rapport stimule efficacement la phosphorylation oxydative mitochondriale et minimise l'énergie libre requise pour la synthèse de l'ATP.

Un dysfonctionnement de cette navette conduit à des pathologies neurodégénératives, cardiaques, musculaires, ou encore des troubles neurologiques (20). Chez les patients atteints d'Alzheimer, on observe une diminution de l'activité de la créatine kinase qui peut être à l'origine d'une diminution de la concentration en ATP (21). Le point commun des maladies (neuro)musculaires¹ est une diminution de la concentration en Cr, PCr et ATP dans les tissus musculaires et d'une augmentation importante de CK-MM et CK-MB dans le sérum (22, 23). Dans le cadre de la myopathie de Duchenne², il a été démontré que l'absorption orale de créatine améliore le statut énergétique des neurones et des cellules musculaires (24). En effet, l'apport de créatine permet la normalisation du taux de calcium dans les cellules musculaires soumises à un stress osmotique chez les souris dystrophiques *mdx* (25). En parallèle une augmentation de la survie cellulaire est observée.

¹ Exemples de maladies musculaires : myopathie de Duchenne (DMD), myopathie de Becker (BMD), myopathies diabétique et mitochondriale.

² DMD se caractérise par une décharge énergétique et par une accumulation de calcium qui induit l'apoptose.

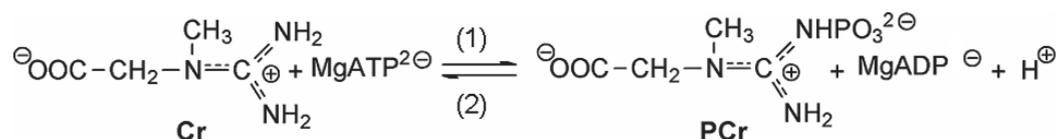
Les isoenzymes de la CK sont utilisées en diagnostic clinique comme indicateurs de nombreuses anomalies physiologiques³, mais aussi comme des sondes biologiques pour le dépistage d'un cancer ou le suivi de son évolution (26). Le mécanisme de cancérisation entraîne une dérégulation des gènes de la CK, une modification de la répartition de l'énergie et la surexpression des CK dans les cellules malignes. Une relation directe entre la croissance d'une cellule tumorale et l'expression de la CK-BB a été suggérée. L'oncogène *E1a* induit une surexpression de la CK-BB alors que la protéine p53 régule positivement celle de la CK-MM (27, 28).

De nombreuses études indiquent que les analogues de créatine peuvent être utilisés comme molécules anticancéreuses. Ainsi l'inactivation des isoenzymes de la CK pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante en parallèle des traitements conventionnels dans le cadre d'un cancer. Au laboratoire, Anne-Sophie Bretonnet a mené des études de synthèse d'inhibiteurs de la CK-MM et, par la méthode des fragments, a permis de définir un inhibiteur qui possède une constante de dissociation de 150 μM (29).

I.1.2. Le mécanisme enzymatique de la CK.

I.1.2.1. La catalyse enzymatique

La créatine kinase (EC. 2.7.3.2) est une enzyme qui catalyse la réaction réversible suivante:



Le pH optimum de l'enzyme est compris entre 7,5 et 9 dans le sens de la formation de PCr (**sens 1**) ; et entre 6 et 7 dans le sens de la synthèse d'ATP (**sens 2**) (15). Des expériences

³ En effet, la mesure du taux de CK-MM et CK-MB permet respectivement le diagnostic de lésions musculaires et de l'infarctus du myocarde.

la CK dans le sens de la production d'ATP (sens 2) et de PCr (sens 1) (33).

	CK-MM	CK-BB	CKmt ubiquitaire	CKmt Sarcomérique
k_{cat} (min^{-1})	$9,21 \times 10^3$	$12,9 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$
K_d Cr (mM)	$14,6 \pm 1,2$	$6,0 \pm 0,3$	$45,8 \pm 11,2$	$43,9 \pm 14,9$
K_m Cr (mM)	$9,5 \pm 0,59$	$4,9 \pm 0,4$	$1,01 \pm 0,13$	$7,31 \pm 1,27$
K_m/K_d Cr	0,65	0,82	0,022	0,17
k_{cat}/K_m Cr ($\text{mM}^{-1}/\text{min}^{-1}$)	$9,7 \times 10^2$	$2,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$6,2 \times 10^2$
K_d MgATP (mM)	$1,2 \pm 0,11$	$0,99 \pm 0,3$	$4,04 \pm 1,33$	$4,06 \pm 0,78$
K_m MgATP (mM)	$0,89 \pm 0,16$	$0,81 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,21$
K_m/K_d MgATP	0,74	0,82	0,0024	0,17
k_{cat}/K_m MgATP ($\text{mM}^{-1}/\text{min}^{-1}$)	$1,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$6,6 \times 10^3$

Tableau 1 : Constantes cinétiques de quatre isoenzymes de la créatine kinase chez l'homme, dans le sens de la synthèse de phosphocréatine (sens 1) (33). Le pH de la réaction est de 9 pour les CK cytosoliques (CK-MM et CK-BB), et de 8 pour les isoenzymes mitochondriales : CKmt. K_m et K_d représentent respectivement les constantes de dissociation pour les complexes ternaires (E.MgATP.Cr ou E.MgADP.PCr) et binaires (E.MgATP ou E.MgADP ou E.PCr).

	CK-MM	CK-BB	CKmt ubiquitaire	CKmt Sarcomérique
k_{cat} (min^{-1})	$2,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$
K_d PCr (mM)	$3,7 \pm 1,0$	$0,22 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,13$	$2,87 \pm 0,68$
K_m PCr (mM)	$1,33 \pm 0,14$	$0,51 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,14$
K_m/K_d PCr	0,36	2,32	0,60	0,40
k_{cat}/K_m PCr ($\text{mM}^{-1}/\text{min}^{-1}$)	$2,2 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$
K_d MgADP (mM)	$0,07 \pm 0,013$	$0,02 \pm 0,002$	$0,22 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,09$
K_m MgADP (mM)	$0,03 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,002$	$0,13 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$
K_m/K_d MgADP	0,43	2	0,59	0,39
k_{cat}/K_m MgADP ($\text{mM}^{-1}/\text{min}^{-1}$)	$1,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$

Tableau 2: Constantes cinétiques de quatre isoenzymes de la créatine kinase chez l'homme, dans le sens de la synthèse d'ATP (sens 2) à pH 7 (33).

La constante catalytique k_{cat} est égale au nombre de moles de produit formées par unité de temps et par mole d'enzyme. Ainsi, plus la valeur de k_{cat} est important plus l'enzyme est efficace. Les valeurs répertoriées dans les tableaux 1 et 2 mettent en évidence que les CKs cytosoliques sont plus efficace que les CKs mitochondriaux (CK-mt) dans les deux sens de la réaction (1 et 2). En effet on remarque que les CK-mt catalysent la réaction deux à trois fois plus lentement que les isoenzymes cytosoliques.

A l'exception de la CK-BB dans le sens de la formation d'ATP, on remarque que les valeurs de K_m sont significativement plus faibles que les valeurs de K_d , où K_m et K_d sont les constantes de dissociation des complexes ternaires et binaires respectivement (Figures 4 et 5). Les rapports K_m/K_d inférieur à 1 sont un indicateur d'une synergie des substrats, dans laquelle la fixation d'un substrat augmente l'affinité du second substrat. Ce phénomène peut être associé à un changement conformationnel de la protéine induit par la fixation des substrats. Les valeurs de K_m/K_d sont du même ordre de grandeur, à l'exception de CK-BB lors de la réaction dans le sens 2 (supérieur à 1) et u-CKmt dans le sens 1 (proche de 0). Le degré de synergie varie selon les conditions de la réaction (34, 35), et il peut être affecté par mutagenèse dirigée (36). Dans le cas de la CK-MM la synergie de la fixation des substrats est observée dans les deux sens de la réaction (37).

Le rapport de k_{cat}/K_m apporte des informations sur la spécificité d'une enzyme pour ses substrats. Les tableaux 1 et 2 indiquent que sCKmt a une spécificité faible pour ses substrats et que les isoenzymes cytosoliques sont plus efficaces que les isoenzymes mitochondriales. Cette variation est encore plus prononcée dans le sens (2) de la réaction, où il y a un facteur 10 entre les isoenzymes cytosoliques et mitochondriales.

Dans les conditions des mesures cinétiques on remarque que l'affinité des CK-mt est très faible pour la créatine et MgATP (Tableau 1 et 2). Saks *et al.* ont pourtant mesurer une affinité importante des CK-mt pour l'ATP produit par la mitochondrie que l'ATP exogène (38). Ces isoenzymes auraient donc accès plus facilement à l'ATP intra-mitochondrial grâce à une interaction avec l'ANT et favoriseraient la réaction dans le sens 1. Les CKs cytosoliques favorisent la réaction 2 car ils possèdent une affinité élevée pour la PCr et MgADP. Ces résultats sont confirmés par les rapports $k_{cat}(\text{sens 1})/k_{cat}(\text{sens 2})$ calculés pour chaque isoforme : 0,32 pour la CK-MM, 0,58 pour la CK-BB, 0,65 pour la CK-mt ubiquitaire, et 0,85 pour la CK-mt sarcomérique. Ces informations sont en accord avec la navette phosphocréatine.

I.1.2.3. Les inhibiteurs.

Millner-White et Watts ont mis en évidence la formation d'un complexe quaternaire CK- MgADP- anion- créatine en présence de certains anions monovalents tels que : Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , et HCO_2^- (37). Ces anions se lient compétitivement sur les sites de fixation des phosphates et seraient donc des inhibiteurs de la réaction enzymatique. En revanche, en présence d'anions planaires tels que NO_3^- et en présence de Cr et de MgADP, la CK forme un complexe extrêmement stable, où l'ion nitrate occupe le site de fixation du phosphate transférable. Ainsi le complexe CK-Cr-MgADP- NO_3^- constitue un analogue de l'intermédiaire de transition catalytique (TSAC) qualifié d'abortif car la réaction enzymatique ne peut pas avoir lieu. Toutefois la formation de ce complexe induit les mêmes changements conformationnels que ceux observés lors de la catalyse (39).

Borders *et al.* déterminent par fluorescence l'affinité de chaque composant du complexe analogue de l'état de transition de la CK (Figure 6) et détermine le K_d du complexe quaternaire K_{TSAC} égale à $0,4 \text{ nM}^3$. Avec une telle affinité la formation du complexe TSAC est majoritaire (40).

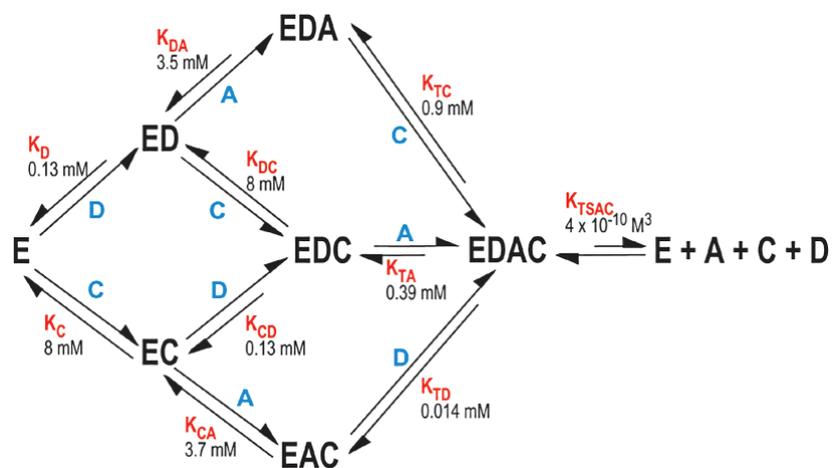


Figure 6 : Modèle catalytique de la formation du complexe CK-nitrate-MgADP-créatine ; E = créatine kinase, A = nitrate, C = créatine, D = MgADP. EDAC représente le complexe quaternaire TSAC (40).

I.1.3. Etude structurale et fonctionnelle de la CK-MM

I.1.3.1. Structure cristallographique de la CK-MM.

Il existe quatre structures cristallographiques de la créatine kinase musculaire répertoriées dans le Tableau 3.

	Résolution en Å	Code PDB	Substrats	Auteurs
rm-CK de lapin	2,35	2CRK	Aucun	Rao <i>et al.</i> , 1998 (41)
CK-MM humaine	3,5	1I0E	Aucun	Shen <i>et al.</i> , 2001 (42)
Tc-CK	2,1	1N16	TSAC	Lahiri <i>et al.</i> , 2002 (43)
rm-CK de lapin R134K	1,65	1U6R	TSAC	Ohren <i>et al.</i> , 2007 (44)

Tableau 3 : Récapitulatif des données cristallographiques sur la créatine kinase musculaire. Tc-CK : CK de *torpedo californica* ; rm-CK : CK musculaire de lapin.

L'ensemble de ces structures indique que la CK-MM est un homodimère et chaque monomère est constitué de deux domaines (Figure 7) :

- un petit domaine N- terminal, d'environ 100 résidus, structuré en hélices α (NTD).
- un grand domaine C- terminal, d'environ 280 résidus, organisé en feuillet β anti-parallèle flanqué par de longues hélices α (CTD).
- le site actif est localisé entre ces deux domaines.

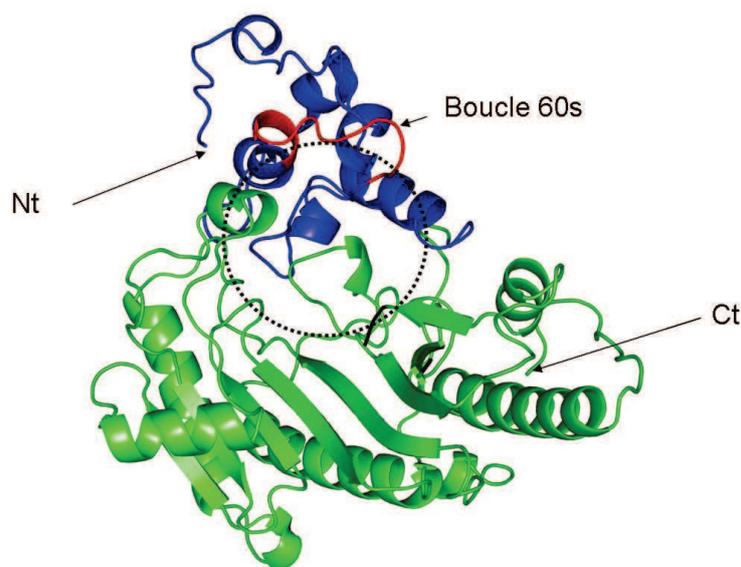


Figure 7 : Structure en ruban du monomère de la CK-MM de lapin (rm-CK :code PDB 2CRK, (41)). Le domaine N-terminal est représenté en bleu et le domaine C-terminal en vert. Le site actif est entouré d'un pointillé noir et est localisé entre les deux domaines. La boucle 320s n'est pas modélisée dans cette structure, les résidus 319 et 332 sont colorés en noir.

On discerne de fortes similarités entre la structure résolue de la CK-MM de lapin (41) et humaine (42). Dans ces deux structures, il existe une faible densité électronique pour le segment N-terminal (résidus 1 à 6), et pour la boucle en C-terminale (résidus 320 à 330) ce qui indique une grande flexibilité (42). Ces régions jouent certainement un rôle important dans le réarrangement de la structure lors de la fixation des substrats.

On identifie également deux aires de contact symétriques générées par des interactions polaires entre les résidus du domaine N-terminal d'un monomère et ceux du domaine C-terminal de l'autre monomère (44) (Figure 7). L'étude de la structure du dimère de la CK musculaire de lapin (rmCK ; code PDB : 1U6R) par le logiciel PBDsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) indique que l'interface monomère-monomère implique 40 résidus représentant une surface d'environ 1900 Å² pour chaque monomère. Cette interface est stabilisée par 32 liaisons hydrogènes et 271 contacts hydrophobes. 30% des interactions proviennent des 20 premiers résidus du monomère CK-MgADP et 50% proviennent de l'interaction avec les 20 premiers résidus du monomère CK-Cr-MgADP-NO₃⁻ (Figure 8 A-B).

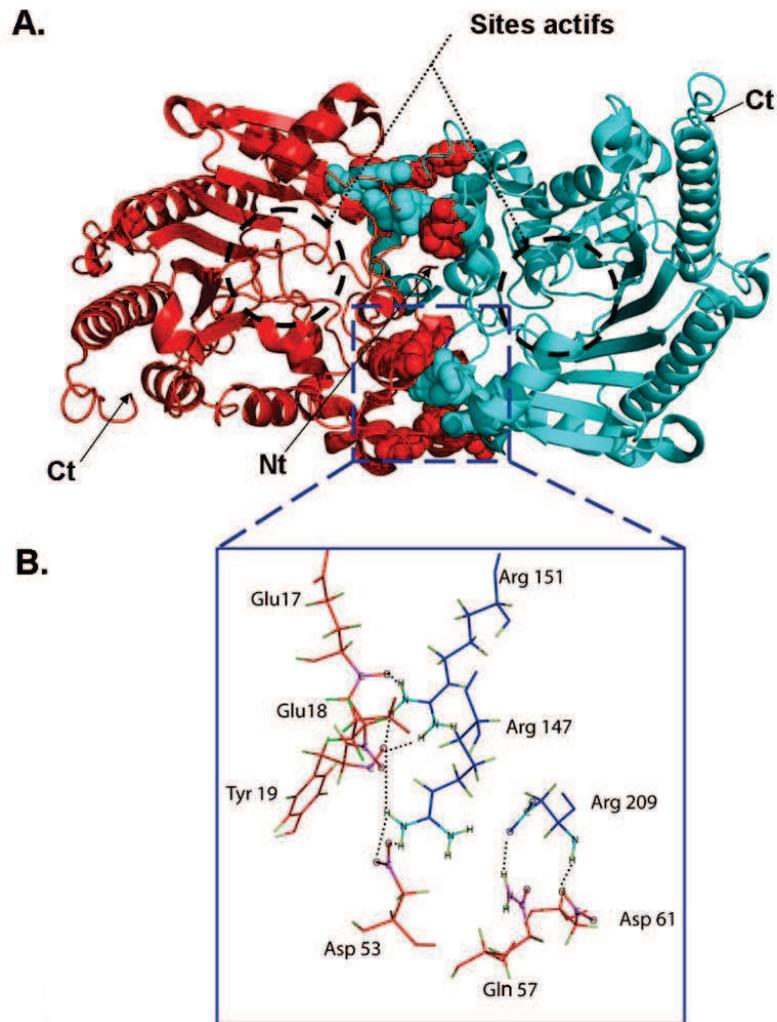


Figure 8 : L'interface monomère-monomère de la CK-MM de lapin (code PDB : 1U6R). **A)** Représentation en ruban du dimère CK-MM : on observe deux zones de contact dont les résidus impliqués sont représentés en sphère. Les sites actifs sont encerclés en noir. **B)** Agrandissement d'une des zones de contact impliquant les résidus Glu17, Glu18, Tyr19, Asp53, Gln57 et Asp61 (domaine N-terminal d'une sous-unité : rouge) interagissent via des liaisons polaires, indiquées en pointillés, avec les résidus Arg151, Arg147 et Arg209 (domaine C-terminal de l'autre sous-unité : bleu).

La CK-MM présente six régions impliquées dans l'interaction monomère-monomère appelées IRS (pour *Interface Residues Segments*)(45) :

- IRS 1: N8-K11, Y14, E 17-D22.
- IRS2: P48-G50, D54, I57, Q58, V61-N63
- IRS3: Y140, H145-Q150, R152, A153
- IRS4: K177
- IRS5: K196
- IRS6: L203, A208-W211, D213.

La plupart de ces régions sont conservées chez toutes les CKs et jouent un rôle crucial dans l'acquisition de la structure quaternaire (46, 47), la stabilité et l'activité de la CK (48). Des expériences d'échange hydrogène – deutérium sur la CK-MM (49) confirment le rôle des résidus du domaine N-terminal dans la dimérisation.

I.1.3.2. Le site actif

De nombreuses techniques biochimiques et physico-chimiques ont permis de mettre en évidence un certain nombre de résidus impliqués dans le site actif de la CK-MM. Les structures cristallographiques de la CK-MM en interaction avec les substrats Cr-NO₃-MgADP ont permis de confirmer certaines hypothèses et d'apporter plus de détails.

I.1.3.2.1. Changement conformationnel dû à la fixation des substrats dans le site actif : mouvement des boucles 60s et 320s.

Les structures cristallographiques de la CK musculaire de lapin (rm-CK) et de la CK musculaire de *Torpedo californica* (tc-CK) révèlent deux formes différentes dans la même unité cristallographique (43, 44). On identifie un monomère qui interagit avec Cr-NO₃⁻-MgADP et le second avec MgADP (Figure 9).

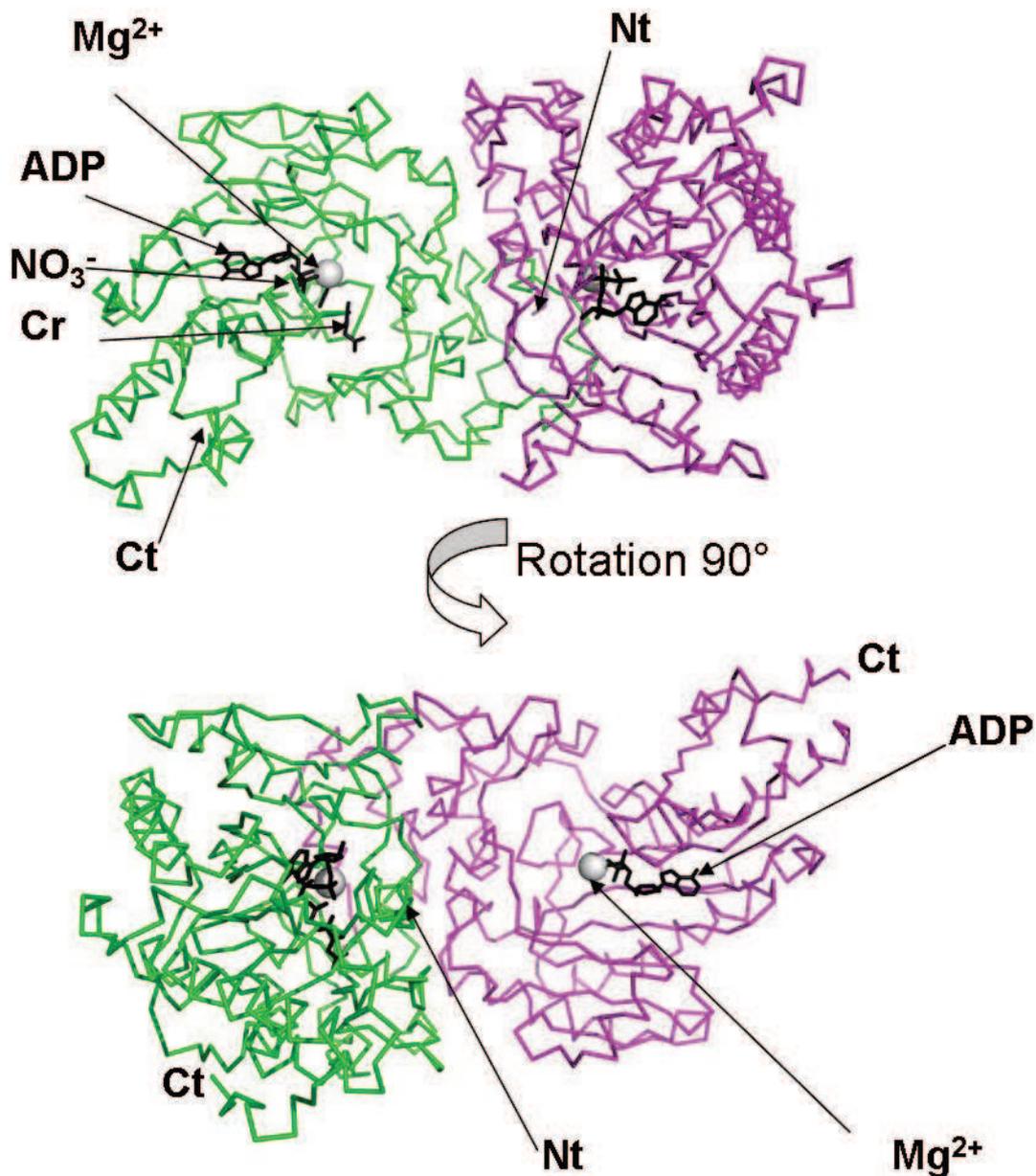


Figure 9 : Représentation en ruban du dimère de CK-MM en interaction avec Cr-MgADP-NO₃⁻. Un premier monomère (vert) fixe Cr-MgADP-NO₃⁻ tandis que le second (magenta) fixe MgADP. ADP, créatine et l'ion nitrate sont représentés par des bâtons de couleur noire, et le magnésium en sphère grise. Afin d'améliorer la visualisation des ligands, 2 représentations orthogonales sont présentées.

Lors de la fixation des substrats Cr-MgADP-NO₃⁻ sur la CK, les deux boucles flexibles N-terminale 60s (résidus 60 à 70) et C-terminale 320s (résidus 323 à 333) se referment sur les sites de liaisons du nucléotide et de la créatine ; on passe ainsi de la configuration "ouverte" à la configuration "fermée" (Figure 10). Dans la configuration fermée, le site actif est protégé du solvant. Les résidus 323 - 333 établissent des contacts avec les phosphates α , β de l'ADP, alors que les résidus Ile69 et Asp326 forment une poche pour le groupement méthyle de la

créatine. La boucle 60s possède un motif PGHP très conservé chez toutes les CKs. Dans ce motif, le résidu His66 interagit via une liaison ionique avec Asp326 permettant la fermeture des deux boucles. La mutagenèse dirigée de chaque résidu du motif PGHP par une alanine indique que seul His66 joue un rôle significatif dans l'activité de la CK (50, 51). Cette conformation fermée semble contribuer à l'environnement électrostatique du site actif et au maintien de la conformation des boucles de sorte que les substrats soient alignés de manière optimale pour la catalyse (52).

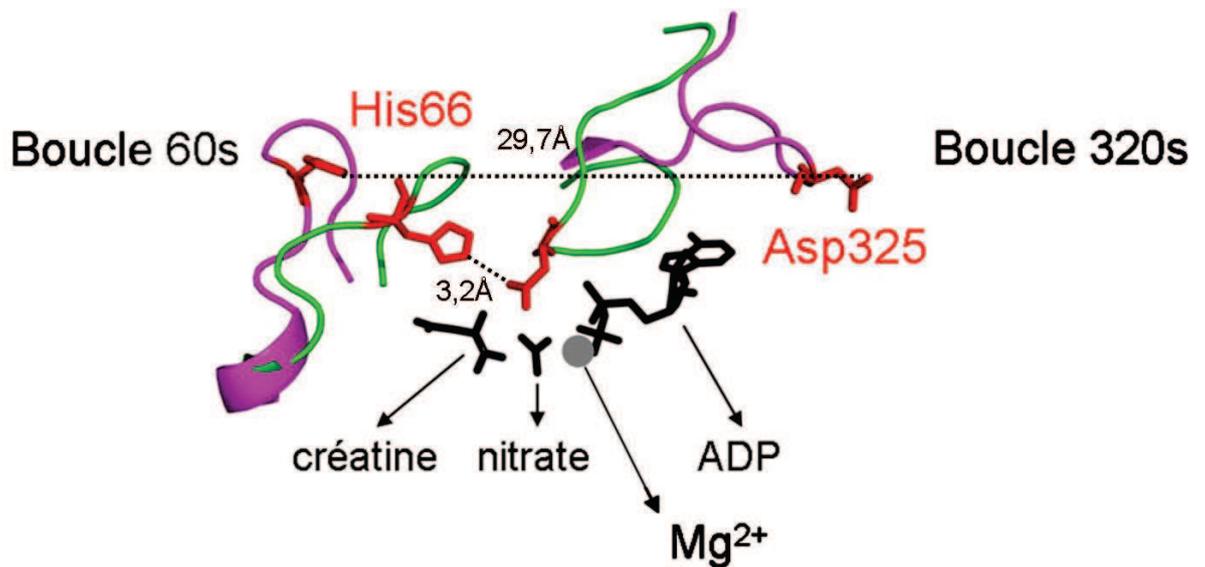


Figure 10 : Mouvement des boucles 60s et 320s lors de la fixation des substrats Cr-MgADP-NO₃⁻ dans le site actif de la CK-MM (PDB : 1N16). Les deux sous-unités de la CK-MM sont superposées : sous-unité CK-MgADP (magenta) et sous-unité CK-Cr-MgADP-NO₃⁻ (vert). La distance entre His66 et Asp325 passe de 3,2 Å dans la forme fermée à 29,7 Å dans la forme ouverte.

De plus, la superposition des monomères rmCK (44) montre un déplacement de l'extrémité N-terminale (résidus 1 à 10) dans les formes ouverte et fermée (Figure 11). Dans la structure de la CK de *Torpedo californica* (43), les boucles des extrémités N-terminales ne sont pas observées car la résolution n'était pas suffisante (résolution 2,1Å pour 1N16, et 1,65Å pour 1U6R). Dans le monomère rmCK-ADP (forme ouverte), l'extrémité N-terminale est accessible au solvant alors que les six premiers résidus de l'extrémité N-terminale du monomère rmCK-Cr-MgADP-NO₃⁻ sont enfouis dans l'interface monomère – monomère à l'abri du solvant (44).

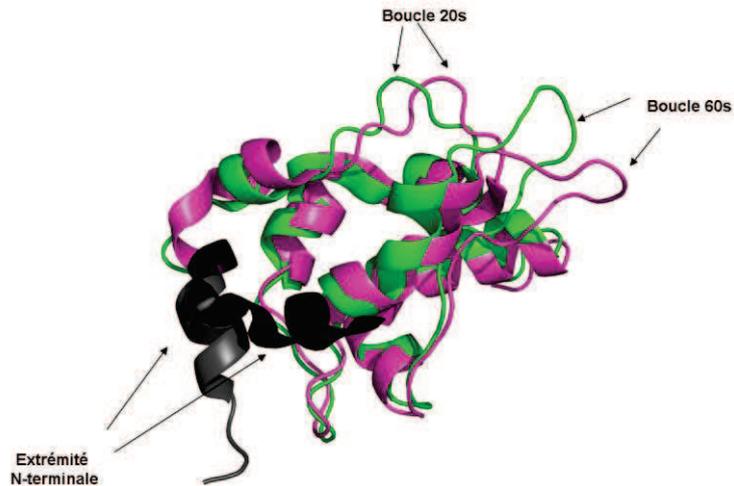


Figure 11 : Représentation en ruban du domaine N-terminal du monomère "ouvert" en interaction avec MgADP (en vert) et du monomère "fermé" en interaction avec Cr-MgADP-NO₃⁻ (en rose). En noir et en gris sont représentées les extrémités N-terminales (1-10) des monomères fermé et ouvert respectivement.

Le changement de position de l'extrémité N-terminale du monomère rmCK-TSAC induit le dépliement partiel de l'hélice responsable du mouvement de la boucle 20s et en particulier des résidus His25, Asn26, Asn27 et His28 lors de la fixation du substrat. Dans la structure de TcCK (43), le déplacement de la boucle 20s est également constatable. Les résidus His25, Asn26, Asn27 et His28 sont fortement conservés chez les CKs. Ohren *et al.* suggèrent que ces résidus sont impliqués dans le mécanisme enzymatique en optimisant la position la boucle 60s (44, 53).

I.1.3.2.2. Site de fixation nucleotide

Dans les CK cytoplasmiques, les régions en interaction avec l'adénine du nucléotide sont comprises entre Val23 et Lys241 et entre Ile279 et Arg291 (54). Les structures résolues par cristallographie de tc-CK (43) et de la rm-CK (44) indiquent que l'adénine de l'ADP est dans une conformation *anti* par rapport au cycle du ribose. D'après la structure du monomère tcCK-Cr-MgADP-NO₃⁻, on observe que la poche où se lient les groupements phosphates de l'ADP est chargée positivement. Elle est constituée principalement de cinq résidus arginine fortement conservés (Arg130, Arg132, Arg236, Arg292, et Arg320) (Figure 12).

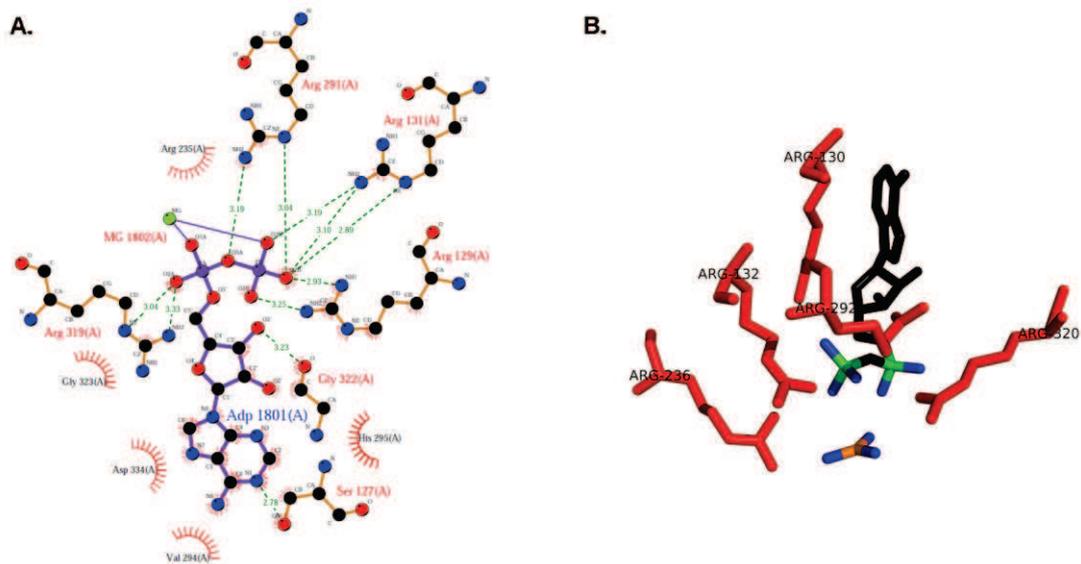


Figure 12 : Interaction de MgADP au sein du site actif de la CK-MM. **A)** Représentation des interactions hydrophobes (en rouge) et des liaisons hydrogènes (en vert) dans le site de fixation de l'ADP avec le logiciel Ligplot. Il faut noter qu'il y a un décalage de numérotation par rapport au manuscrit (Arg129 = Arg130 dans le manuscrit). **B)** Représentation du cluster d'arginine dans la poche de fixation de l'adénosine diphosphate (1U6R). En noir sont représentés les noyaux adénosine et ribose de l'ADP, en vert les phosphates α et β . Les oxygènes et l'azote sont respectivement en bleu et orange.

Les arginines interagissent directement avec les oxygènes des groupements phosphate du nucléotide. En effet, Arg130 est liée à l'oxygène du phosphate β et au ribose de l'ADP. Les Arg132 et Arg292 sont également liées au phosphate β . L'Arg236 interagit avec l'oxygène du phosphate β et le nitrate (Figure 12A). Toutes les arginines occupent la même position dans les deux structures CK-Cr-MgADP-NO₃⁻ et CK-MgADP, sauf Arg320. Celle-ci est à la base de la boucle flexible C-terminale, elle doit être impliquée dans le mouvement de cette boucle. L'Arg 320 interagit avec l'oxygène du phosphate α de l'ADP et le nitrate. En plus de neutraliser les charges négatives des phosphates, le cluster d'arginine aurait pour rôle majeur l'alignement du nucléotide ADP ou ATP lors de la réaction de transfert du groupement phosphoryle (55).

Une étude RMN de la CK-MM de lapin a révélé que 4 histidines, localisées à des distances de 12, 12, 14 et > 18 Å du complexe paramagnétique bidenté Cr³⁺-ATP lié à l'enzyme, seraient susceptibles de participer à la catalyse enzymatique (56). Il a été suggéré qu'un de ces résidus serait impliqué dans la transphosphorylation entre l'ATP et la créatine. Ce résidu pourrait agir comme un catalyseur acide-base en assurant la déprotonation du groupement guanidine de la créatine, facilitant ainsi l'attaque nucléophile sur le phosphate

γ de l'ATP. Des études de mutagenèse dirigée sur les histidines de la CK-MM, montrent que les His96, 105, 190, 233 et 295 ne sont pas directement impliquées dans le mécanisme de transphosphorylation catalysé par la CK (50, 57). Cependant certaines histidines sont impliquées dans la liaison du substrat. En effet, His295 permet la stabilisation de l'adénine (43) et la mutation de cette histidine par une asparagine provoque une diminution de l'activité enzymatique (57). His190 interagit avec le ribose (Figure 13) mais sa mutation n'entraîne pas de perte d'activité.

Le résidu tryptophane 228 n'interagit pas directement avec le substrat mais formerait une partie de la poche de liaison du nucléotide (43). La mutagenèse dirigée du tryptophane 223 de la CK-mt (Trp228 chez les isoenzymes cytosoliques) inactive la CK (58). D'après la structure 3D de la CK-MM de lapin (41) ce tryptophane est à environ 5 Å de l'oxygène du phosphate α de l'ADP.

On observe également trois molécules d'eau, structurées cristallographiquement, dans la poche spécifique du nucléotide. Deux d'entre elles forment des liaisons hydrogènes avec le ribose, tandis que la troisième interagit avec l'adénine de l'ADP.

L'ensemble de ces interactions permettrait de positionner correctement MgATP par rapport à la créatine pour induire l'attaque nucléophile (43).

I.1.3.2.3. Site d'interaction de la créatine

Les analogues de la créatine ont permis d'accumuler de nombreuses informations sur la poche de fixation de la créatine. Les résidus localisés sur la boucle flexible 60s et la cystéine 283 forment le site de fixation de la créatine (59, 60). Ces résidus sont très conservés chez les isoenzymes CK.

Les structures cristallographiques des CK-MM (43, 44) et CK-BB (13) en présence de Cr-MgADP-NO₃⁻ nous permettent de réaliser une carte précise des interactions permettant le positionnement correct de la créatine dans le site actif. Seules les interactions des acides aminés à 3 Å de la créatine sont prises en compte ci-après. Les asparagines 26 et 27 n'interagissent pas directement avec le substrat, mais elles interviennent dans le positionnement optimal de la boucle flexible 60s (Gly60 à Thr70). En présence de Cr-

MgADP-NO₃⁻, Ohren *et al.* ont observé une réorganisation de l'extrémité N-terminale d'une sous-unité qui induit un changement conformationnel de la boucle 20s (Figure 11), ce qui forme de nouvelles interactions avec la boucle 60s (44). Dans le monomère Cr-MgADP-NO₃⁻, nous observons une interaction entre la chaîne latérale de la Thr70 et Asn26 ce qui induit le mouvement de la Thr70 hors du site actif et permet alors la fixation de la créatine. Dans le monomère rmCK-MgADP cette interaction n'a pas lieu car l'extrémité N-terminale n'induit pas les modifications nécessaires sur la boucle 20s, ainsi la Thr70 empêche la fixation de la créatine.

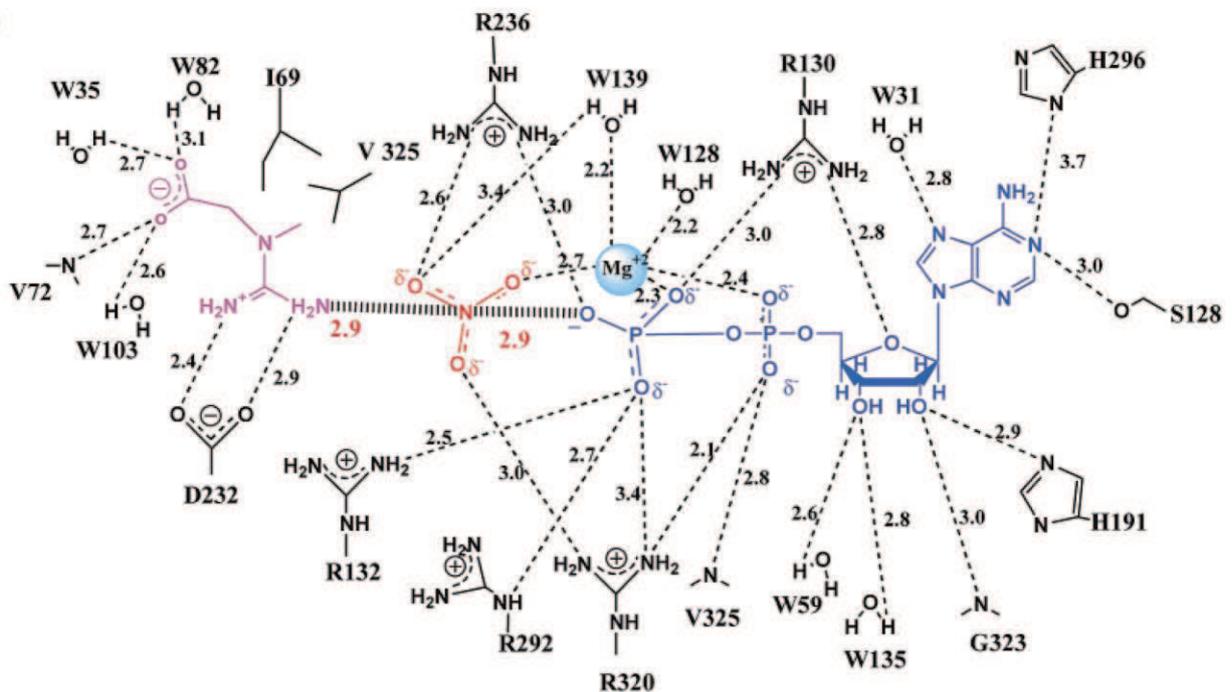


Figure 13 : Résumé des interactions impliquées dans le site actif de la CK-MM de *T. californica* (43).

D'après la figure 13, le groupement carboxylique de la créatine forme quatre liaisons hydrogènes. La première est observée entre l'acide et l'azote de la chaîne principale de la Val72. Les trois autres sont observées entre l'acide et des molécules d'eau. Des études avec différents substrats ont montré que le remplacement du groupement N-méthyle de la créatine par un hydrogène (glycocyamine) ou un groupement éthyle (N-éthylglycocyamine), provoque une réduction de l'affinité pour les substrats (de respectivement 43 ou 11 fois) (61). Cette spécificité pour la créatine est due à la poche formée par Ile69 et Val325. Ces deux résidus hydrophobes se trouvent sur chacune des deux boucles qui ferment le site actif uniquement en

présence des substrats Cr-MgADP-NO₃⁻. Des études de mutagenèse dirigée sur la CK musculaire humaine (HM-CK) révèlent que le remplacement de Ile69 par une alanine provoque une diminution importante de l'activité enzymatique (36). On obtient des résultats similaires lorsqu'on remplace Ile69 par une glycine sur la CK-MM de *Danio* (62). Dans cette publication, Uda et Suzuki ont aussi montré que le remplacement de Val75 par une glycine conduit à une enzyme inactive. Les auteurs ont donc supposé que la Val75, ne formant pas d'interaction directe avec le ligand, est impliquée dans la stabilisation de la boucle flexible 60s (62).

La Glu232 forme deux liaisons ioniques avec le groupement guanidine de la créatine ce qui stabiliserait sa charge positive. Cet acide aminé appartient au motif NEED, qui est fortement conservé chez toutes les guanidines kinases. La mutation de Glu232 par Asp ou Gln induit une importante diminution de l'activité spécifique AS ($AS_{HM-CK_{sauvage}} = 114 \pm 7,4$ mmol/s/mg, $AS_{HM-CK_{E232D}} = 0,204 \pm 0,012$ mmol/s/mg, et $AS_{HM-CK_{E232Q}} = 0,0015 \pm 0,0005$ mmol/s/mg) (63). L'acide glutamique 232 serait impliqué dans l'alignement de la créatine dans le site actif et aurait une position correcte pour jouer le rôle de catalyseur acide-base.

En plus de l'acide glutamique 232, le groupement guanidine de la créatine interagit avec la Cys283. Ce résidu a un pKa relativement faible de 5,4 et est donc sous forme thiolate pour une liaison optimale avec la créatine (64, 65). La serine 285 à proximité interagirait avec la cystéine 283, diminuant son pKa et stabilisant la forme thiolate (64-66). L'importance dans la catalyse enzymatique de la cystéine 283 a été la source de nombreuses discussions. La modification chimique de Cys283 de la rm-CK par différentes variétés de réactifs spécifiques induisent dans certains cas une inactivation de l'enzyme modifiée (67-69) et dans d'autre cas l'enzyme possède une activité résiduelle (35, 70, 71). Des expériences de mutagenèse ont démontré sans équivoque que, ni la cystéine 283 ni la serine 285 ne sont essentielles pour la catalyse. Mais la présence de la cystéine est importante pour le positionnement linéaire de la créatine qui est nécessaire pour une attaque nucléophile sur le phosphate γ de l'ATP (64, 65, 72). La mutation de la Cys283 par une méthionine conduit à une perte totale de l'activité, alors que sa mutation par une serine induit une diminution importante de la V_{max} (~ 100 fois) et une augmentation du K_m pour la créatine d'environ 10 fois (64). La cystéine 283 et la serine 285 font partie du motif CPS, qui est fortement conservé chez toutes les guanidino-kinases.

I.1.3.2.4. Le cation Mg^{2+} et l'anion NO_3^-

Il existe une dépendance étroite entre l'activité de la CK et la concentration en Mg^{2+} (73). D'autres ions activateurs (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+}) ont également été identifiés (74). Des études de résonance paramagnétique électronique (RPE) et de spectroscopie différentielle ont montré que le cation n'interagit pas directement avec l'enzyme (75, 76) mais uniquement par une ou des liaisons avec le nucléotide (73). Des expériences RPE en présence de Mn(II) et marquage à ^{17}O montrent que l'ion métallique interagit avec les phosphates α , β , γ de l'ATP (α , β pour l'ADP), l'anion et trois molécules d'eau (77). Des mesures RMN ont montré que le cation Mn^{2+} maintient l'ATP ou l'ADP dans une conformation particulière dans le centre actif (78). Il n'y aurait pas de rupture de la coordination du phosphate γ avec l'ion métallique durant le transfert. Une fois le transfert effectué, la liaison Mn(II)-phosphocréatine doit être rompue pour permettre le départ de la phosphocréatine (79). L'ion métallique a donc une implication directe dans la réaction de transfert du groupement phosphoryle. Cleland (1967) suggère que MgADP et MgATP sont les vrais substrats de la CK (80). Dans la structure de CK- Cr-MgADP- NO_3^- (code PDB : 1N16), le Mg(II) présente une coordination octaédrique impliquant trois molécules d'eau, deux interactions avec les oxygènes α et β des groupements phosphates de l'ADP, et un oxygène du nitrate (Figure 13). Dans la structure CK-MgADP (code PDB : 1N16), une molécule d'eau remplace l'ion nitrate (43).

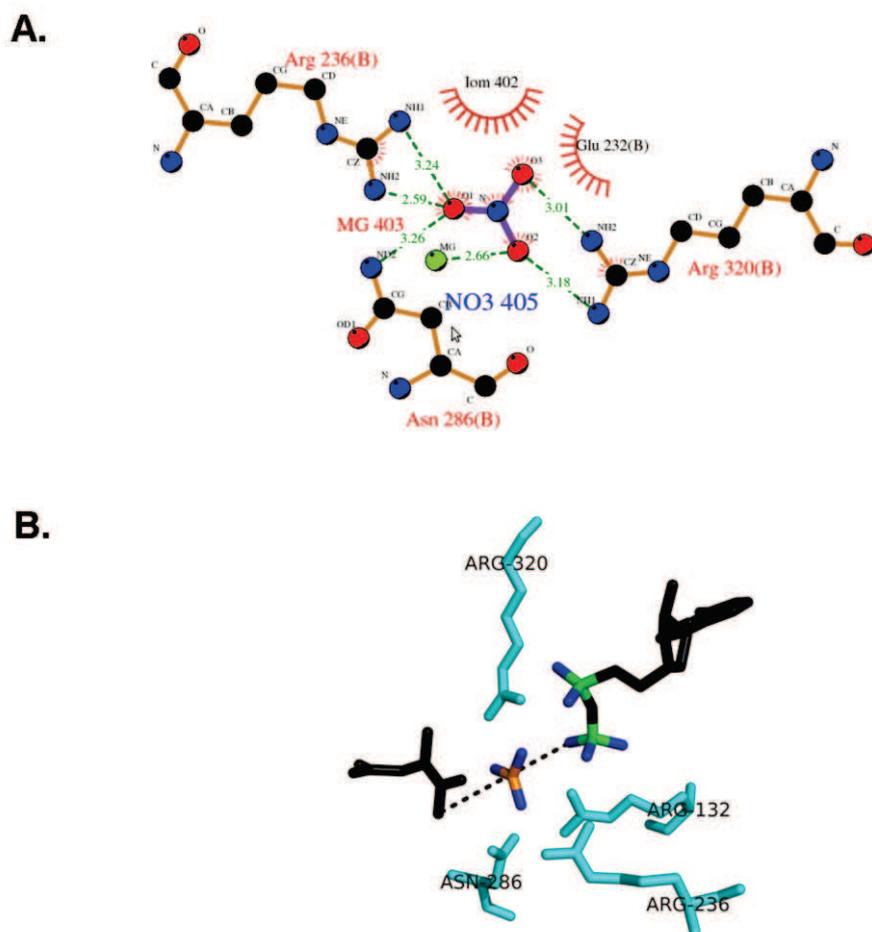


Figure 14 : Représentation du site d'interaction de l'ion nitrate chez Tc-CK (code PDB 1N16). A) schématiquement avec le logiciel Ligplot et B) en structure 3D.

L'ion nitrate dans les structures CK et AK (81) en présence de TSAC, est équidistant de l'oxygène terminal du phosphate β de l'ADP (donneur) et du groupement N-guanidino (accepteur) du composé guanidilique (respectivement créatine et arginine). Il mime le γ -phosphate planaire dans l'état de transition du transfert entre ces deux atomes (Figure 14B). Le nitrate interagit avec le Mg(II) et forme aussi des liaisons hydrogènes avec les Arg320, Arg236, Asn286 (Figure 14A). Les mutagenèses dirigées des arginines 236 et 320 provoquent une perte d'activité, mais l'affinité avec les substrats est inchangée. Ces résidus joueraient un rôle critique dans la stabilisation du complexe à l'état de transition (82).

I.2. Le rôle de la structure quaternaire dans la catalyse enzymatique de la CK-MM : dimère ou monomère actif ?

La structure active de la créatine kinase musculaire a fait l'objet de nombreuses discussions. Pour beaucoup d'auteurs, seul l'état dimérique est actif. En effet, de nombreuses études de repliement de la CK-MM après dénaturation par l'urée (83), le NaCl et LiCl (84), le SDS (85), ou le chlorure de guanidinium (83, 86) semblent indiquer que l'activité dépend de la dimérisation de la CK-MM. Les monomères générés pendant ces études n'ont aucune activité, due probablement à une dénaturation locale du site actif induit par une faible concentration de dénaturant (87). L'utilisation du chlorure de guanidinium et du NaCl comme dénaturants modifie les profils d'inactivation car la guanidine est un analogue structural de la créatine et l'ion chlorure est lui-même un inhibiteur.

Des monomères de créatine kinase musculaire active ont pu être générés par mutagenèse dirigée des résidus impliqués dans l'interface monomère-monomère de l'homodimère (47). Ces mutants ont une affinité plus faible pour les substrats, une activité et une stabilité réduite. La chromatographie d'exclusion sur les protéines mutées indique que la majorité est sous forme monomérique. Il existe toutefois une minorité de dimère qui est probablement responsable de l'activité résiduelle. Des expériences de fluorescence sur les monomères actifs indiquent une exposition importante des régions hydrophobes, en comparaison avec l'enzyme sauvage, ceci explique la réduction significative de l'affinité des ces mutants pour les substrats.

De plus, des études cinétiques sur la rm-CK Δ 1-15, et sur le mutant P20G mettent en évidence que la région N-terminale de la CK-MM est impliquée dans l'association des monomères et dans l'activité enzymatique (44).

L'ensemble de ces résultats suggère que la structure quaternaire est importante pour la stabilité de la CK et pour l'activité catalytique. En effet, la perte de la cohésion du dimère provoque une dissociation de l'homodimère fonctionnel, qui induit fatalement une perte significative d'activité.

La cristallisation de la CK-MM en présence de nucléotide MgADP ou sous forme de complexe analogue de l'état de transition (TSAC) en présence de Cr-MgADP-NO₃⁻ (44), a permis de connaître la structure du site actif de l'homodimère et la localisation de nombreux résidus connus pour participer au processus enzymatique. Par contre le mode de fonctionnement exact de la CK-MM dimérique n'est pas clairement identifié. En 2009, des études de dynamique sur l'arginine kinase (AK), publiées par Davulcu *et al.*, apportent des éléments de réponses. L'étude RMN de l'AK en absence de substrats a en effet permis de comprendre la dynamique de cette enzyme monomérique (AK) et par homologie celle des deux monomères de la CK-MM (88). Mais cette étude n'apporte évidemment aucune information sur le comportement entre les deux monomères de l'enzyme homo-dimérique CK-MM car l'AK est un monomère. En 2003, l'étude dynamique du complexe analogue d'état de transition : TSAC (CK-MM-MgADP-NO₃⁻ - créatine) par des expériences d'échange proton / deutérium couplée par spectrométrie de masse, a mis en évidence que les deux monomères de la CK-MM se comportent indépendamment (89). Ces résultats ont été obtenus lors de la thèse d'Hortense Mazon dans l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire (ICBMS, UMR 5246). Ils ne confirment pas un possible mécanisme coopératif entre les monomères, suggéré par les structures cristallographiques de la CK-MM (43, 44, 90). Une collaboration entre le Dr Olivier Marcillat de l'ICBMS et l'équipe ANABIO de l'Institut des sciences analytiques (UMR 52810) a ainsi vu le jour, afin d'essayer d'améliorer la compréhension du mécanisme de la CK-MM par son étude RMN. Dans cette optique, Anna Labernadie, lors de son stage de M2 recherche dans notre laboratoire en 2008, a effectué une étude RMN préliminaire en préparant des échantillons marqués U-¹⁵N en absence et en présence des constituants du TSAC. Cette étude a mis en évidence que l'ajout de substrat modifie l'environnement chimique d'une boucle flexible perturbée en déplacement chimique. L'enregistrement de l'expérience de type NOESY-HSQC avait permis une attribution hypothétique de la boucle 320s de la CK-MM. Nous nous sommes fixés comme but de reproduire, de compléter et de préciser les résultats préliminaires d'Anna Labernadie. Pour ce faire, nous avons préparé la CK-MM marquée uniformément en ¹⁵N et en ²H dans le but d'augmenter le rapport signal sur bruit du spectre HSQC et de pouvoir observer d'autres signaux que la région flexible. Le but de l'étude était aussi d'évaluer si une attribution RMN de la CK-MM était possible au delà de la boucle flexible 320s. Enfin, dans le but d'apporter des informations supplémentaires sur le mécanisme de la CK-MM nous avons envisagé des mesures de relaxation R_1 et R_2 .

II. Matériels et méthodes

II.1. Obtention de la CK-MM pure, marquée et stable.

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Plasmide codant pour la CK-MM de lapin

L'obtention d'un plasmide codant pour la protéine étudiée est la première étape de l'expression. Ici le vecteur recombinant codant pour la CK-MM de lapin nous a été généreusement fourni par le Dr Olivier MARCILLAT.

Le vecteur d'expression utilisé est pET-21 (+) (Novagen). Les vecteurs pET permettent la production rapide d'une grande quantité d'une protéine désirée. Ce plasmide (Figure 15) contient plusieurs éléments importants : un gène *lacI* qui code pour la protéine répresseur lacI, un promoteur T7 qui est spécifique à l'ARN polymérase T7, un opérateur lacI (LacO) qui peut bloquer la transcription, un poly-linker, une origine de réplication *f1*, un gène de résistance à l'ampicilline, et une origine de réplication ColE1.

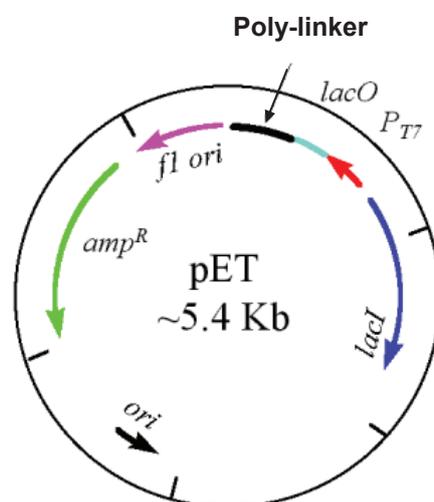


Figure 15 : Carte du plasmide pET.

L'ADNc codant pour la CK-MM de lapin a été cloné dans ce vecteur sur le site poly-linker. Ainsi le vecteur recombinant pET-21-CKMM code pour la protéine CK-MM de lapin, sans étiquette de purification, dont la séquence protéique est la suivante :

```

10      20      30      40      50      60
MPFGNTHNKY KLNYSKSEEEY PDLKSHNNHM AKVLTPDLYK KLRDKETPSG FTLDDVIQTG

70      80      90      100     110     120
VDNPGHPFIM TVGCVAGDEE SYTVFKDLFD PIIQDRHGGF KPTDKHKTDL NHENLKGDD

130     140     150     160     170     180
LDPHYVLSSR VRTGRSIKGY TLPPHCSRGE RRAVEKLSVE ALNSLTGEFK GKYYPLKSMT

190     200     210     220     230     240
EQEQQLIDD  HFLFDKPVSP LLLASGMARD WPDARGIWHN DNKSFLVWVN EEDHLRVISM

250     260     270     280     290     300
EKGGNMKEVF RRFCVGLQKI EEIFKKAGHP FMWNEHLGYV LTCPSNLGTG LRGGVHVKLA

310     320     330     340     350     360
HLSKHPKFEE ILTRLRLQKR GTGGVDTA AV GSVFDISNAD RLGSSSEVEQV QLVVDGVKLM

370     380
VEMEKKLEKG QSIDDMIPAQ K

```

Le vecteur recombinant doit être inséré dans une cellule bactérienne, codant pour l'ARN polymérase T7, pour que l'expression de la protéine soit effectuée (Figure 16). Cette étape est appelée transformation et permet de faciliter l'entrée du vecteur recombinant dans la cellule bactérienne qui a été préalablement rendue compétente⁴. Il existe plusieurs techniques de transformation, nous utilisons ici la transformation par choc thermique.

II.1.1.2. Souche bactérienne d'expression.

La cellule hôte utilisée est la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3). Elle contient l'ORF (Open ReadinG Frame, cadre de lecture ouvert) codant l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lac* (Figure 16).

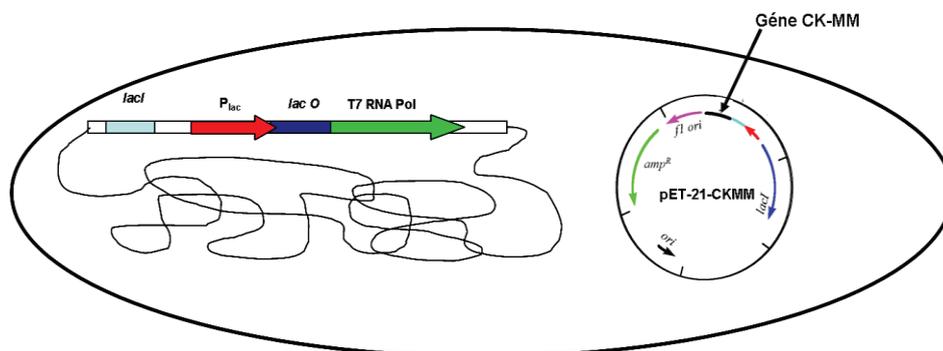


Figure 16 : Représentation schématique d'une cellule *E. coli* BL21 (DE3) transformée par le plasmide recombinant *pET-21-CKMM*.

⁴ Création de pore minuscule à la surface de la membrane bactérienne (technique utilisée $CaCl_2$).

Avant l'induction le répresseur (tétramère) LacI, synthétisé à partir du gène *lacI*, se fixe sur l'opérateur lactose : LacO (localisé sur le génome modifié de la cellule bactérienne) empêchant ainsi la fixation de l'ARN polymérase. L'ARN polymérase T7 n'est pas synthétisée donc il n'y a pas d'expression de la CK-MM (Figure 17A).

Lors de l'induction par l'IPTG (IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside, analogue non métabolisable du lactose), le répresseur fixe l'inducteur. Ce complexe n'interagit pas sur le promoteur lactose permettant ainsi la fixation de l'ADN polymérase. L'ARN polymérase T7 synthétisée se fixe sur l'opérateur T7 (apporté par le vecteur recombinant) et induit l'expression de la CK-MM (figure 17B).

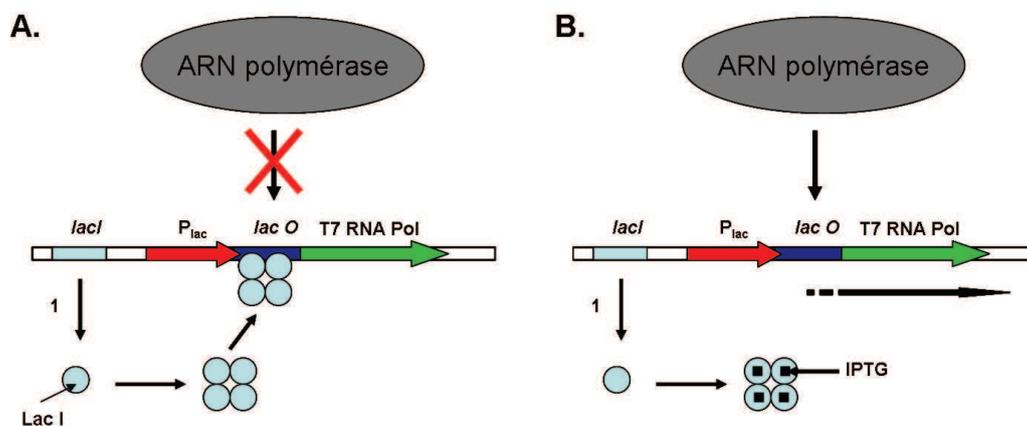


Figure 17 : Principe de l'expression de l'ARN polymérase T7. **A)** Avant induction, le répresseur LacI (tétramère) se fixe sur l'opérateur LacO et empêche la fixation de l'ARN polymérase bactérienne d'interagir avec celui-ci **B)** A l'induction, l'IPTG interagit avec le répresseur et l'empêche de se fixer sur l'opérateur. Ainsi l'ARN polymérase peut interagir avec son opérateur et induire la transcription nécessaire pour synthétiser la CK-MM. 1 indique l'étape de transcription du gène *lacI* en ARNm, et la traduction de celui-ci par l'ARN polymérase.

II.1.2. Production et purification de la protéine CK-MM de lapin

II.1.2.1. Production de la CK-MM non marquée et marquée uniformément en ^{15}N .

La stratégie d'expression que nous avons choisie d'utiliser est une variante de celle proposée dans la littérature (91). Une colonie de bactéries *E. coli* BL21 (DE3) transformée par le vecteur recombinant pET-21-CKMM est transférée dans 50 mL de milieu LB (1%

bactériotryptone ; 0.5% d'extrait de levure ; 1% NaCl) contenant 50µL d'ampicilline (solution stock à 50 mg/mL). Cette préculture est incubée à 37°C sous agitation (~ 220 rpm) pendant toute la nuit.

25 mL de préculture sont ajoutés à un litre de milieu LB supplémenté par 1 ml d'ampicilline. Le milieu de culture est incubé à 37°C, jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,7 (ce qui correspond à environ 3 heures). L'expression de la protéine est induite par l'ajout de 1 mL d'IPTG à 1M dans le litre de milieu de culture. Cinq heures après l'induction, la culture est centrifugée pendant 10 min à 3000g à 4°C. Les culots bactériens sont ensuite congelés à -80°C dans l'attente de la purification. Cette étape permet de fragiliser les membranes bactériennes.

Pour le marquage uniforme en ^{15}N , le protocole de production est identique à celui présenté précédemment. Seul le milieu de culture est différent. En effet, on utilise 1 litre de milieu M9 enrichi contenant : 940 mL de milieu minimum M9 (KH_2PO_4 à 96 mM, K_2HPO_4 à 57 mM, K_2SO_4 à 14 mM, Na_2HPO_4 à 25 mM, 1g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Euriso-top), pH=7,2) préalablement autoclavé (20 min à 120°C) supplémenté par 20 mL d'une solution de glucose à 1 M ; 5 mL de MgCl_2 à 1M ; 5 mL de CaCl_2 à 45 mM ; 5 mL de thiamine à une concentration de 5 mg/mL, 5 mL de solution "d'éléments trace" (92) et 1 mL d'ampicilline.

II.1.2.2. Stratégie de marquage d'une protéine de haut poids moléculaire la CK-MM (86 kDa).

L'étude RMN de protéine de haut poids moléculaire est complexe, deux difficultés majeures sont observées:

- la superposition des taches de corrélation peut être à l'origine de nombreuses ambiguïtés dans l'attribution des systèmes de spins.
- et l'augmentation de la largeur des signaux RMN avec la taille de la protéine. La largeur à mi-hauteur des résonances est proportionnelle au temps de relaxation transversale T_2 (vitesse $R_2 = 1/T_2$). En effet, le signal RMN s'écrit :

$$s \propto e^{2i\omega t} \times e^{-t/T_2} \quad (3)$$

et la largeur à mi-hauteur d'une raie est calculée après transformée de Fourier et on obtient (93) :

$$\Delta \nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^*} \quad (4)$$

Avec T_2^* correspond au temps de relaxation transversale T_2 auquel vient s'ajouter un terme dû aux inhomogénéités du champ magnétique statique. T_2 est proportionnel à τ_c , le temps caractéristique de réorientation globale de la molécule, lui-même dépendant de la taille de la molécule (93). En effet :

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2^*} \quad (5)$$

Dans l'approximation d'une molécule sphérique de rayon r , τ_c a pour expression :

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT} \quad (6)$$

où η est la viscosité du solvant, r le rayon hydrodynamique efficace de la protéine, k la constante de Boltzmann et T la température absolue.

Le rayon hydrodynamique peut être estimé à partir de la masse moléculaire de la protéine (M_w) :

$$r = \sqrt[3]{\frac{3M_w}{4\rho N_a} + r_\omega} \quad (7)$$

où ρ est la densité moyenne pour les protéines ($1,37 \text{ g/cm}^3$), N_a le nombre d'Avogadro, et r_ω le rayon d'hydratation.

Ainsi plus la protéine étudiée a un poids moléculaire important, plus le temps de corrélation s'allonge et plus la constante de temps T_2 est court (R_2 est long) et donc plus la largeur de raie augmente (Figure 18).

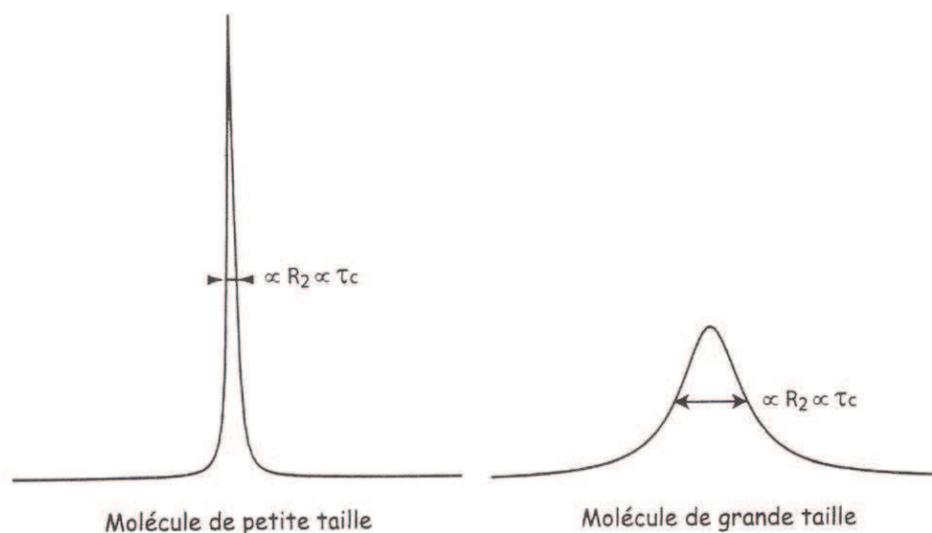


Figure 18: Comparaison de la forme d'un signal RMN, en absence d'échange, en fonction de la taille de la protéine (Figure issue de (94)).

Par conséquent, tout phénomène qui tend à augmenter T_2 (à diminuer R_2) induira une réduction de la largeur de raie. Il existe des avancées technologiques importantes en RMN depuis 20 ans, telles que des spectromètres à très hauts champs (1GHz) et des cryosondes qui améliorent tant la dispersion spectrale que la sensibilité. Les spectres RMN peuvent être également simplifiés en réalisant un marquage isotopique uniforme ou sélectif. Dans notre étude, nous utilisons trois stratégies :

- La perdeutération de la CK-MM
- Le marquage uniforme en ^{15}N et/ou ^{13}C
- Le marquage sélectif en ^{15}N de différents résidus de la protéine

La perdeutération consiste à remplacer tous les protons (^1H) présents dans une protéine par des deutériums (^2H ou D). Ce marquage isotopique uniforme permet d'augmenter le rapport signal sur bruit des spectres hétéronucléaires multidimensionnels, grâce à deux phénomènes :

- Une diminution de la vitesse de relaxation des spins ^{15}N
- Une suppression de l'effet de diffusion de spin.

En effet, la substitution d'un proton par un deutérium induit une diminution significative de l'interaction entre cet isotope et un spin ^{15}N directement lié, en raison de la différence entre les valeurs des rapports gyromagnétiques des deux isotopes ($\gamma_{\text{H}} \approx 6,5\gamma_{\text{D}}$). La vitesse de

relaxation transversale, dont la principale source dans les expériences hétéronucléaires est l'interaction dipolaire, est fortement diminuée (T_2 divisé par un facteur 2) (95).

De plus, la perdeutération permet la diminution de la "fuite" de l'aimantation à travers de multiples chemins de relaxation homonucléaire ^1H - ^1H (Figure 19). Cet effet, appelé diffusion de spin, contribue à la relaxation longitudinale et augmente avec le poids moléculaire de la molécule étudiée. Ainsi, en diminuant la diffusion de spin, on améliore la qualité des spectres (96).

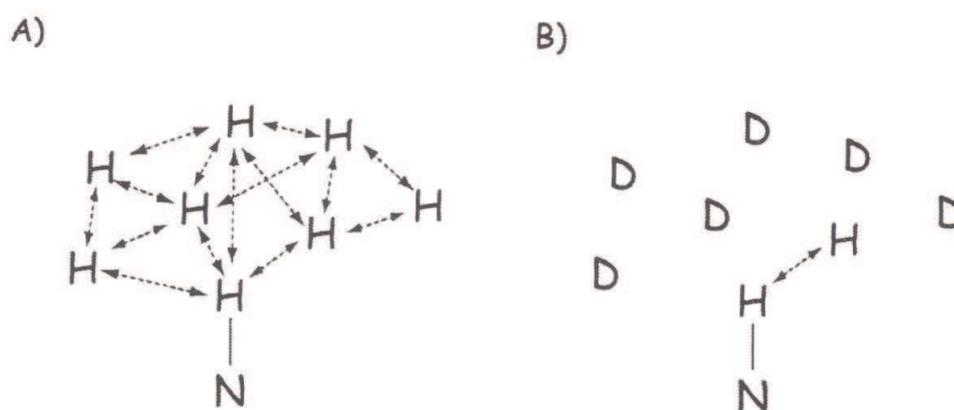


Figure 19: **A)** Effet de la diffusion de spin sur une protéine non deutérée, **B)** Suppression de l'effet de diffusion de spin dans le cas d'une protéine deutérée.

L'étape du marquage, surtout lorsqu'il est multiple, est un point critique en terme de rendement de production bactérienne et d'expression de la protéine. En effet, l'ajout de deutérium dans le milieu minimum, réduit considérablement la vitesse de croissance bactérienne, et donc la quantité de protéines marquées produites. La production de protéines marquées a un coût significatif compte tenu des quantités et du prix des isotopes utilisés, et nécessite des périodes d'optimisation du protocole d'expression (Tableau 4). Les coûts des isotopes stables ont cependant considérablement diminué en 10 ans compte tenu d'un marché important depuis 2000.

Marquage	^{15}N - NH_4Cl	^{13}C -glucose	D_2O
Quantité	1 g	4 g	1 L
Prix (en €)	11,50	180	250

Tableau 4: Prix des différents isotopes utilisés lors des marquages de la CK-MM en 2010.

La stratégie de culture bactérienne et d'expression, que nous avons choisie d'utiliser pour la production de la CK, est une adaptation de celle décrite dans la littérature (97). Ce protocole permet d'obtenir d'importantes quantités de protéines marquées en minimisant la quantité d'isotopes nécessaire.

II.1.2.2.1. Marquage isotopique U-²H/¹⁵N ou U-²H/¹⁵N/¹³C de la CK-MM

Ce protocole a été utilisé au laboratoire avant mon arrivée durant le stage de Master 2 d'Anna LABERNADIE en 2008. Le but de ce protocole est de concentrer un maximum de cultures bactériennes obtenues en milieu LB dans un milieu minimum synthétique M9 (D₂O, ¹⁵NH₄Cl, ¹³C-glucose pour le marquage uniforme ou ¹⁵N-{Gly, Val, Ala} pour le marquage sélectif), puis d'induire l'expression de la protéine recombinante (97). Le niveau d'expression de la CK-MM en fonction du facteur de concentration de cultures bactériennes en milieu M9 a été vérifié. Il a été observé que le taux d'expression diminue au-delà d'un facteur de concentration égal à 6 (soit 1,5 L de milieu LB concentré dans 250 mL de milieu M9). Le protocole utilisé pendant ma thèse est présenté dans la Figure 20.

Dans le cas de la production de U-²H/¹⁵N CK-MM, une préculture en milieu LB de 150 mL, supplémentée par 150 µL d'ampicilline concentrée à 50 mg/mL, est incubé à 37°C sous agitation pendant une nuit (comme décrit dans la section II.1.2.1).

Par la suite 125 mL de préculture est répartie uniformément dans 5 × 1 L de milieu LB supplémenté par 1 mL d'ampicilline. Les 5 L de milieu LB sont incubés à 37°C, jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,6. Par centrifugation à 3000g (pendant 20min à 4°C), nous récupérons le culot bactérien des 5 L de milieu LB. Le culot est repris et lavé dans du milieu M9 deutérée (KH₂PO₄ à 96 mM, K₂HPO₄ à 57 mM, K₂SO₄ à 14 mM, Na₂HPO₄ à 25 mM, pH=7,8, 960 mL de D₂O (à 99.9%, Sigma Aldrich)) afin d'éliminer toute trace d'élément non marqué (tel que ¹⁴NH₄Cl). Puis une seconde étape de centrifugation à 3000g permet de sédimenter à nouveau le culot bactérien. Celui-ci est re-suspendu dans 60 mL de milieu M9 deutérée. Cette suspension est ajoutée à 1 L de milieu M9 deutérée supplémenté par 20 mL d'une solution de glucose à 1 M ; 1g ¹⁵NH₄Cl, 5 mL de MgCl₂ à 1M ; 5 mL de CaCl₂ à 45 mM ; 5 mL de thiamine à une concentration de 5 mg/mL, 5 mL de solution d'éléments trace et 1 mL d'ampicilline à 50 mg/mL. Après 1 heure d'incubation à 37°C sous agitation,

l'induction débute après l'ajout d' 1 mL d'IPTG à 1 mM. Après 5 heures d'induction la culture est centrifugée à 3000g pendant 20min. Le culot obtenu est ensuite conservé à -80°C.

Dans le cas de la production de U- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ CK-MM, le ^{13}C -glucose remplace le glucose non marqué dans le protocole précédent.

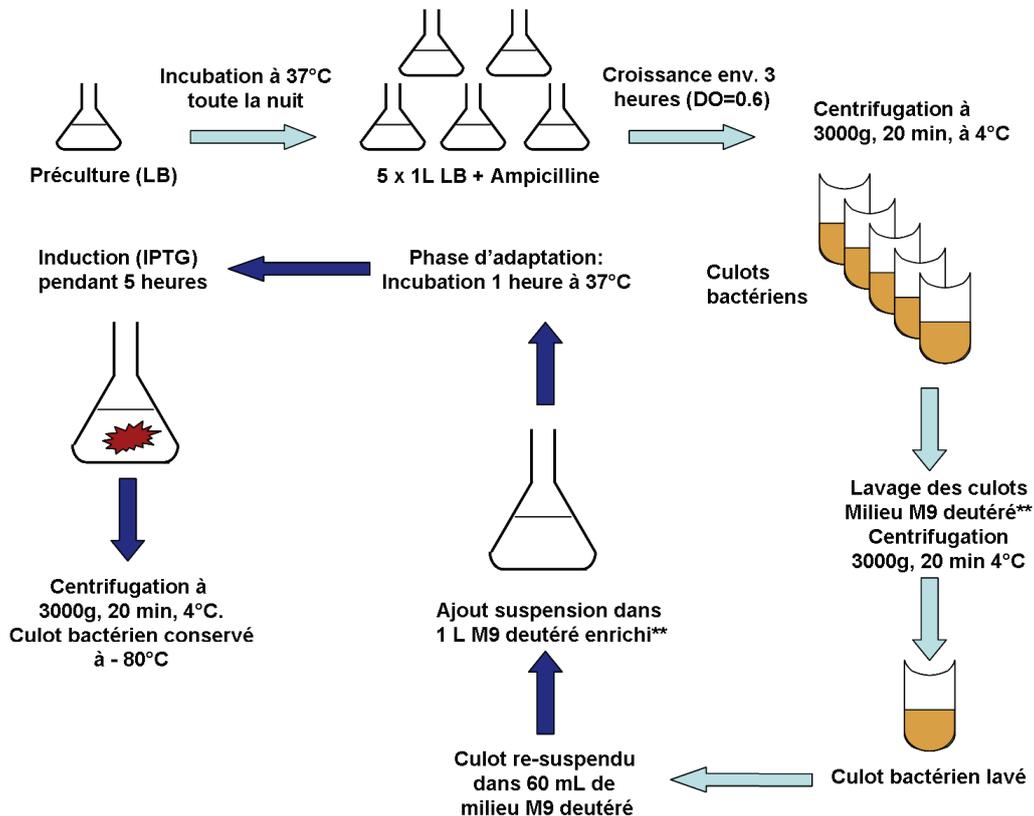


Figure 20: Schéma de principe de production de la CK-MM marquée $^{15}\text{N}/^2\text{H}$.

II.1.2.2.2. Marquage U- ^2H et ^{15}N -{Gly, Val Ala} de la CK-MM

La stratégie de marquage multiple sélectif est une combinaison de la stratégie proposée dans la littérature (98) et de celle présentée dans le chapitre précédent. En effet, l'étape de croissance bactérienne dans le milieu LB est identique à celle de la Figure 21. Le marquage sélectif ^{15}N -GAV de la CK-MM est réalisé. De ce fait, le milieu minimum M9 n'est pas supplémenté en ^{15}N - NH_4Cl .

Avant l'inoculation de la suspension bactérienne on ajoute les autres acides aminés non marqués (dont la quantité est répertoriée dans le Tableau 5), 20 mL d'une solution de glucose à 1 M ; 5 mL de MgCl_2 à 1M ; 5 mL de CaCl_2 à 45 mM ; 5 mL de thiamine à une

concentration de 5 mg/mL, 5 mL de solution d'éléments trace et 1 mL d'ampicilline dans le milieu M9 deutéré. Les résidus marqués sont ajoutés après la phase d'adaptation : Glycine : 250 mg, Valine : 100 mg, et Alanine : 600 mg. Après 30 min⁵, l'induction peut débuter. Les concentrations en acides aminés ajoutés dans le milieu M9 sont saturantes pour l'organisme. De cette façon *E. coli* utilise dans le milieu extérieur les acides aminés ajoutés au lieu de les synthétiser, ainsi les risques de diffusion du marquage sont minimisés.

Acides aminés	Quantité pour 1 litre (en g)
Arginine (Arg)	0,40
Acide aspartique (Asp)	0,40
Cystéine (Cys)	0,05
Histidine (His)	0,10
Isoleucine (Iso)	0,23
Leucine (Leu)	0,65
Lysine hydrochloride	0,42
Méthionine (Met)	0,25
Phénylalanine (Phe)	0,13
Proline (Pro)	0,10
Serine (Ser)	2,10
Thréonine (Thr)	0,23
Tyrosine (Tyr)	0,17
Tryptophane (Trp)	0,15

Tableau 5 : Résumé des quantités d'acides aminés non marqués pour 1 L de milieu M9 (98).

II.1.2.2.3. Purification

La stratégie de purification utilisée ici est celle proposée dans la littérature (91). Le protocole est identique quel que soit le marquage isotopique de la CK-MM. Ce protocole a été optimisé pour la purification de la CK-MM deutérée. Nous avons observé que l'augmentation du pH des tampons de purification de 0,4 unité de pH, permettait une nette amélioration du rendement de purification. Les rendements des différentes étapes de purification et de lyophilisation sont estimés sur l'activité enzymatique spécifique de la CK-MM, calculés à partir de la méthode " pH-STAT" (cf section II-1-4).

Après l'étape de congélation à -80°C, les culots bactériens sont re-suspendus dans 30 mL de tampon NaH₂PO₄ (20mM, pH6 ; 0,1mM EDTA). Après lyse des bactéries par sonication (Sonicateur : Satorius stedim LABSONIC-P), à 4°C pendant 3 fois un cycle de 3

⁵ Pour permettre aux cellules d'incorporer les acides aminés ajoutés.

min, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (15 min à 14000g, 4°C). Une mesure de l'activité enzymatique (cf section II-1-4) des surnageants collectés (100 mL) indique un rendement de production de 7 mg/L de culture.

Le surnageant issu du lysat bactérien est déposé sur une colonne d'affinité de type "Blue Sepharose 6 Fast Flow" (GE Healthcare Bio-Science Corp.), préalablement équilibrée avec du tampon de charge (NaH₂PO₄ 20mM pH6 ; EDTA 0,1 mM ; DTT 1mM). La protéine est éluée par un changement de pH (à l'aide d'un tampon 20 mM Tris pH 8 ; 0,1mM EDTA ; 1mM DTT).

La collection de fractions enzymatiquement actives est ensuite déposée, après vérification du pH (proche de 8), sur une colonne échange d'ions de type "Source 15Q" (GE Healthcare Bio-Science Corp.), préalablement équilibrée avec 20 mM Tris (pH 8 ; 0,1mM EDTA ; 1mM DTT). Cette deuxième étape chromatographique permet d'éliminer les nucléotides absorbés à la surface de la protéine et donc d'améliorer considérablement la pureté de la CK-MM. A la fin de cette étape de purification nous récoltons de manière générale, pour 5 L de culture, un volume d'échantillon de CK-MM native et active de 100 mL. La concentration de cet échantillon estimée par l'activité enzymatique est en moyenne de 16 µM.

Pour enregistrer une expérience RMN il faut que la protéine produite soit concentrée, pure, et dans un tampon qui ne donne pas de signal dans la gamme de déplacement chimique des ¹H amides de la protéine, comme par exemple un tampon phosphate.

La CK-MM devra être concentrée au minimum à 200 µM dans 500µL de tampon 20 mM phosphate pH 6,8. La CK-MM est une protéine qui peut être lyophilisée, c'est pourquoi dans un premier temps cette technique a été utilisée pour la concentrer. Après une étape de lyophilisation totale, nous obtenons une poudre qui est reprise avec 500µL de tampon phosphate 20 mM à pH 6,8. Cette étape est délicate car il est difficile de re-suspendre la totalité de la poudre qui reste sur la paroi du ballon. De plus, selon le marquage de la CK-MM nous avons observé une chute importante du rendement de lyophilisation (marquage ¹⁵N simple : R = 86% ; marquage ¹⁵N/²H : R = 5%). Ce résultat est probablement dû à une modification de la stabilité thermodynamique de la protéine deutérée. Dans la littérature ce phénomène est reconnu pour de nombreuses protéines (99, 100). Afin de limiter la perte de

protéine active nous avons étudié d'autres méthodes de concentration afin de remplacer l'étape de congélation inhérente à la lyophilisation. Nous avons choisi pour la suite d'utiliser des filtres à centrifuger (AMICON de rejection à 10 kDa, Millipore) pour concentrer la CK-MM. Dans les cas où la CK-MM est marquée U-¹⁵N et U-¹⁵N/²H, nous obtenons un rendement de plus de 85%. La pureté de la protéine marquée est ensuite vérifiée par SDS-Page (Figure 21) (101).

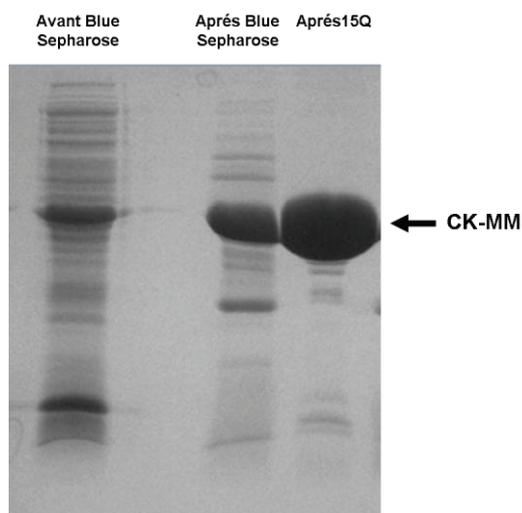


Figure 21 : Evolution de la purification de la CK-MM par SDS-page. Les échantillons déposés sont préparés avec 10 μ L de solution et 10 μ L de solution de dépôt 2 \times .

II.1.3. Etape de dénaturation / renaturation de la CK-MM deutérée

L'étape de dénaturation/renaturation est nécessaire pour permettre l'acquisition des signaux ¹H en RMN, car elle permet l'échange total des deutériums labiles de la protéine⁶ par un proton (Figure 22) y compris ceux qui ne sont pas accessibles au solvant.

⁶ Même les résidus enfouis sont échangés.

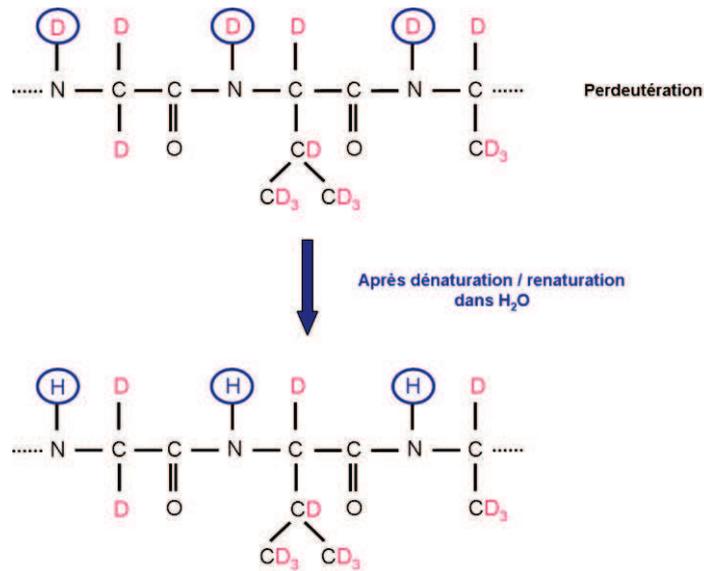


Figure 22 : Représentation des échanges $^2\text{H}/^1\text{H}$ effectués après une étape de dénaturaton / renaturaton dans l'eau (H_2O).

Le protocole de dénaturaton/renaturaton a été proposé par Clottes *et al.* (102). Les différentes étapes sont présentées par la Figure 23. La dénaturaton de la créatine kinase est initiée par l'ajout de chlorure de guanidinium. Selon Hagihara *et al.*, ce composé est un agent de dénaturaton chaotropique qui facilite la pénétraton de l'eau dans les zones hydrophobes de la protéine, déstabilise les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes (103). Pour une concentration de 0,8 M la dénaturaton est totale au bout d'une heure, la perte d'activité enzymatique de la CK est vérifiée. La renaturaton est initiée par dilution de l'agent dénaturant à une concentration de 0,3 M. Cette opération se déroule sur la nuit, ce qui permet d'avoir un maximum de CK renaturée (pas d'activité enzymatique mesurable car la protéine est trop diluée). Selon Leydier *et al.*, l'ajout de DTT avant l'étape de renaturaton permet de réduire les fonctions thiols de la protéine dénaturée pour éviter la formation de ponts dissulfures abortifs inter ou intra-chaînes (104).

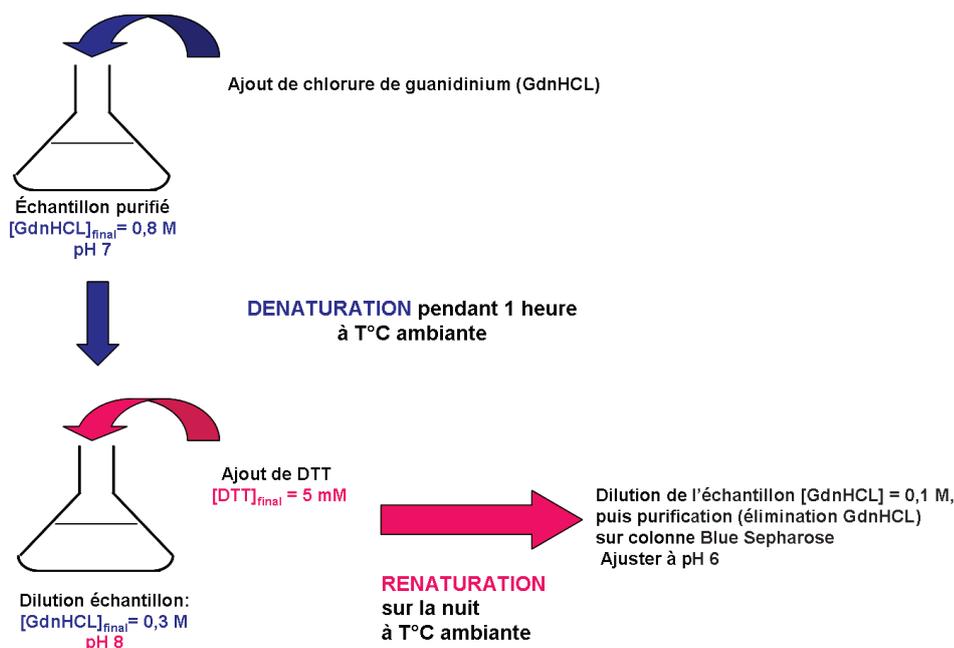


Figure 23 ; Schéma de principe du protocole de dénaturation/renaturation de la CK-MM marquée ^2H .

L'échantillon renaturé est dilué afin que la concentration en chlorure de guanidinium soit à 0,1M, puis déposé sur la colonne de Blue Sepharose de manière à ce qu'elle ne soit pas saturée. Le rendement à la suite de l'étape de dénaturation / renaturation est estimé, sur l'activité enzymatique spécifique de la CK-MM (cf section II-1-4), à seulement 20%. Nous avons tenté des modifications du protocole. Pour cela nous avons testé deux températures de renaturation à 24°C et à 10°C. Les rendements de l'étape de dénaturation /renaturation à ces deux conditions ont été estimés à 30%. Compte tenu des difficultés nous avons alors décidé de ne pas effectuer cette étape. Ainsi seuls les groupements amides accessibles au solvant seront re-échangés et observés sur un spectre de type ^1H - ^{15}N HSQC.

II.1.4. Mesure d'activité enzymatique par le « pH-stat »

Le "pH-stat" est une méthode qui permet de suivre l'évolution d'une réaction enzymatique. Elle exploite la libération d'un proton lors de la réaction enzymatique de la CK-MM (105), dans le sens de la formation de la phosphocréatine et de l'ADP. Dans une cellule thermostatée à 30°C, sont introduits les substrats en excès soit : 1 mL d'une solution de MgADP (8 mM) et 1 mL d'une solution de créatine (80 mM), avant l'ajout de 5 μL d'échantillon CK-MM à mesurer. Les protons apparus lors de la réaction sont immédiatement neutralisés par addition automatique de soude à 10^{-2} M afin de maintenir constant le pH du

milieu réactionnel fixé à 8,8 (pH optimum de la CK-MM dans ce sens). La mesure de la quantité de soude ajoutée en fonction du temps permet l'estimation de l'activité enzymatique contenue dans l'échantillon, et donc de la concentration en enzyme active, sur la base de l'activité spécifique de la CK-MM (120 μ mol/min/mg)(105).

II.2. Méthodes RMN : Etude dynamique de la CK-MM.

II.2.1. Méthodes générales :

Les expériences RMN ont toutes été réalisées à 28°C (301 K) sur un spectromètre Varian *Inova* 600 MHz équipé d'une sonde triple résonance $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. Les échantillons sont préparés dans du tampon phosphate de sodium 20 mM à pH = 6,8 supplémenté par 10% D_2O , et 0,01% (p/v) NaN_3 pour un volume total de 500 à 600 μL .

Les expériences RMN enregistrées au cours de cette thèse proviennent de la librairie de séquences RMN : *Biopack Varian*. Les paramètres d'acquisition des expériences 2D de type ^1H - ^{15}N HSQC et des expériences 3D de type HN(CO)CA, HNCA et HNCO sont répertoriées dans les tableaux 6 page 50 et 5 page 49 respectivement.

Les données RMN ont été traitées avec NMRPipe (106) et visualisées par NMRViewJ (107) ou SPARKY (108). Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 sont obtenues grâce au logiciel NMRViewJ (107). Les valeurs de vitesse R_1 et R_2 sont calculées à partir des intensités de résonances extraites des spectres RMN puis ajustées par une fonction exponentielle de type :

$$I = A \times e^{-R_1 t} \quad (8)$$

$$I = A \times e^{-R_2 t} \quad (9)$$

L'incertitude sur l'intensité des pics est estimée à partir de l'écart type du bruit des spectres et des intervalles de confiances des R_1 et R_2 par des simulations Monte Carlo.

Les variations de déplacement chimique sont calculées à partir du logiciel MATLAB à partir de l'équation suivante :

$$\Delta \delta = \left[\left(\delta_{1\text{H}} \right)^2 + \left(\delta_{15\text{N}} / 5 \right)^2 \right]^{1/2} \quad (10)$$

Le calcul d'accessibilité au solvant, de la CK-MM (1U6R), ont été réalisés en utilisant les paramètres proposés par défaut de Naccess (109).

II.2.2. Les expériences 2D : HSQC et HSQC-TROSY.

II.2.2.1. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Les expériences HSQC (110) sont des expériences bidimensionnelles hétéronucléaires qui permettent l'observation des corrélations entre proton et azote directement liés ^1H - ^{15}N via les couplages scalaires des liaisons amides de la protéine (notée 1J) (Figure 24A). Il est donc nécessaire que la protéine soit marquée uniformément ou sélectivement en ^{15}N . Il est ainsi possible d'observer chaque résidu de la protéine selon des coordonnées correspondant à chaque couple NH (sauf les prolines, et les résidus de l'extrémité N-terminale).

II.2.2.2. Séquence TROSY

La largeur de raie des signaux RMN dépend des interactions dipolaires et de l'anisotropie de déplacement chimique (CSA = *Chemical shift Anisotropy*) (111). Le couplage dipolaire correspond à la capacité que possèdent deux noyaux dotés de spins nucléaires proches dans l'espace (inférieur à 5 Å) à interagir directement entre eux. L'anisotropie de déplacement chimique est la conséquence d'une interaction entre le nuage électronique de chaque atome avec le champ magnétique statique B_0 . Cette interaction est directement proportionnelle à B_0 . Les séquences TROSY (111) utilisent ces paramètres de relaxation pour améliorer l'exploitation des spectres RMN complexes. Contrairement aux séquences de type HSQC qui découplent l'information, conduisant à une raie moyennée sur le spectre dans deux dimensions (Figure 24A), les séquences TROSY utilisent le fait que les raies non découplées dans les deux dimensions du spectre ont des formes caractéristiques d'une répartition bien spécifique des paramètres de relaxation. En effet, pour chaque raie, les termes de couplage dipolaire et CSA prennent des valeurs qui se soustraient ou s'ajoutent (Figure 24B), la technique TROSY permet de ne conserver que la composante la plus fine du multiplet (Figure 24C), permettant ainsi d'améliorer très sensiblement la résolution.

Cette technique permet d'obtenir le terme CSA le plus grand donc les raies les plus fines (112) et de repousser les limites de la taille d'analyse des édifices moléculaires à environ 100 kDa (113).

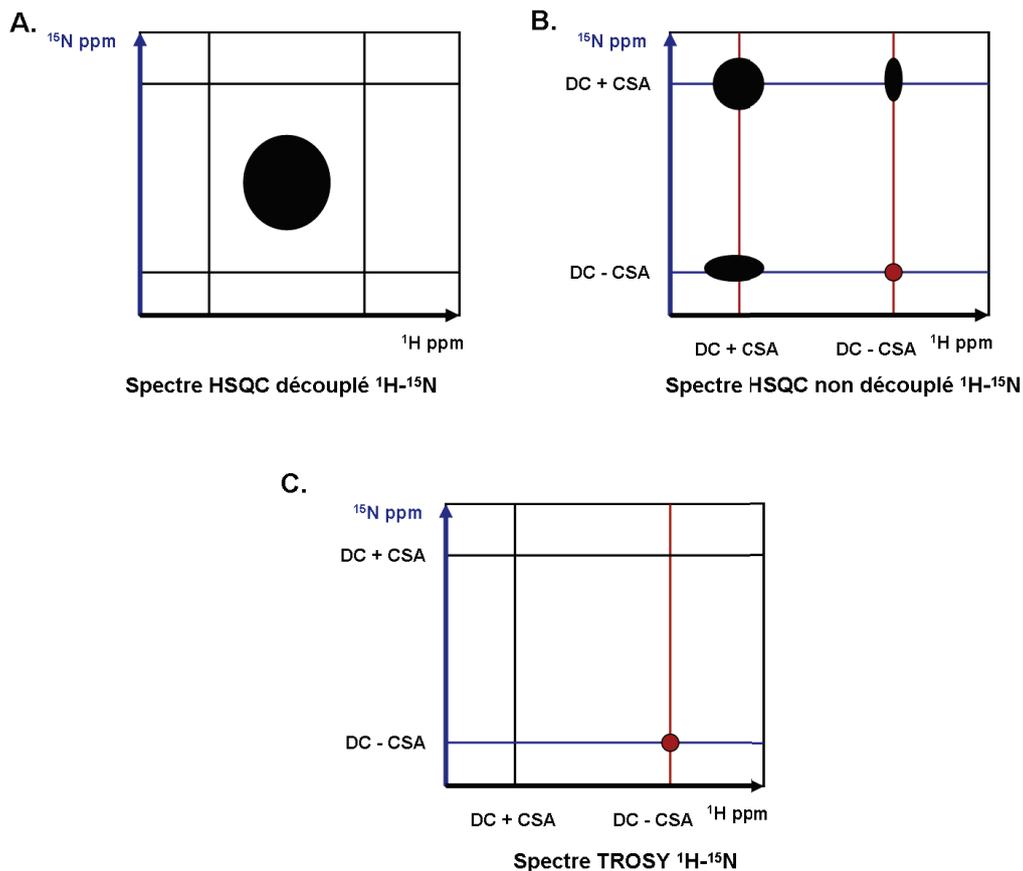


Figure 24 : Schéma du principe des spectres HSQC et HSQC-TROSY. **A)** schéma simplifié d'une corrélation de type HSQC découplé en ^1H et ^{15}N . **B)** Chaque raie du spectre HSQC non découplé présente une forme spécifique (largeur de raie), caractéristique des interactions entre le couplage dipolaire (DC) et l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) dans les deux dimensions. **C)** Les séquences de type HSQC-TROSY permettent de ne conserver que la composante la plus fine du multiplet.

Cette approche n'est pas toujours synonyme de gain de sensibilité. Pour une protéine non deutérée, la proximité des protons favorise l'auto-relaxation par rapport à la relaxation croisée et l'approche TROSY se révèle être de sensibilité comparable à une expérience HSQC. En revanche, sur un échantillon deutéré l'expérience TROSY apporte un gain considérable en résolution et en sensibilité.

II.2.3. Attribution de la CK-MM.

L'attribution de la chaîne principale d'une protéine est une étape importante afin d'avoir accès à des informations structurales et dynamiques. Pour effectuer cette étape, la CK-MM est marquée uniformément en $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. La méthode d'attribution repose sur une combinaison d'expériences hétéronucléaires 3D qui permettent la corrélation de l'azote et du proton d'un résidu i avec un troisième atome, un carbone du même résidu ou du résidu $i+1$.

Ces corrélations se font par le transfert successif de l'aimantation à travers 1, 2, ou 3 liaisons covalentes via des couplages scalaires $^{1,2,3}J$ (96, 114). Le principe des expériences utilisées est représenté dans la Figure 25 : il s'agit des expériences HN(CO)CA, HNCA, et HNC(O) (115).

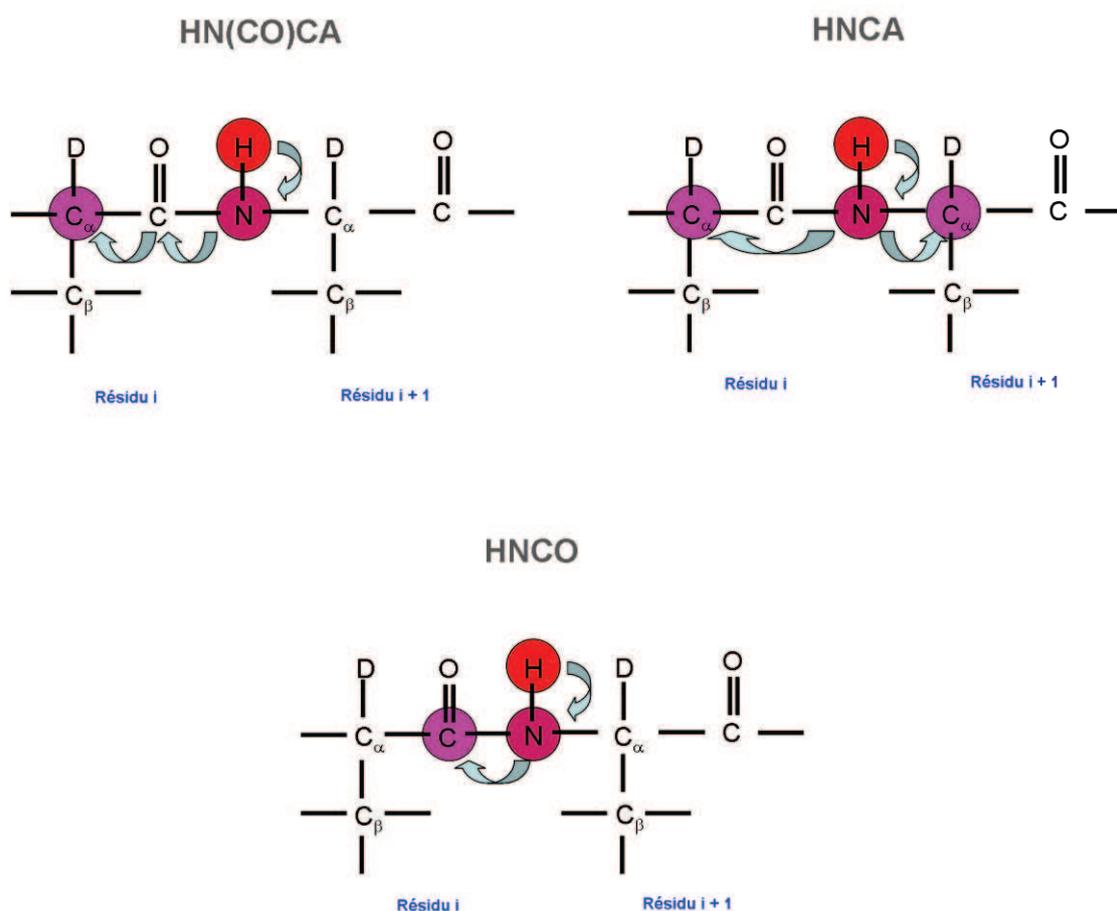


Figure 25: Principe du transfert de l'aimantation le long de la chaîne peptidique d'une protéine deutérée.

L'expérience HN(CO)CA permet à partir du 1H amide du résidu $i+1$ d'identifier le carbone α du résidu i . De la même manière, les expériences HNCA et HNC(O) permettent respectivement l'identification des carbones α des résidus i et $i+1$, et le carbone du groupement carboxyle du résidu i . L'ensemble de ces données permet de connecter des résidus consécutifs dans la séquence et donc de retracer la connexion de toute la chaîne peptidique.

Afin de valider l'attribution de la CK, l'expérience 3D ^{15}N -NOESY-HSQC (116) a été enregistrée. Cette expérience permet de corréler des protons amides avec d'autres protons proches dans l'espace. Dans le cas d'une protéine deutérée, les principales corrélations

observées sont celles de type $^1\text{H}_\text{N}-^1\text{H}_\text{N}$. En plus d'apporter une vérification de l'attribution séquentielle par la connexion des protons amides voisins, cette expérience permet également de mettre en évidence la présence de structures secondaires par la corrélation des protons amides proches dans l'espace bien qu'éloignés dans la séquence primaire.

Les paramètres d'acquisition de ces différentes expériences sont résumés dans le Tableau 5.

Echantillons	Expériences	ns	t_1 (^1H)	t_2 (^{13}C)	t_3 (^{15}N)	Tm
U- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ –CKMM [CK-MM]= 1,16 mM	HN(CO)CA	20	1024	70	46	X
	HNCA	16	1024	72	44	X
	HNCO	24	1024	64	40	X
U- $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ –CKMM [CK-MM] = 1 mM	NOESY-HSQC	16	1024	100	42	120 ms 200 ms

Tableau 5 : Paramètres d'acquisition des expériences 3D (t_1 (^1H), t_2 (^{13}C), t_3 (^{15}N) sont les nombres de point dans les dimensions proton ^1H , carbone ^{13}C et azote ^{15}N respectivement ; ns= nombre de scans ; et Tm= temps de mélange). Les concentrations en CK-MM sont obtenues par mesure d'activité via pH-STAT.

II.2.4. Expériences de relaxation R_1 , R_2 .

Les mesures des vitesses de relaxation longitudinale R_1 et transversale R_2 permettent d'obtenir des informations sur la dynamique d'une protéine. Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 sont associés respectivement aux temps de relaxation longitudinale T_1 ($1/R_1$) et au temps de relaxation transversale T_2 ($1/R_2$). Ces temps de relaxation sont responsables du retour à l'équilibre de l'aimantation macroscopique après excitation des systèmes de spin par une ou plusieurs impulsions de champs radiofréquence. En effet, le temps de relaxation T_1 caractérise la reconstruction de l'aimantation suivant l'axe d'application du champ magnétique z (selon la loi mono-exponentielle, décrite par l'équation 11) (93).

$$M_z(t) = M_{z0} \times e^{\left(-t \times \frac{1}{T_1}\right)} \quad (11)$$

Et le temps de relaxation T_2 traduit la disparition de l'aimantation du plan de mesure xy (selon l'équation 12).

$$M_{xy}(t) = M_{xy0} \times e^{\left(-t \times \frac{1}{T_2}\right)} \quad (12)$$

où $M_z(t)$ et $M_{xy}(t)$ sont respectivement les composantes longitudinale et transversale de l'aimantation au temps t ; M_{z0} et M_{xy0} sont ces composantes au temps initial.

Dans la pratique, la détermination des paramètres R_1 et R_2 se fait par échantillonnage en temps, des fonctions décroissantes $M_z(t)$ et $M_{xy}(t)$, à l'aide de séquences d'impulsion classiques. Les expériences R_1 et R_2 ont été enregistrées avec un délai de recyclage de 4 secondes.

Les expériences de relaxation sont mesurées pour la CK-MM seule à la concentration de 1 mM et en interaction avec MgADP ou Cr-MgADP-NO₃⁻. Le Tableau 6 fait un bilan des expériences de relaxation enregistrées.

Echantillons	ns	Temps R_1 (en ms)	Temps R_2 (en ms)
U- ² H/ ¹⁵ N-CKMM	32	10, 200 (x2), 800, 1500, 2500, 4000, et 5000.	10, 30, 50, 70 (x2) et 90
U- ² H/ ¹⁵ N –CKMM + MgADP	32	10, 200, 300, 600, 800, 1000 et 1500	
U- ² H/ ¹⁵ N –CKMM +TSAC	32		

Tableau 6 : Paramètres d'acquisition des expériences de relaxation R_1 et R_2 sur les échantillons U-²H/¹⁵N –CKMM seule, en interaction avec MgADP ($[ADP]_{finale}=2$ mM, $[Mg(CH_3COO)_2]_{finale}=10$ mM), puis Cr-MgADP-NO₃⁻ en ajoutant dans le tube RMN : $[créatine]_{finale}=30$ mM, $[Na NO_3]_{finale}=25$ mM.

III. Résultats et discussion

III.1. Attribution de la créatine kinase (CK-MM).

L'étude RMN d'une protéine de haut poids moléculaire telle que la CK-MM (homodimères de 2 x 42 kDa) est complexe (page 34-36). Deux difficultés majeures sont rencontrées (117) :

- La superposition des résonances ^1H - ^{15}N due à un nombre très important de signaux.
- Une augmentation de la largeur des signaux RMN est due à une augmentation de la vitesse de relaxation transversale R_2 .

Lors de notre étude, la CK-MM est marquée uniformément au deutérium, afin d'augmenter le rapport signal sur bruit des spectres hétéronucléaires multidimensionnels enregistrés. Le marquage d'une protéine au deutérium n'est pas sans effet sur sa stabilité thermodynamique (99, 100, 118), structurale (119), fonctionnelle, etc. Les effets sont dépendants des protéines observées. Dans le cas des protéines deutérées suivantes : I^{Ntr} d'*E.coli* (99), de la glutathione-S-transferase (100), et la phycocyanine (118) la température de fusion (T_m) de la dénaturation thermique est abaissée de 5 à 10% environ. Ces résultats sont le reflet de la moindre stabilisation des ^2H dans la liaison hydrogène (117). En effet, Piszczek *et al.* ont mis en évidence une diminution de la température de fusion (T_m) mais aussi une modification de l'enthalpie (ΔH°) pour la protéine deutérée I^{Ntr} d'*E.coli* (99), à partir des études de calorimétrie (DSC : *Differential Scanning Calorimetry*). Or d'après l'équation 12, nous pouvons noter qu'une modification de l'enthalpie provoque une modification du ΔG° (énergie libre entre la forme replié et la forme dénaturé d'une protéine).

$$\Delta G^\circ(T) = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (12)$$

où ΔS° et ΔH° sont l'entropie et l'enthalpie, ces termes sont dépendants de la température.

Dans le cas de la CK-MM nous avons pu noter que l'enzyme sous sa forme deutérée est toujours active, sans différence d'activité spécifique. Nous pouvons donc en déduire que la structure quaternaire de l'homo- dimère est parfaitement conservée. Lors des étapes de concentration par lyophilisation et de dénaturation / renaturation nous avons rencontré des problèmes majeurs de perte d'activité de la CK-MM marquée U- ^2H , ^{15}N . Ces problèmes pourraient être dus à une modification des propriétés thermodynamiques de la CK-MM

lorsqu'elle est deutérée. Cette hypothèse est soutenue par des mesures d'activité enzymatique après simple congélation sur la CK - MM deutérée et protonée. Nous avons observé une perte de 95% d'activité pour la CK-MM marquée $U\text{-}^2\text{H}$ alors que pour la CK-MM protonée une perte de 5% est enregistrée. Si la deuteration de la CK-MM induisait une telle modification de ΔH° et donc un changement de la valeur de ΔG° , le rendement médiocre de l'étape de dénaturation / renaturation en serait peut être la cause. ΔG° est importante lors du repliement de la protéine. En effet, tant que l'énergie libre de repliement ΔG° d'une protéine est négative, la conformation native de la protéine est thermodynamiquement plus favorable que sa conformation dans un état dénaturé (120).

Compte tenu des difficultés rencontrées dans l'étape de dénaturation / renaturation chimique, nous avons alors opté pour un re-échange simple dans H_2O uniquement, de la CK-MM native et active, des protons amides accessibles au solvant. La Figure 26 montre le résultat obtenu après cet échange. La CK-MM est parfaitement stable au cours du temps puisque le spectre HSQC ne varie plus après quelques jours et est reproductible sur plusieurs mois (3 mois pour cette étude).

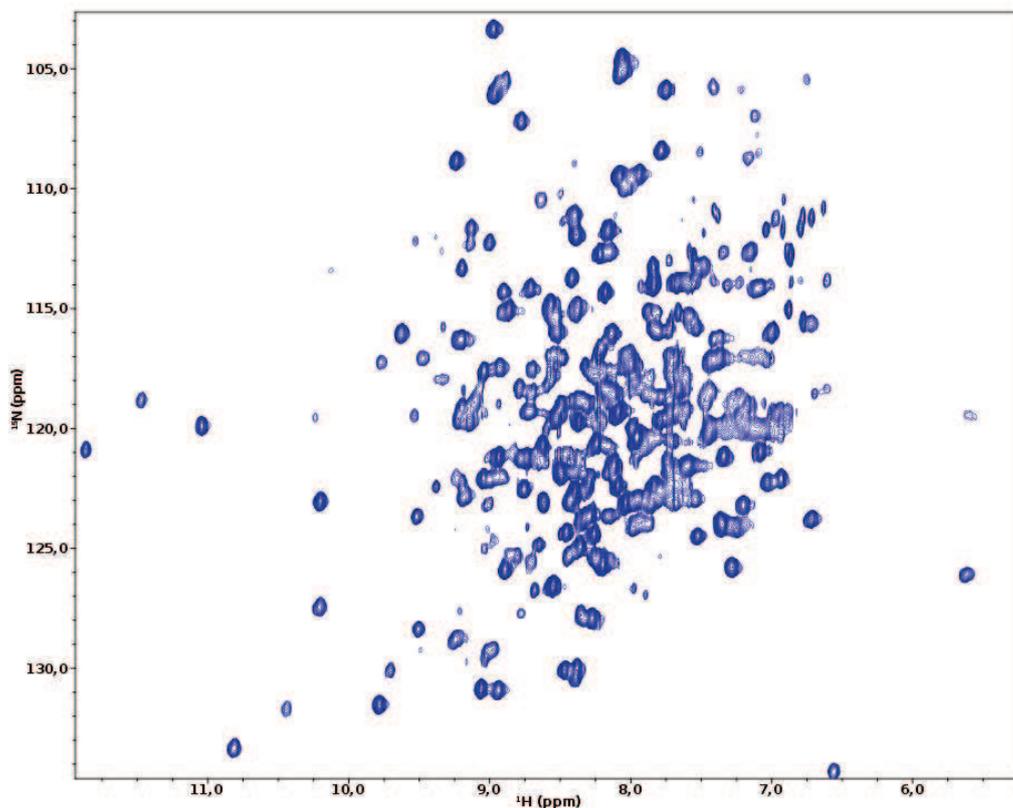


Figure 26 : Expérience HSQC à 28°C de la CK-MM marquée $U\text{-}^{15}\text{N}/^2\text{H}$, concentrée à 1,16 mM dans un tampon 20 mM phosphate à pH=6,8.

On observe une assez bonne dispersion des résonances des protons amides entre 6 et 12 ppm, ce qui est le reflet d'une protéine bien structurée. 161 signaux de corrélation ^1H - ^{15}N peuvent être détectés. Si on considère l'accessibilité au solvant calculée sur la totalité des atomes de la CK-MM homo-dimérique (code PDB 1U6R) on obtient, en fixant comme seuil 25% d'accessibilité, 160 résidus accessibles au solvant dans la sous-unité A (dite ouverte). Ce seuil de 25% est couramment utilisé dans l'étude d'accessibilité au solvant de protéine, il a été proposé par Pollastri *et al.* (121)

On observe également la présence de quelques résonances nettement plus intenses (R_2 faibles), ce qui suggère que ces résidus possèdent une dynamique différente du reste de la protéine. Ces signaux correspondent aux résonances observées par Anna Labernadie en 2008, montrant ainsi la reproductibilité de ses résultats. Dans la structure cristallographique de la CK-MM en absence de substrat, la boucle 320s n'a pu être modélisée (Figure 27B), ce qui suggère que cette boucle pourrait être dynamique (43, 44). De plus, nous pouvons noter que cette boucle est constituée de 4 glycines, 2 valines, et 2 alanines (Figure 27A). Du fait de cette composition particulière, nous avons pensé initialement qu'un échantillon de CK-MM marqué U- ^2H , ^{15}N {Gly-Ala-Val} permettrait à lui seul d'attribuer la boucle 320s. Un monomère de la CK-MM est constitué de 33 glycines, 28 valines et de 13 alanines. Nous avons estimé à partir des accessibilités au solvant calculées, à 23 le nombre total de résidus Gly, Val, Ala accessibles au solvant.

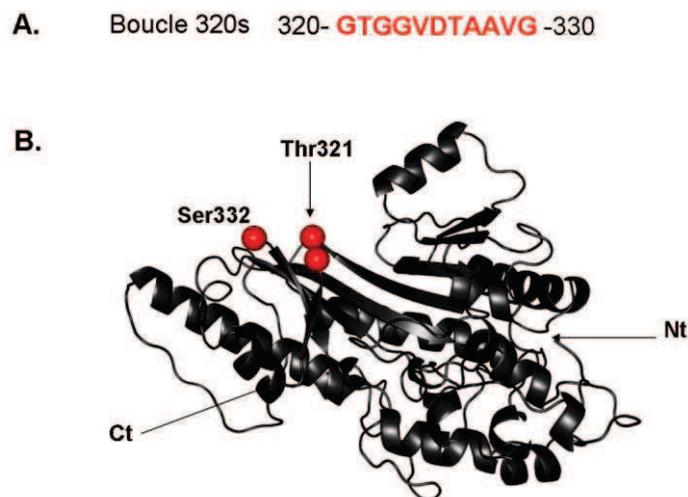


Figure 27 : A) Séquence de la boucle 320s de la CK-MM. B) Structure cristallographique d'un monomère de la CK-MM (code PDB : 2CRK). Les quatre résidus Arg320, Gly321, Thr322, et Ser332 de la boucle 320s non résolus par cristallographie, sont indiqués par une sphère rouge.

La Figure 28 représente les spectres ^1H - ^{15}N HSQC et HSQC-TROSY qui ont été enregistrés sur cet échantillon. Il était en effet intéressant à ce stade, vu la simplicité du spectre, d'estimer le gain éventuel de la méthode TROSY (cf section II.2.2.2. pages 46-47).

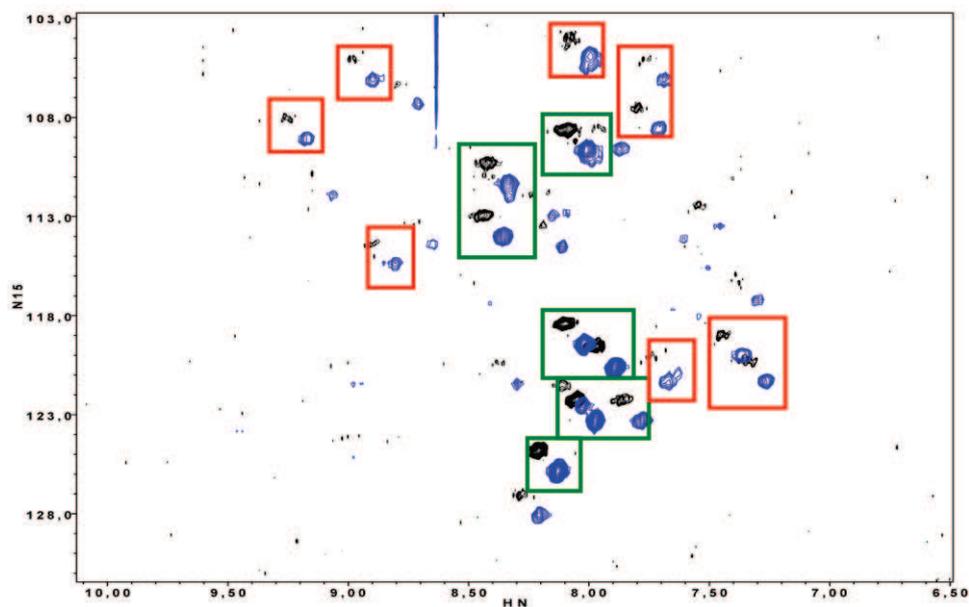


Figure 28: Superposition des spectres HSQC (en noir, 32 scans / incrément t_1) et TROSY-HSQC (en bleu, 160 scans / incrément t_1) réalisés à 28°C sur la CK-MM marquée uniformément ^2H et sélectivement en ^{15}N sur les résidus Gly, Val, Ala et concentrée à 1 mM dans un tampon 20 mM phosphate à pH=6,8. Les signaux améliorés par effet TROSY sont encadrés en rouge et ceux pour lesquels nous observons une amélioration peu sensible sont encadrés en vert.

La superposition des spectres HSQC-TROSY et HSQC met en évidence les différences selon les signaux ^1H - ^{15}N . Certains sont mieux détectés (encadrés en rouge sur la Figure 28), alors que d'autres ont peu ou pas de différence significative (pics intenses encadrés en vert). Ces derniers sont probablement des signaux de segments plus mobiles incluant ceux peut-être de la boucle 320s. Compte tenu de ces observations, nous avons donc préféré enregistrer des spectres HSQC plutôt que HSQC-TROSY. Les expériences HSQC sont suffisantes pour observer les signaux d'éventuels segments mobiles au coût d'une sensibilité globale moindre. En effet, pour comparer à rapport signal sur bruit analogue, les spectres superposés en Figure 28, le nombre de scans par incréments t_1 a dû être multiplié par 5 pour l'expérience TROSY.

Sur le spectre HSQC de l'échantillon CK-MM marqué $\text{U-}^2\text{H}$, $^{15}\text{N}\{\text{Gly, Val, Ala}\}$ nous avons pu identifier d'après les valeurs trouvées dans les tables de déplacements chimiques (δ) (122), deux zones principales de déplacement chimique (Figure 29) :

- Une zone caractéristique des déplacements chimiques des couples NH des résidus Glycine (Gly) compris : $109 < \delta_{15N} < 114$ ppm ; $8,0 < \delta_{1H} < 8,4$ ppm.
- Une zone pouvant correspondre au déplacement chimique des couples NH des résidus Valine (Val) et Alanine (Ala) compris : $115 < \delta_{15N} < 126$ ppm ; $7,3 < \delta_{1H} < 8,7$ ppm.

Afin de distinguer sans ambiguïté sur un spectre 1H - ^{15}N HSQC les résidus valine et alanine, nous avons enregistré une expérience HSQC sur un échantillon de CK-MM marqué U - 2H , ^{15}N -{Gly, Val}. La Figure 29 représente la superposition du spectre 1H - ^{15}N de type HSQC de la CK-MM marqué U - 2H , ^{15}N {Gly, Val} et celui de la CK-MM marquée U - 2H , ^{15}N {Gly, Val, Ala}.

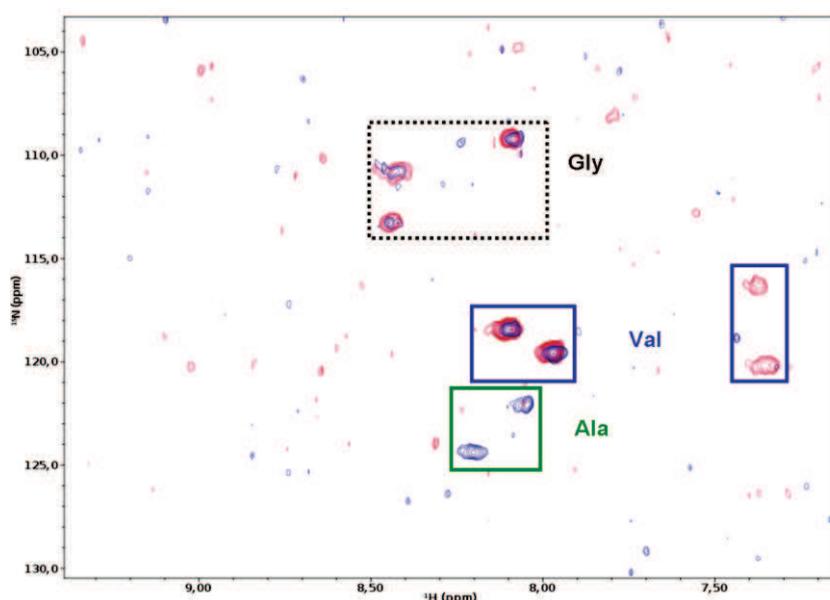


Figure 29: Superposition des spectres 1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM marquée U - 2H , ^{15}N -{Gly-Ala-Val} (en bleu) concentrée à $200 \mu M$ et 1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM marquée U - 2H , ^{15}N -{Gly-Val} (en rouge) concentrée à $260 \mu M$ dans un tampon $20 mM$ phosphate à $pH=6,8$. Les expériences 1H - ^{15}N HSQC sont réalisées à $28^\circ C$.

Nous observons une superposition parfaite des deux spectres 1H - ^{15}N HSQC dans la zone caractéristique des résidus glycines. Le marquage de la CK-MM en ^{15}N {Gly, Val}, permet d'identifier sans ambiguïté que les résidus encadrés en bleu sont des valines et que ceux encadrés en vert sont des alanines. Un échantillon de ^{15}N -{Ala} aurait aussi permis une telle identification.

Dans le but de confirmer les spectres obtenues par Anna Labernadie au Laboratoire, nous avons reproduit une expérience 3D 1H - 1H - ^{15}N NOESY-HSQC sur l'échantillon CK-MM

marqué U- ^{15}N . Sur la Figure 30, on observe les couplages nOes inter et intra- résidus qui permettent de proposer une attribution séquentielle de la région flexible.

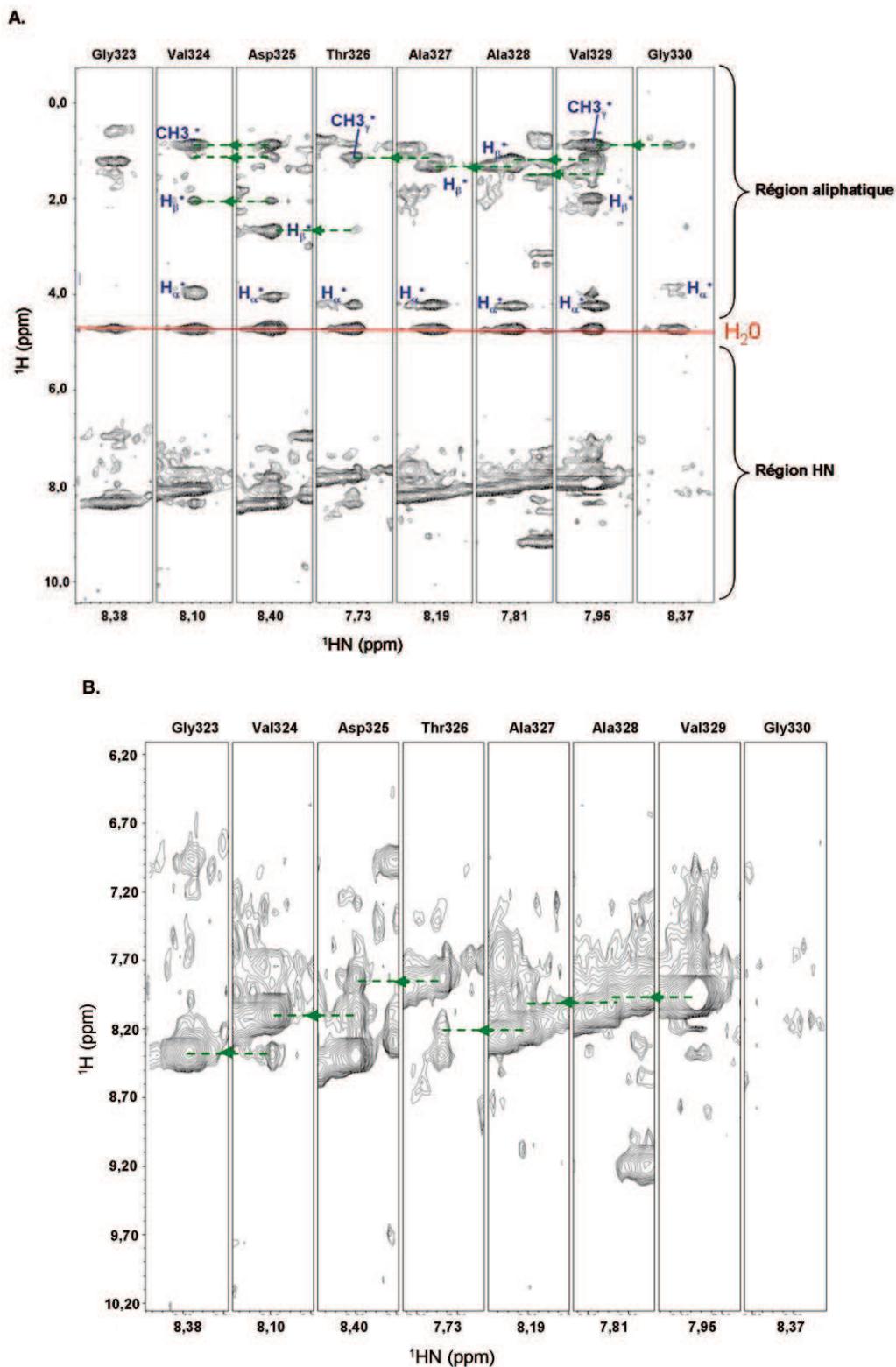


Figure 30 : Plans ^1H - ^{15}N du spectre ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC (temps de mélange = 120 ms) de la CK-MM marquée ^{15}N . **A)** Plans prenant en compte la région aliphatique et HN et **B)** Agrandissement sur la partie HN. Les flèches vertes présentent les corrélations nOes inter-résidus entre le H_N du résidu i et le proton d'un résidu $i-1$.

Pour pouvoir obtenir une attribution séquentielle à partir d'une expérience de type NOESY-HSQC, il est nécessaire d'identifier sans ambiguïté les nOes intra-résidus (corrélation entre le proton amide et les protons d'un même résidu) et les nOes inter-résidus (corrélation entre le proton amide et les protons d'un résidu proche dans l'espace). Du fait de l'importante mobilité de cette boucle, les valeurs de déplacement chimique ^1H observés sur la Figure 30 pour les différents résidus sont proches des déplacements chimiques moyens trouvés dans la littérature pour une structure "*random coil*" (122). En effet, dans la littérature nous trouvons que les H_α , H_β , et $\text{CH}_{3\gamma}$ d'une valine sont à 4,18 ppm, 2,13 ppm et 0,97ppm respectivement. Sur la Figure 30, nous observons que les H_α , H_β , et $\text{CH}_{3\gamma}$ du résidu Val324 sont à 4 ppm, 2,1 ppm, et 0,9 ppm respectivement. Nous pouvons effectuer le même raisonnement pour les différents résidus de la boucle et ainsi différencier les probables nOes intra-résidus des nOes inter-résidus.

Nous pouvons également noter une dégénérescence des H_α du fait de la nature répétitive des résidus Ala, Val et Gly, mais aussi parce que les valeurs de déplacement chimique de ce proton sont proches sur la Figure 30 (Tableau 7 page 62) et dans la littérature (respectivement : 4,35 ppm, 4,18ppm, et 3,97 ppm). Ainsi une attribution à partir des H_α est très compliquée car il est impossible de différencier les nOes inter des nOes intra-résidus.

Des corrélations nOes inter- résidus sont observées entre les $^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}_\text{N}$ des huit résidus de la boucle, ce qui permet d'établir l'attribution hypothétique de la boucle flexible. En effet, on peut noter sur la Figure 30B des corrélations entre le H^N du résidu Gly323 à 8,39 ppm et le H_N du résidu Val324. Le H_N Val324 à 8,10 ppm corrèle avec le H^N Asp325. Et ainsi de suite, de cette façon nous pouvons attribuer la région flexible jusqu'au résidu Gly330, le chemin de corrélation est annoté sur la Figure 30B. A l'aide des corrélations inter-résidus observées dans la partie aliphatique, nous avons confirmé cette attribution. A partir de la Figure 30A, on peut noter la présence de nOes inter-résidus entre le H^N Asp325 et les H_α , H_β et $\text{CH}_{3\gamma}$ du résidu précédant Val324. Le H_β l'Asp325 corrèle avec le H^N Thr326. De plus, nous observons une corrélation entre le $\text{CH}_{3\gamma}$ Thr326 avec le H^N Ala327, et ainsi de suite jusqu'au résidu Gly330 (chemin de corrélation indiqué sur la Figure 30A).

Nous observons également des corrélations nOes inter-résidus entre le H_N du résidu Gly323 et un ou plusieurs acides aminés n'appartenant pas à cette boucle. L'ensemble de ces observations permet de proposer une attribution de la boucle 320s, du résidu Gly323 à la

Gly330. Ce résultat est en accord avec l'attribution proposée par Anna Labernadie basée également sur des expériences NOESY-HSQC.

Afin de confirmer cette attribution, nous avons décidé d'enregistrer des expériences RMN 3D de type : HNCA, HNCO, HN(CO)CA, avec un échantillon de CK-MM marqué U- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. Du fait du poids moléculaire important de la CK-MM, nous observons sur les plans $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC de ces expériences une perte importante du rapport signal sur bruit par rapport à la Figure 26. On note que seuls les résidus ayant des R_2 faibles tels que ceux de la boucle 320s sont observés (Figure 31). Ainsi l'attribution de la CK-MM est restreinte sur ce segment mobile.

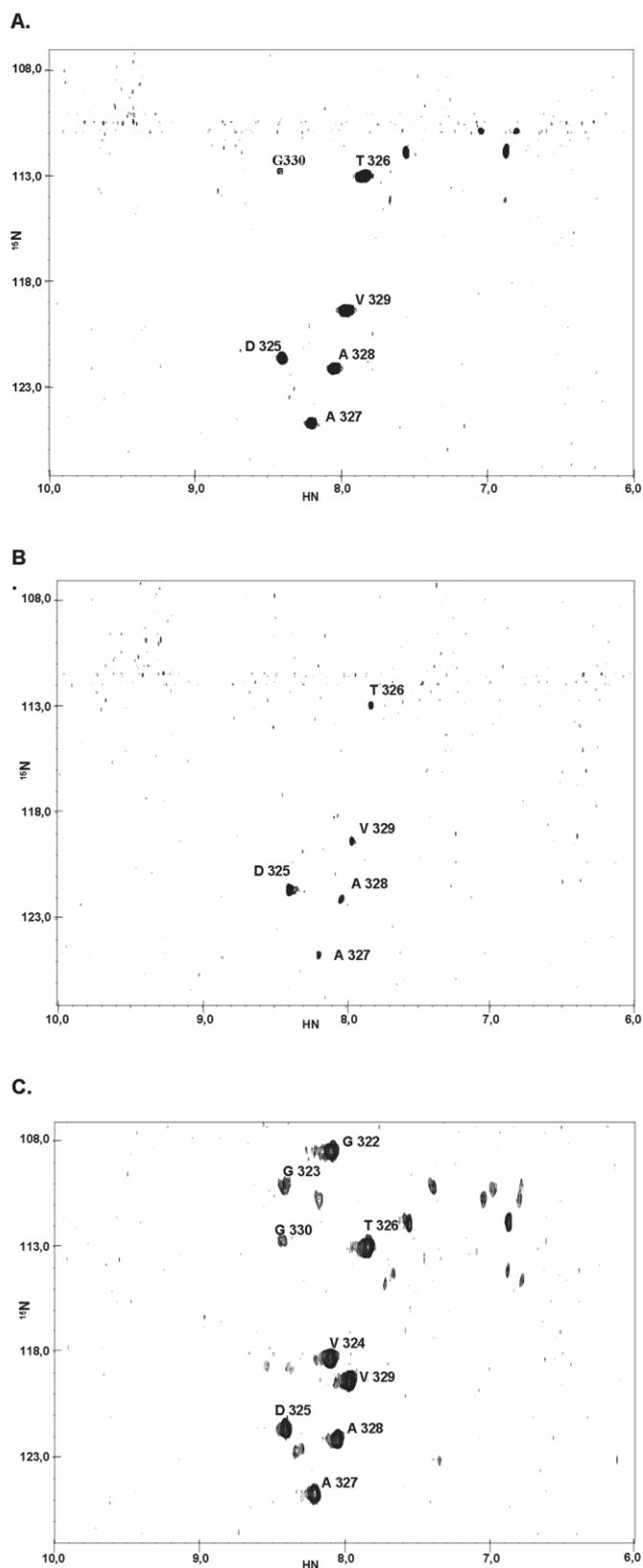


Figure 31 : Plan ^{15}N - ^1HN HSQC des expériences RMN 3D : **A)** $\text{HN}(\text{CO})\text{CA}$, **B)** HNCA , **C)** HNCO réalisées à 28°C sur un échantillon CK-MM marqué $\text{U}\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ à 1 mM dans un tampon 20 mM phosphate $\text{pH}=6,8$.

Les plans ^{13}C - $^1\text{H}\text{N}$ extraite des expériences HN(CO)CA et HNCA sont représentées sur la Figure 32. L'expérience de type HN(CO)CA permet d'observer la corrélation entre le groupement amide du résidu i avec le C_α du résidu $i-1$. Et avec l'expérience HNCA, on observe les corrélations entre le groupement amide du résidu i avec son C_α et avec le C_α du résidu $i-1$.

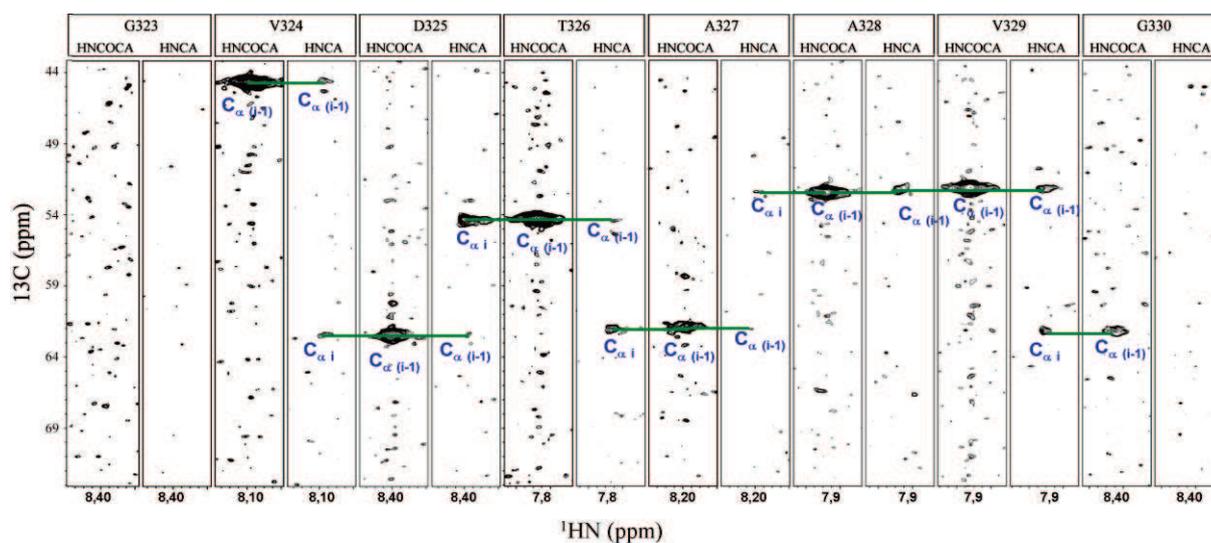


Figure 32 : Plans ^{13}C - $^1\text{H}\text{N}$ des spectres 3D HNCA et HN(CO)CA. Ces expériences d'attribution 3D sont réalisées sur un échantillon CK-MM marqué $\text{U-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ à 28°C . Les paramètres d'acquisition sont notés dans le tableau 5 page 49.

L'attribution débute par l'observation de la corrélation entre le HN du résidu i à 8,09 ppm (Val324) et le C_α à 44,7 ppm du résidu $i-1$ sur l'expérience HN(CO)CA. Cette valeur de déplacement chimique est caractéristique du C_α d'un résidu glycine (Gly323) (123). Pour le même résidu i , la bande ^{13}C - $^1\text{H}\text{N}$ de l'expérience HNCA présente deux taches de corrélations : une à 44,7 ppm qui correspond au C_α de Gly323 et une autre à 62,4 ppm qui correspond à son propre C_α (Val324). Sur le spectre HN(CO)CA, on peut noter la présence d'une corrélation entre le C_α du résidu Val324 et le HN à 8,4 ppm (D325). Sur la bande ^{13}C - $^1\text{H}\text{N}$ HNCA de ce résidu, on observe une corrélation à 62,4 ppm qui correspond au C_α du résidu précédant Val324 et une seconde à 54,3 ppm correspondant à son propre C_α . A partir de cette corrélation et comme décrit précédemment, il est possible d'attribuer les résidus de la boucle jusqu'au résidu Gly330.

On remarque que les bandes ^{13}C - $^1\text{H}\text{N}$ des expériences HNCA et HN(CO)CA ne présentent aucune corrélation pour les résidus Gly223 et Gly330 (seulement HNCA). Les HN de ces résidus ne sont pas visualisés sur les plans HSQC de ces expériences, sauf pour la Gly330 sur

l'expérience HN(CO)CA. Nous supposons que la perte d'information des résidus glycine est induite par une différence de relaxation des C_{α} . Les expériences de dynamique sur la boucle 320s indiquent que les résidus glycine localisés aux extrémités de la boucle sont moins dynamiques que ceux localisés au centre (Figure 39B-CK seul cf section III.2.2. page 71).

Le spectre HNCO de l'échantillon CK-MM marqué $U\text{-}^2\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-}^{13}\text{C}$, permet d'observer les corrélations entre le HN du résidu i avec le groupement CO du résidu $i-1$. La Figure 33 présente les plans $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{HN}$ des résidus de la boucle 320s.

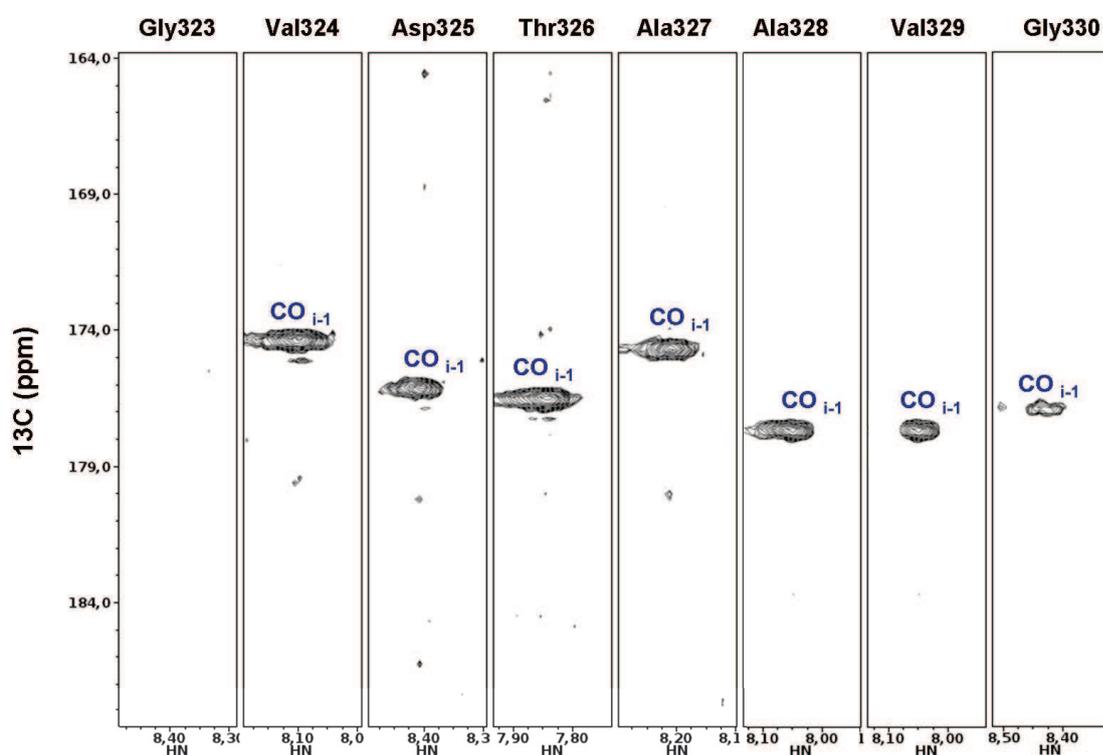


Figure 33 : Plans $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{HN}$ du spectre 3D HNCO enregistré sur échantillon CK-MM marqué $U\text{-}^2\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-}^{13}\text{C}$ à 28°C . Les paramètres d'acquisition sont notés dans le tableau 5 page 49.

On remarque que tous les HN des résidus de la boucle 320s corréleront avec le groupement CO du résidu précédent, sauf la Gly323. On observe par exemple que le HN du résidu Ala327 corréleront avec le CO de la Thr326 à 174,7 ppm.

A partir de l'ensemble des expériences d'attribution enregistrées, tels que HN(CO)CA, HNCO, NOESY-HSQC et HNCA nous avons pu confirmer l'attribution séquentielle de la boucle 320s : du résidu Gly323 à la Gly330.

Le Tableau 7 résume les déplacements chimiques des H, C α , et CO des résidus de la boucle 320s, obtenus par l'ensemble des expériences d'attribution : HN(CO)CA, HNCA, HNCO, et NOESY-HSQC.

	Expérience	Gly323	Val324	Asp325	Thr326	Ala327	Ala328	Val329	Gly330
NH	HSQC	8,4	8,1	8,4	7,8	8,2	7,9	7,9	8,4
HN	NOESY- HSQC	8,4	8,10	8,4	7,7	8,2	7,8	7,9	N.O.
H α		4,01*	4,00*	4,10*	4,20*	4,20*	4,30*	4,30*	3,91*
H β		-	2,12*	2,71*	4,20*	1,32*	1,20*	2,10*	-
CH $_{3\gamma}$		-	0,90*	-	1,21*	-	-	0,90*	-
C α	HN(CO)CA et HNCA	44,7	62,4	54,3	62,1	52,2	52,4	62,2	N.O.
CO	HNCO	174,4	176,1	176,6	174,7	177,7	177,7	177,0	174,4

Tableau 7: Tableau récapitulatif des déplacements chimiques en ppm (δ) des H, C α , et CO des résidus de la boucle 320s, obtenus par l'ensemble des expériences d'attribution RMN. Les astérisques mettent en évidence que les δ sont hypothétiques car basés sur des tables de déplacement chimique moyen déterminés pour les 20 acides aminés dans une structure "random coil". Le sigle N.O. signifie non observé.

L'attribution de la boucle 320s (Gly323 - Gly330) sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM marquée $\text{U-}^2\text{H}/^{15}\text{N}$ est représentée sur la Figure 34.

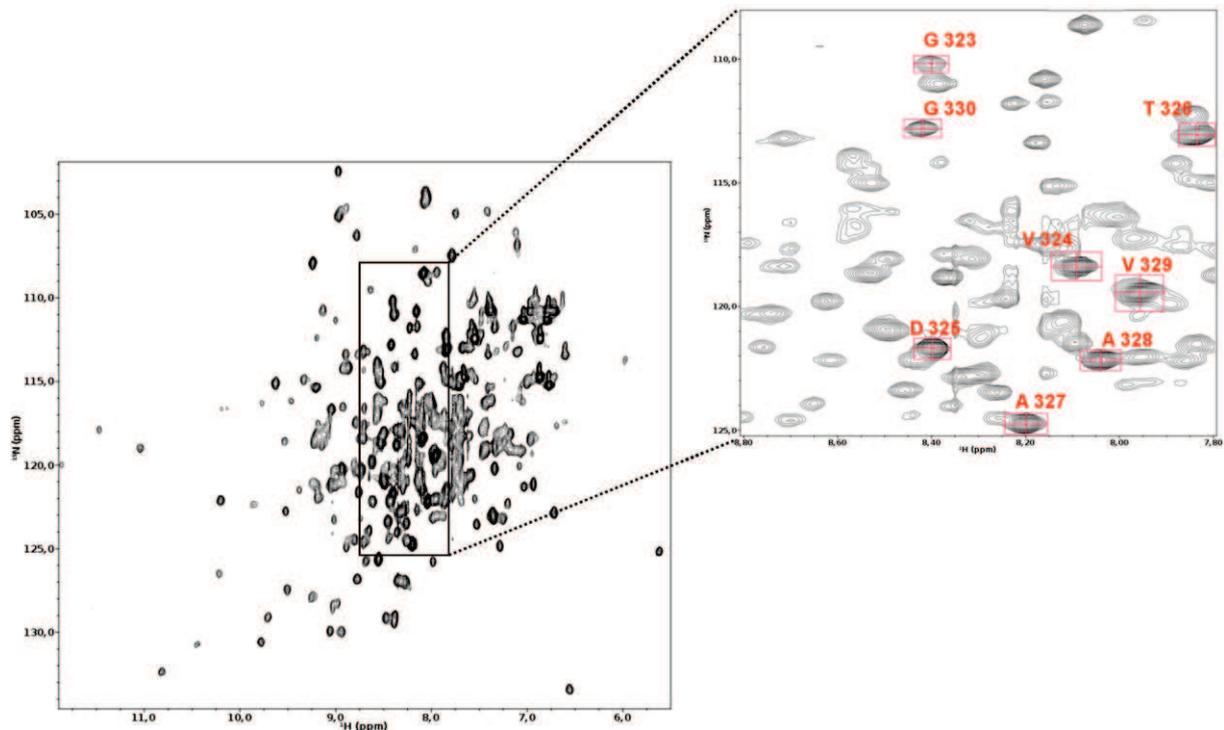


Figure 34 : Spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM marquée $\text{U-}^2\text{H}$, ^{15}N , 1 mM, 20 mM phosphate, $\text{pH}=6,8$, 28°C . L'attribution de la boucle 320s est indiquée dans l'agrandissement.

Dans la littérature, seule l'arginine kinase (AK), une enzyme de la famille des guanidino-kinases et homologue de la CK, a été totalement attribuée en RMN. Il s'agit d'une enzyme monomérique de 381 acides aminés et non un homodimère comme la CK-MM. Son attribution a pu être réalisée à partir d'un échantillon perdeutééré, en utilisant des expériences TROSY 3D triple résonance à 800 MHz (124).

III.2. Etude dynamique de la boucle 320s en présence de MgADP, nitrate et créatine.

III.2.1. Perturbation des déplacements chimiques de la boucle 320s de la CK-MM lors de l'ajout des constituants du complexe de l'état analogue de transition.

Dans le but de caractériser l'interaction entre la CK-MM et les constituants du complexe de l'état analogue de transition (TSAC), nous avons enregistré des expériences de type ^1H - ^{15}N HSQC lors de l'ajout de MgADP et de Cr- NO_3^- dans un échantillon de CK-MM. Les concentrations finales en CK-MM et en substrat sont répertoriées dans le Tableau 8 pour chaque expérience.

	[CK-MM]	[Mg^{2+}]	[ADP]	[NO_3^-]	[créatine]
Expérience de type HSQC					
CK seule	800 μM	-	-	-	-
CK -MgADP	792 μM	10 mM	2 mM	-	-
CK - Cr-MgADP- NO_3^-	784 μM	10 mM	2 mM	25 mM	30 mM

Tableau 8 : Récapitulatif des concentrations finales en CK-MM, Mg^{2+} , ADP, NO_3^- , et la créatine pour les trois expériences de type HSQC.

Les expériences HSQC enregistrées sur la CK-MM en présence de MgADP ou de Cr-MgADP- NO_3^- sont réalisées à des concentrations saturantes des différents substrats, de façon à permettre leur fixation optimale sur les deux monomères de l'enzyme (89). Ainsi en présence de Cr-MgADP- NO_3^- , l'enzyme est complètement sous la forme du complexe analogue de l'état de transition : TSAC. La constante d'affinité de ce complexe a été estimée à $K_d = 0,4 \text{ nM}^3$ (40).

Sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM libre, présenté par la Figure 35A, on peut noter que les HN des huit résidus attribués de la boucle 320s sont isolés et présentent une forte intensité.

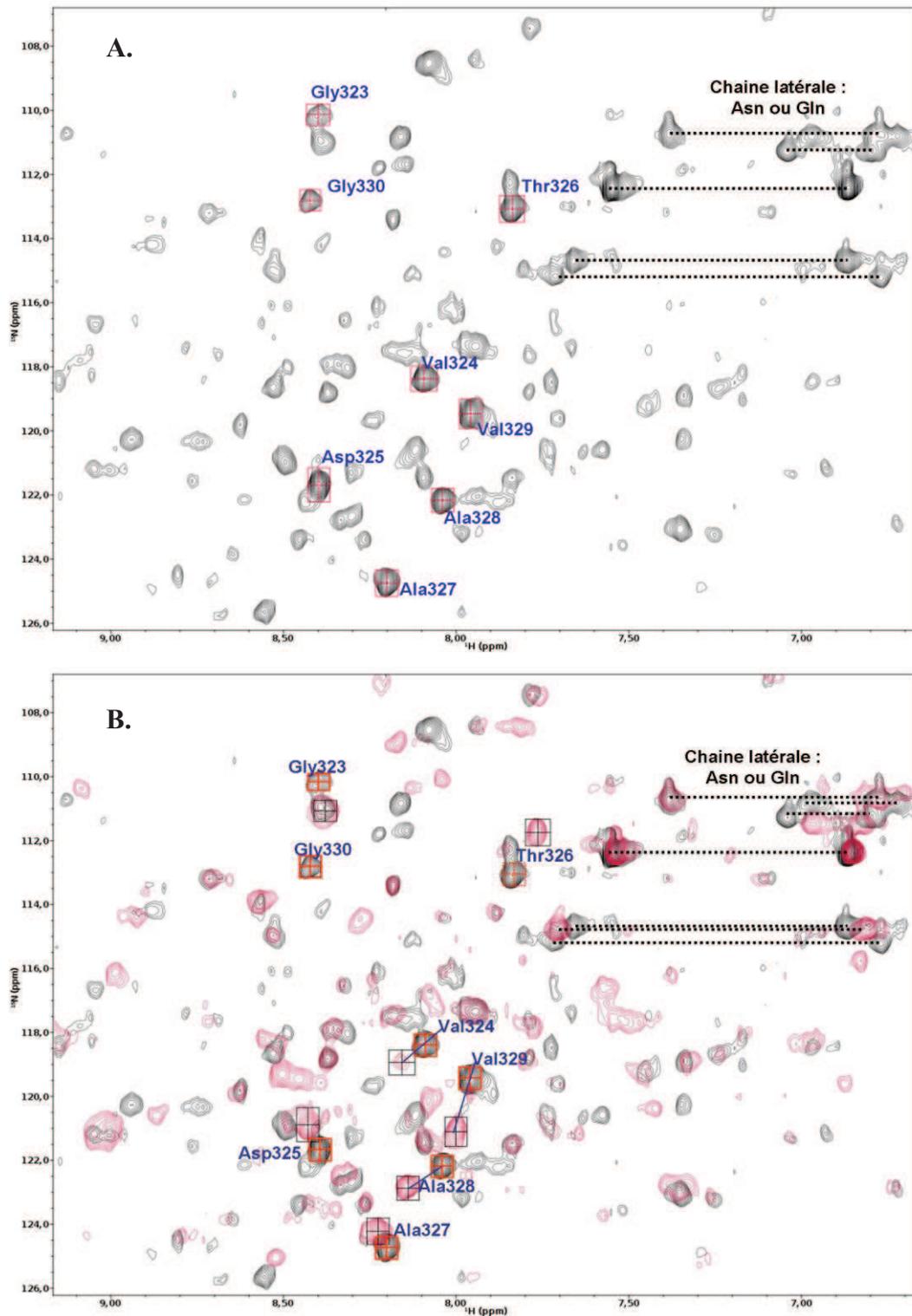


Figure 35 : Expériences de perturbation de déplacement chimique réalisées à 28°C. **A)** Partie du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM libre (noir). **B)** Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM libre (noir) et de la CK-MM en interaction avec MgADP (en rouge). L'attribution de la boucle 320s est indiquée en rouge pour la CK libre et en noir lorsqu'elle est complexée à MgADP. La concentration des différents ligands sont $[\text{Mg}^{2+}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{ADP}] = 2 \text{ mM}$. Expériences réalisées à partir d'un échantillon CK-MM, 800 μM , 20 mM phosphate, pH=6,8. Les NH_2 des fonctions amides des chaînes latérales des Asn et Gln sont représentés avec un trait pointillé.

La superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM libre et de la CK-MM complexée à MgADP est présentée par la Figure 35B. A partir de cette figure, nous observons que l'ajout de MgADP induit des perturbations de déplacement chimique ($\Delta\delta$) des résidus non attribués (dont ceux des chaînes latérales Asn et Gln), et ceux de la boucle 320s. Nous observons également la disparition de certaines résonances HN, dont celle du résidu Gly330.

Les variations de déplacement chimique ($\Delta\delta$) sont calculées sur 60 résidus non attribués isolés et les huit résidus attribués de la boucle 320s. L'attribution de ces résonances après l'ajout de MgADP est simple, car ces résidus sont isolés et donc repérables et les $\Delta\delta$ des résidus non attribués ne permettent pas d'ambiguïté. L'attribution de la boucle 320s repose également sur l'hypothèse que les intensités des résonances HN des résidus sont toujours plus importantes que le reste de la protéine. Il existe cependant une incertitude sur l'attribution de la Val324. Afin de confirmer cette attribution, nous aurions pu réaliser une titration de la CK-MM par MgADP, ou enregistrer des expériences de type HNCA ou HNCOCA sur l'échantillon de CK-MM complexée avec MgADP, mais par manque de temps nous n'avons pu enregistrer aucune de ces expériences.

La Figure 36 représente les variations de déplacement chimique pour les 60 résidus et les résidus de la boucle. Nous pouvons noter que les résidus de la boucle 320s sont plus perturbés que les 60 résidus non attribués sélectionnés, avec une moyenne de $\Delta\delta = 0,19$ ppm et de 0,048 ppm respectivement. Nous observons également que 26 des résidus non attribués de la sélection ont un $\Delta\delta > 0,048$ ppm. Cela suggère que ces résidus sont perturbés par l'ajout de MgADP, ils peuvent être localisés soit dans le site actif, soit impliqués dans le positionnement de la boucle 320s, comme par exemple l'extrémité N-terminale. Ces résultats indiquent qu'en présence de MgADP les résidus de la boucle 320s perçoivent une modification de leur environnement chimique induite par une interaction avec le substrat.

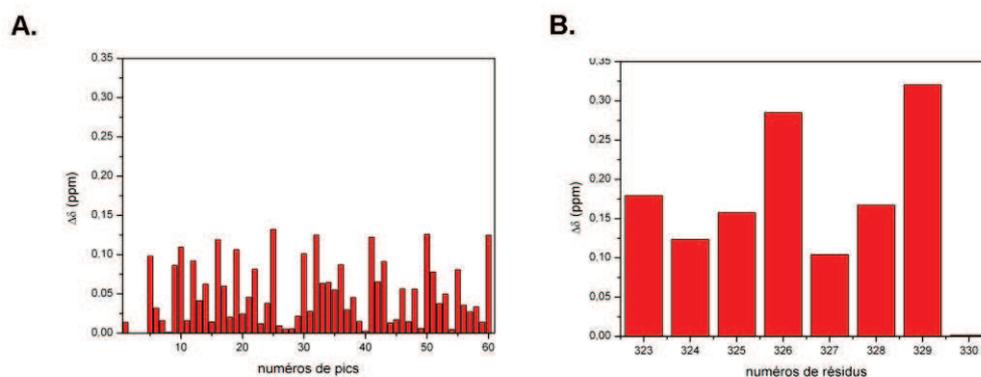


Figure 36: Profils des perturbations de déplacement chimique pour la CK-MM libre et en complexe avec MgADP: **A)** pour une sélection de 60 pics résolus et **B)** pour les résidus de la boucle 320s. Les concentrations des différents ligands sont $[Mg^{2+}] = 10 \text{ mM}$ et $[ADP] = 2 \text{ mM}$ et $[CK] = 800 \mu\text{M}$.

Nos résultats sont confirmés par la structure cristallographique de la CK-MM en présence des substrats : Cr-MgADP-NO₃⁻ (code PDB : 1U6R). La Figure 37 représente les interactions de la CK-MM avec MgADP observées dans le cristal (code PDB : 1U6R). Ces interactions illustrent le contact entre la boucle 320s avec l'ADP par l'intermédiaire de : Gly322, Arg319 et Gly323 (44).

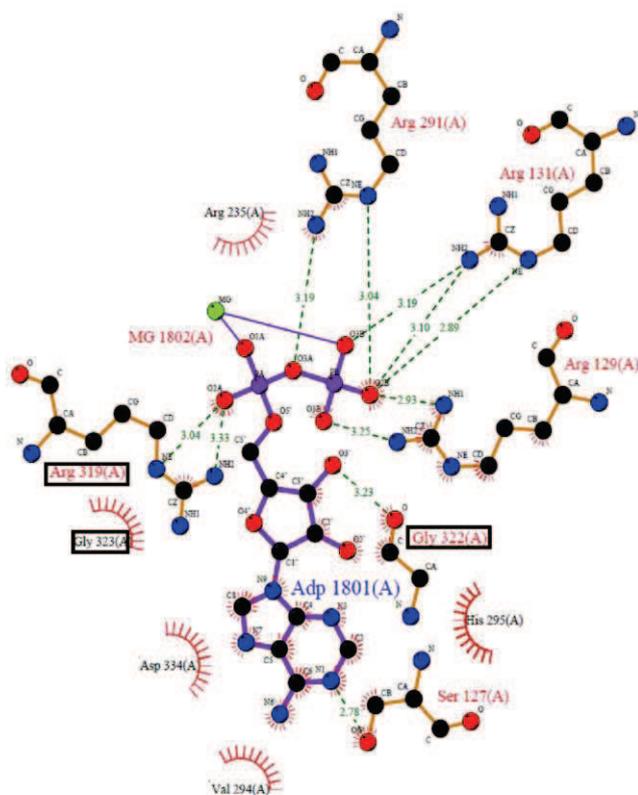


Figure 37 : Représentation avec le logiciel Ligplot des interactions hydrophobes (rouge) et des liaisons hydrogènes entre MgADP et les résidus de la poche d'interaction. Les résidus encadrés en noir sont les résidus de la boucle 320s.

En solution, les expériences de diffraction à Rayons X aux petits angles sur la CK-MM complexée à MgADP ont mis en évidence une diminution du rayon de gyration de la protéine. En effet, Forstner *et al.* observent un rayon de giration de 21,5 Å pour la CK-MM libre et une valeur de 19,7 Å pour le complexe CK-MM/MgADP. Ceci indique que la protéine subit des modifications structurales lors de la fixation de MgADP (125).

Sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM complexée à Cr-MgADP- NO_3^- , présenté en Figure 38, nous observons une perte significative du rapport signal sur bruit. Dans un premier temps, nous avons supposé que cette perte de sensibilité était induite par la dénaturation de la protéine, car nous observions un précipité au fond du tube RMN. Après analyse du spectre, nous avons noté que l'intensité des résonances ^1H - ^{15}N des NH_2 des chaînes latérales des résidus Asn et Gln, sorte de "témoins internes" du spectre, sont du même ordre de grandeur entre les expériences HSQC. De plus l'activité enzymatique de cet échantillon met en évidence que la CK-MM est active (avec une perte d'activité estimée à 10 %). L'ensemble de ces informations suggère que la perte du rapport signal sur bruit n'est pas due à la précipitation de la protéine mais à une modification de la dynamique de certains résidus comme la boucle 320s. En effet, on peut supposer que certaines raies coalescent du fait de l'apparition d'un régime d'échange intermédiaire ($k_{\text{ex}} \sim \Delta\omega$).

Dans ces conditions, il est hélas impossible de suivre les variations de déplacement chimique de la boucle 320s car l'attribution des résonances après formation du TSAC ne peut plus être réalisée. A contrario, nous pouvons observer sur la Figure 38A, une variation de déplacement chimique des résonances HN des chaînes latérales Asn et Gln. En effet, d'après l'étude d'accessibilité au solvant réalisée sur la CK-MM homo-dimérique, 18 résidus Asn et Gln sont accessibles au solvant. Parmi ces résidus, Asn4, Asn12, et Asn26 sont localisés à l'extrémité N-terminale d'un monomère. Or cette région est connue dans la littérature pour subir des réarrangements structuraux importants après la fixation des substrats (44).

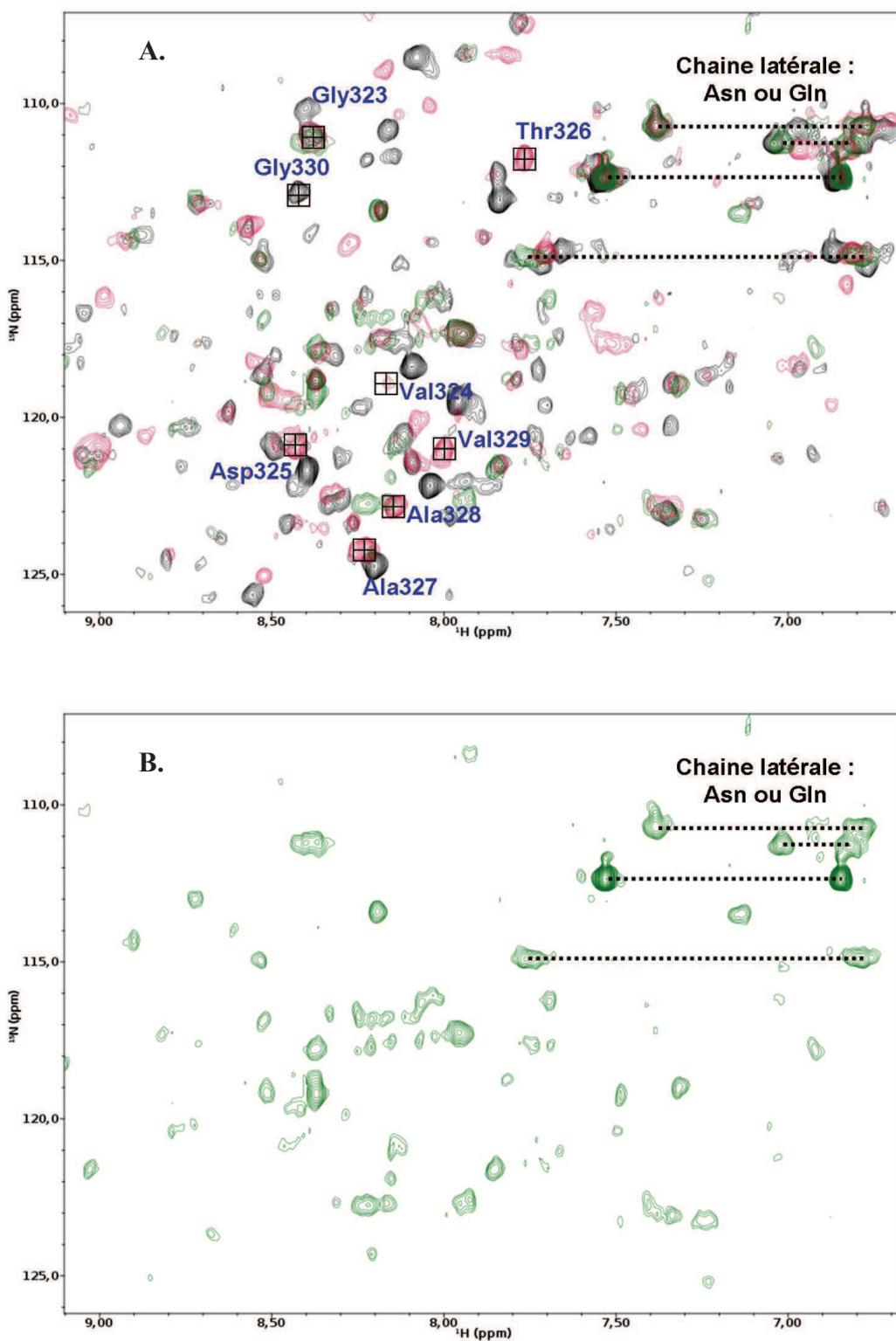


Figure 38 : Expériences de perturbation de déplacement chimique réalisées à 28°C. **A)** Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de la CK-MM libre (noir), de la CK-MM en interaction avec MgADP (en rouge) et de la CK-MM en interaction avec Cr-MgADP- NO_3^- (en vert). L'attribution de la boucle 320s est celle en présence de MgADP (rouge). **B)** Spectre HSQC du complexe TSAC. La concentration des différents ligands sont $[\text{Mg}^{2+}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{ADP}] = 2 \text{ mM}$, $[\text{créatine}] = 30 \text{ mM}$ et $[\text{NO}_3^-] = 25 \text{ mM}$. Expériences réalisées à partir d'un échantillon CK-MM, 800 μM , 20 mM phosphate, pH=6,8.

Les résultats obtenus sur la CK-MM seule, complexée à MgADP ou sous forme de TSAC concordent avec les résultats préliminaires d'Anna Labernadie, obtenus au Laboratoire en 2008, sur l'étude des modifications structurales de la CK-MM lors de l'ajout des composants du complexe d'état analogue de transition.

III.2.2. Mesure des vitesses de relaxations R_1 et R_2 de la boucle 320s lors de l'ajout des constituants du TSAC.

Pour avoir une perception plus précise de la dynamique de la boucle 320s, nous avons enregistré des expériences de relaxation R_1 , R_2 sur un échantillon de CK-MM marqué $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ en absence de ligands et en complexe avec MgADP et Cr-MgADP- NO_3^- . La mesure des vitesses de relaxation des résidus de la CK-MM en présence de MgADP, est basée sur l'attribution hypothétique de la boucle 320s déterminée dans la section III.2.1.

Ces expériences permettent d'évaluer des paramètres sensibles à des dynamiques de l'ordre de la ps –ns. La Figure 39 représente les profils de relaxation R_1 et R_2 pour la CK-MM libre et la CK-MM en complexe avec MgADP. Les résidus possédant des valeurs et des erreurs de R_1 et R_2 aberrantes sont éliminées de notre analyse, c'est le cas de la valeur de R_2 de la Val329 (Figure 39CD-en présence de MgADP). Nous pouvons également noter que le résidu Gly330 n'est pas analysé lorsque la CK-MM est complexée à MgADP, car en présence de ce substrat la résonance HN de ce résidu disparaît dans le bruit. Sur la Figure 39, les valeurs des vitesses de relaxation R_1 et R_2 de la boucle 320s sont indiquées en rouge, alors que celles des résidus non attribués de la protéine sont en gris.

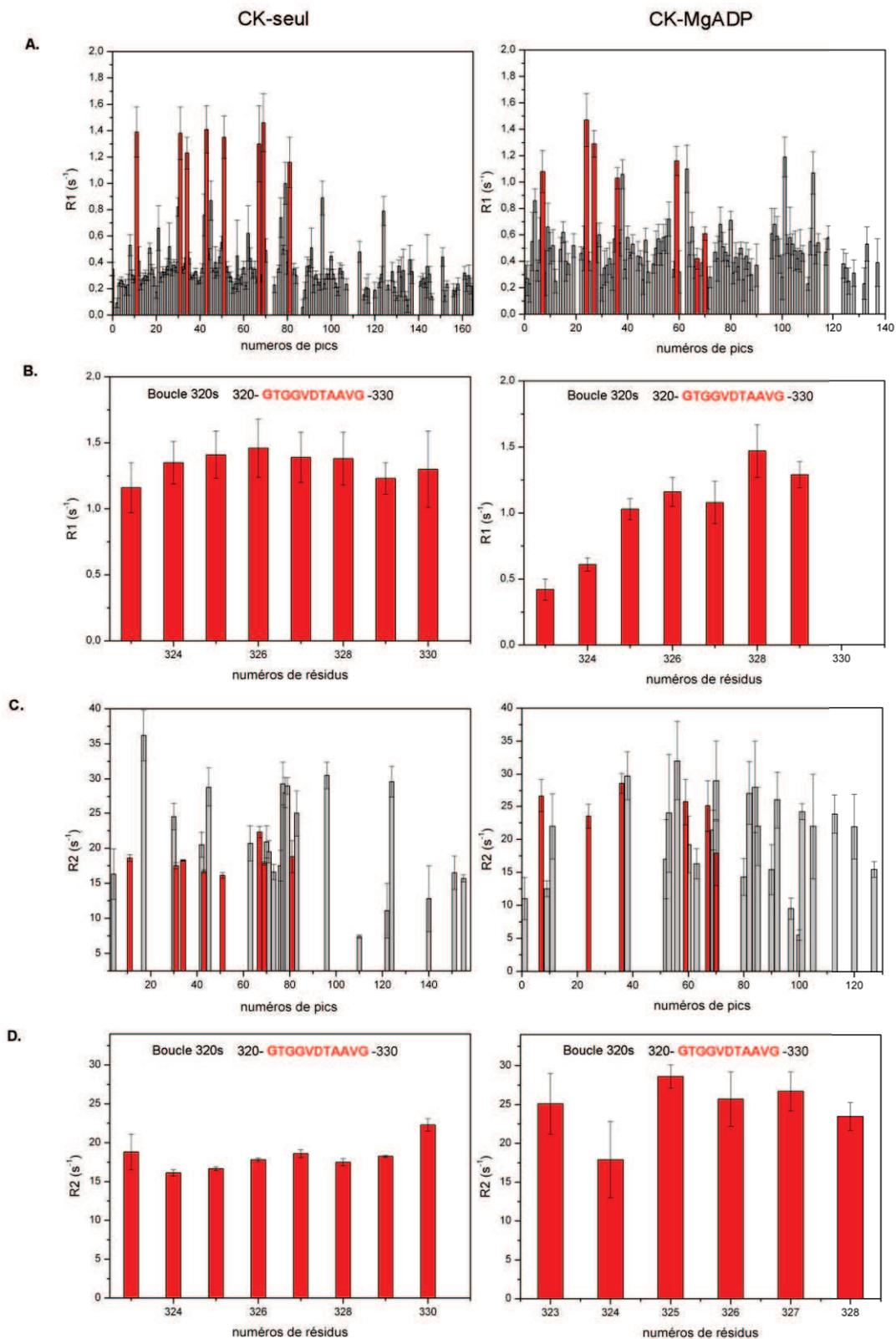


Figure 39: Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 pour la CK seule et pour le complexe CK-MgADP. **A)** Vitesses R_1 et **C)** R_2 sur l'ensemble des pics résolus à l'exception des chaînes latérales sur le spectre $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC (en gris = résidus non attribués de la CK et en rouge = résidus attribués de la boucle 320s). **B)** Vitesses R_1 et **D)** R_2 uniquement pour les résidus attribués de la boucle.

Dans le cas de la CK-MM libre, nous pouvons noter que les valeurs de R_1 de la boucle 320s sont plus élevées que le reste de la protéine. En effet, les valeurs moyennes de R_1 pour les résidus de la boucle et les résidus non attribués (ne comprenant pas les chaînes latérales : Asn et Gln) sont respectivement de $1,33 \pm 0,20 \text{ s}^{-1}$ et $0,34 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$. De manière similaire, nous observons également une diminution des valeurs moyennes de R_2 de la boucle 320s ($R_2 = 18,3 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$) par rapport aux valeurs du reste de la protéine ($R_2 = 21,7 \pm 2,3 \text{ s}^{-1}$). Cette différence de vitesse de relaxation indique clairement une dynamique importante (flexible) de la boucle 320s par rapport au reste de la protéine. Nous observons également que certains résidus non attribués de la protéine ont une dynamique rapide ; ils appartiennent probablement à l'extrémité C-terminale de l'enzyme (l'extrémité N-terminale est impliquée dans la dimérisation de la CK-MM).

En présence du ligand MgADP, la différence entre les valeurs de R_1 et R_2 des résidus de la boucle et ceux de la protéine diminuent. En effet, nous avons mesuré une valeur moyenne de $R_1 = 1,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ pour les résidus de la boucle et une valeur moyenne de $R_1 = 0,47 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$ pour les autres résidus observés (boucle 320s et des chaînes latérales exclues). Nous avons ensuite mesuré une valeur moyenne de $R_2 = 24,6 \pm 3,0 \text{ s}^{-1}$ pour la boucle et une valeur moyenne de $R_2 = 20,4 \pm 4,1 \text{ s}^{-1}$ pour le reste de la protéine. Ces résultats suggèrent que la boucle 320s est moins flexible en présence de MgADP, mais elle reste tout de même plus dynamique que le reste de la protéine. Ce résultat est confirmé par les structures cristallographiques de la CK-MM en absence et en présence de Cr-MgADP-NO₃⁻ (respectivement code PDB : 2CRK et 1U6R) (43, 44). En effet, il est observé que la boucle 320s en absence de substrat n'est pas modélisée, ce qui témoigne d'une flexibilité importante tandis qu'elle est structurée et observée en présence de MgADP.

Du fait d'un élargissement important des résonances il est impossible d'attribuer formellement les résidus de la boucle 320s pour le complexe TSAC, mais nous avons calculé les valeurs moyennes de R_1 et R_2 pour les résidus non attribués de la CK-MM ($R_1 = 0,45 \pm 0,14 \text{ s}^{-1}$ et $R_2 = 17,3 \pm 3,2 \text{ s}^{-1}$). On peut estimer que les résidus de la boucle 320s ne sont plus distinguables du reste de la protéine car leurs vitesses de relaxation sont du même ordre de grandeur.

La comparaison entre les valeurs de R_1 recalculées théoriquement avec le logiciel HYDRONMR sur la structure cristallographique de la CK-MM (code PDB : 1U6R) ($R_1 =$

($0,31 \pm 0,02$) s^{-1}) (30) et ceux mesurées expérimentalement ici indique que la CK-MM libre ou en complexe, dans ces conditions de concentration, est bien un dimère (pas d'auto-association de dimère).

Les valeurs de R_1 et R_2 pour la boucle 320s et pour les résidus non attribués de la CK-MM sont répertoriées dans le Tableau 9.

		R_1 (s^{-1})	R_2 (s^{-1})
CK	CK sans la boucle et chaîne latérale	$0,34 \pm 0,06$	$21,7 \pm 2,3$
	Boucle 320s	$1,33 \pm 0,19$	$18,3 \pm 0,6$
CK-MgADP	CK sans la boucle et chaîne latérale	$0,47 \pm 0,11$	$20,4 \pm 4,1$
	Boucle 320s	$1,0 \pm 0,1$	$24,6 \pm 3,1$
CK-TSAC	CK sans la boucle et chaîne latérale	$0,45 \pm 0,14$	$17,3 \pm 3,2$
	Boucle 320s	x	x

Tableau 9: Résumé des valeurs moyennes des vitesses de relaxation R_1 et R_2 pour la CK-MM libre, les complexes CK-MgADP et CK-TSAC en prenant en compte tous les résidus de la CK, ou les résidus de la boucle 320s.

Nos résultats de perturbation de déplacement chimique et de relaxation suggèrent que cette différence de dynamique en présence des substrats est due à la stabilisation de la boucle 320s, pour les deux monomères, *via* des interactions avec les substrats. En effet, la structure cristallographique de la rm-CK (44) met en évidence que la fixation de Cr-MgADP-NO₃⁻ dans une des sous-unités de l'homodimère induit des modifications structurales importantes telles que la fermeture du site actif par le rapprochement des boucles 320s et 60s. L'interaction ionique entre les résidus Asp325 de la boucle 320s et His66 de la boucle 60s provoque l'alignement correct des substrats dans le site actif et stabilise la boucle 320s (Figure 10 page 21).

Afin de discuter nos résultats obtenus sur la CK, nous les avons comparé à ceux décrits dans la littérature pour deux autres phosphagènes kinases : l'arginine kinase (AK) et la lombricine kinase (LK). En effet, ces deux protéines sont des homologues de la CK avec plus de 40% d'identité de séquence et une origine évolutive commune (Figure 40).

```

MPFGNTHNKFKLNYKPEEEYDLSKHNHMAKVLTELELYKLRDKETPSGFTVDDVIQTGVDNPGHPFIM 70 CK-MM
MPKFETARQNFP-DYKS-----NGHKCMVGRHLTEDMYERLYELRTPNGVSIKCIQPSVDNTGR---- 58 LK
MVDQATLDKLEAGFKK---LQEASDCKSLKHLTKDVFDSIKNKKTGMGATLLDVIQSGVENLDS---- 63 AK
* : ::: .:* . : : : ** ::. : : .* * :. . **..*:* .

TVGCVAGDEESYEVFKELFDPIISDRHGGYKPTDKHKT-DLNHENLKGDDLDPNYVLSRVRTGRSIKG 139 CK-MM
IIGLVAGDPESYEVFKELFDAVINEKHGGFGPTDKHPPDLNANALVGG-QFDPKYVKSARIRTGRSVKG 127 LK
GVGIYAPDAESYRTFGPLFDPIIDDYHGGFKLTDKHPPKEWGDINTLVLDLDPGGQFIISTRVRCGRSLQG 133 AK
:* * * **..* **..*:*: ***: **** . : . . : : : *:*:* **:*:*

YTLPPHCSRGERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYYPKSMTEKEQQQLIDDHFLFDKPVSPILLASGMAR 209 CK-MM
FCLPPSISRAERREVERIIVDALAGLEGDLAGVYYPKMKMTPQEQLIADHFLFQKPTGHLMVNSGAVR 197 LK
YFPNPLTAEQYKEMEEKVSSTLSMEDELKGTYYPLTGMASKATQQQLIDDHFLFKE-GDRFLQTANACR 202 AK
: * : : : :*. .:* .: .: : * ****. * : : :*** *****. : . : : . *

DWPDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVISMEKGGNMKEVFRFCVGLQKIEEIFKKAGHPFMWNQHLGY 279 CK-MM
DWPDARGIWHNKDKTFLIWIWNEEDQVRIIAMQHGGDVKAVFERFSRGLTQIEGLMKKHGHEFAWSERLGY 267 LK
YWPTGRGIFHNDAKTFLVWVNEEDHLRIISMQKGGDLKTVYKRLVTAVDNIESKLP-----FSHDDRFGF 267 AK
** .***.*. *:*:*:***:*:*:*:*:*:* *:*:* . : : ** : * . : : : *

VLTCPSNLGTGLRGGVHVLAHLKSKHPK-FEEILTRLRLQKRGTGGVDTAAVGSVFDVSNADRLGSSEVE 348 CK-MM
ICTCPSNLGTGLRASVHLQLHKLKSKHPK-FEEIILAFHLQKRGTGGEHTEAVDDVYDISNRARLKKSERE 336 LK
LTFCTNLGTTMRASVHILPKLAKDRKVLEDIAASKFNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRLGLTEYQ 337 AK
: **:*:* * * :*: * :*: * :*: * :** * * * . * : .*:*: * * : * :

QVQLVVDGVKLMVEMEKKLEKQSIDDMIPAQK-- 381 CK-MM
FVQLLIDGVGKLIYEKLEAGKSIDDVLPASLKG 371 LK
AVREMQDGIEMIKMEKAAA----- 357 AK
* : : ** : : : **

```

Figure 40 : Alignement multiple des séquences de la créatine kinase musculaire humaine (Entrée uniprot P06732), de l'arginine kinase de *Limulus polyphemus* (P511541), et de la lombricine kinase (O15991). * signifie conservé, : signifie similaire.

Ces enzymes catalysent le transfert réversible d'un groupement phosphate entre l'ATP et un groupement guanidilique (respectivement l'arginine, la créatine et la lombricine). Ces enzymes possèdent une topologie structurale identique : un domaine N-terminal (NTD) organisé en hélice α connectée par une boucle flexible à un large domaine C-terminal (CTD) et une structure quaternaire différente. En effet, l'AK est typiquement fonctionnelle sous la forme d'un monomère alors que la LK et la CK sont actives sous forme dimérique.

Il existe de nombreuses structures cristallographiques de ces protéines en présence ou en absence de substrats (Tableau 10).

Code PDB	Protéine	Résolution (en Å)	Substrat	Référence
1M15	AK monomère	1,20	TSAC	Yousef, 2002 (126)
3M10		1,70	NON	Niu, 2010 (127)
1M80		2,4	NON	Yousef, 2003 (128)
3JPZ	LK	1,95	NON	Bush, 2011 (129)
3JQ3		2,5	ADP	Bush, 2011 (129)
1U6R	CK	1,65	TSAC	Ohren, 2007 (44)

Tableau 10 : Récapitulatif des structures cristallographiques résolues pour l'arginine kinase, la lombricine kinase et la créatine kinase. Pour l'arginine kinase, les substrats sont MgADP, nitrate et arginine. Pour la créatine kinase, il s'agit de MgADP, nitrate et créatine.

Dans l'ensemble de ces structures, on observe la présence de deux boucles impliquées dans la catalyse enzymatique. La première est localisée dans le NTD (58-63 pour AK ; 53-58 pour la LK et 60-70 pour la CK) et facilite la fixation du substrat guanidilique. La seconde boucle est localisée dans le CTD (311-319 pour LK ; 309-317 pour AK, et 320-330 pour la CK), et permet l'alignement correct du composé guanidilique avec le nucléotide (43, 81). Cette boucle est résolue par cristallographie uniquement pour la forme libre de la LK et pour les 3 enzymes en présence de substrat. Pour les autres structures, cette région présente une densité électronique faible et n'est donc pas visualisée sur la structure cristallographique. Cette différence de dynamique de la boucle 320s observée pour la LK peut être expliquée par la présence de deux acides aspartiques Asp11 et Asp12 au lieu d'un résidu glycine en position 11 (conservé chez AK et CK - Figure 41) (129).

```

          1           10
320s-CK GTGGVDTAAVGS
310s-LK GTGGEHTAAVDD
310s-AK GTRGEHTESEGG
          ** * . * : ..

```

Figure 41 : Alignement multiple de séquences de la boucle 320s de la CK-MM et de ses homologues la LK et l'AK. La numérotation de 1 à 10 permet de prendre en compte uniquement l'alignement de séquence. Les boucles de la CK-MM, AK et LK sont homologues avec 33% d'identité de séquence.

Davulcu *et al.* (88) ont étudié la dynamique de l'AK libre par RMN. Ils observent une dynamique rapide de la boucle 310s et obtiennent des valeurs moyennes de $R_1 = 0,85 \text{ s}^{-1}$ pour cette boucle et de $R_1 = 0,55 \text{ s}^{-1}$ pour le reste de la protéine. Tout comme la CK-MM, nous avons observé une nette différence entre les valeurs moyennes de la boucle 320s ($R_1 = 1,37 \pm$

0,19 s⁻¹) et celles du reste de la protéine ($R_1 = 0,34 \pm 0,06$ s⁻¹). On peut noter que la valeur moyenne des R_1 de la CK est plus faible que pour l'AK. En effet, la différence est due au fait que la CK est un dimère et l'AK est un monomère (les vitesses dépendent du τ_c et donc de leur masse moléculaire (93)).

Aucune expérience de relaxation R_1 et R_2 n'a été publiée à notre connaissance sur l'AK en interaction avec MgADP ou Cr-MgADP-NO₃⁻. Par contre, des expériences RMN de mesures de couplages dipolaires résiduels (RDC) couplées aux informations obtenues par les structures cristallographiques de l'AK libre et en interaction avec Cr-MgADP-NO₃⁻, ont mis en évidence le mouvement de cinq domaines rigides (Figure 42). Les blocs 1, 2, 4 et 5 possèdent un mouvement de rotation alors que le bloc 3 suit un large mouvement de translation (127). Cette étude indique également un équilibre rapide en solution entre une conformation ouverte (sans substrat : 3M10) et une conformation fermée (TSAC : 1M15). La forme ouverte est majoritaire dans cet équilibre (127). Il existe plusieurs intermédiaires conformationnels dus au déplacement des cinq blocs quasi-rigides.

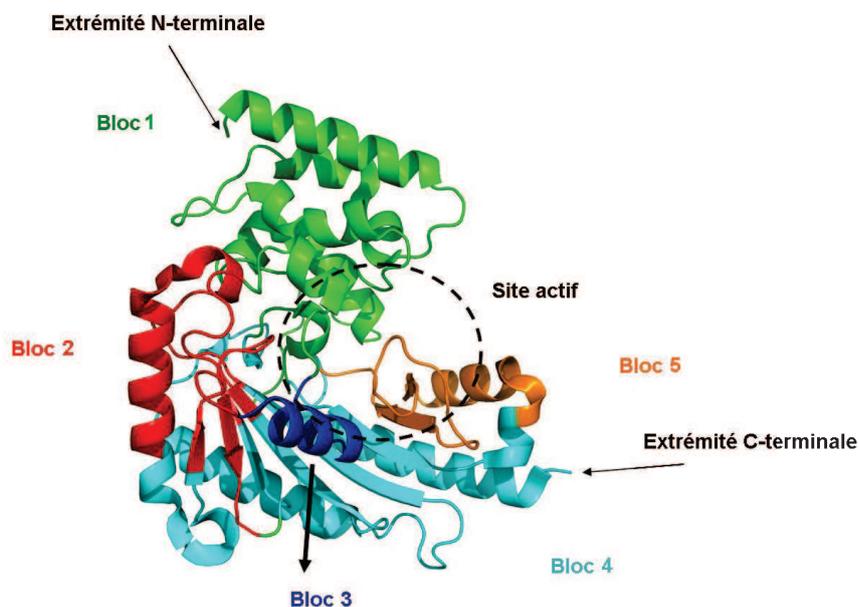


Figure 42 : Représentation des cinq blocs dynamiques de l'arginine kinase (code PDB : 1M15) (88).

Les expériences de dispersion de relaxation sur l'AK sans substrat ont permis d'identifier 35 résidus impliqués dans la dynamique et le changement conformationnel des cinq blocs rigides en solution (Tableau 11) (88, 130). Ces expériences permettent de mettre en évidence les résidus avec une dynamique de l'ordre de la micro à la milliseconde (130).

Régions charnières	Localisation
D88, H90, G92	Interface NTD
D71, F136-N137, F270-C271, N274, G276, G332	entre NTD et CTD
R126-C127, R129, L131, et V220-Q234	centre CTD dans le feuillet β
I182-G209	boucle L8 interaction avec les substrats.

Tableau 11 : Les régions charnières dans l'AK et leur localisation dans la structure tertiaire.

Ces résidus sont localisés à proximité ou sur les axes de rotation entre les blocs semi-rigides (Figure 43).

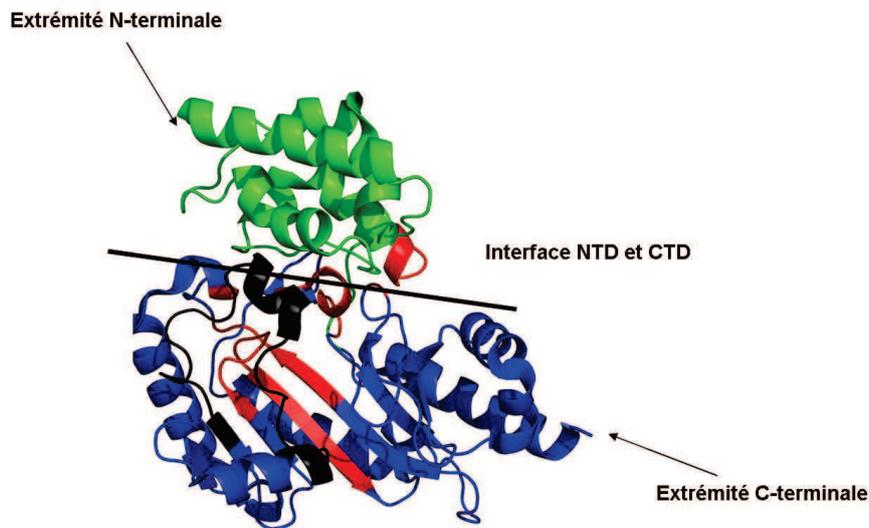


Figure 43 : Localisation dans la structure de l'arginine kinase des acides aminés ayant une dynamique de l'ordre de la milliseconde (rouge et boucle L8 en noir). Le domaine NTD est représenté en vert et le domaine CTD en bleu.

Les régions charnières de l'AK sont très conservées chez les CKs et les autres membres de la famille des guanidino-phosphagènes kinases (Figure 44). Cela suggère qu'un monomère d'une enzyme oligomérique de cette famille et le monomère AK possèdent une dynamique des cinq blocs semi-rigides et des mécanismes réactionnels semblables.

de la CK sont accessibles au solvant (seuil de 25 %). Ainsi dans nos conditions de mesure nous devrions observer un minimum de 10 résonances. Parmi les dix résidus accessibles au solvant, sept sont localisés sur la boucle L8, il s'agit de : Ile187, Asp188, Asp189, His190, Arg208, Arg214, et la Gly215. Récemment la structure cristallographique de la lombricine kinase (LK) en absence (3JPZ) et en présence de MgADP (3JQ3) a été résolue (129). La superposition de ces structures nous permet d'observer que la boucle L8, qui repose sur le bloc 3, est capable de moduler la conformation de la boucle spécifique au nucléotide 311 – 319 grâce à l'interaction de l'His178 (homologue à His191 pour tc-CK et His185 chez l'AK) avec le ribose de l'ADP (129). Les six premiers résidus de la boucle L8, dont His178, sont fortement conservés chez toutes les guanidino-kinases (Figure 47). Bush *et al.* identifient l'His178 comme la clé du changement conformationnel de la LK car ce résidu est responsable de la translation maximale du bloc 3 dans les structures AK-TSAC et CK-TSAC, lors de la fixation du groupement guanidilique dans le site actif. La mutation de l'His178 n'a aucune incidence sur la catalyse, mais abolit la synergie du substrat, car le changement conformationnel n'a pas lieu. La synergie correspond à l'augmentation de l'affinité du second substrat grâce à la fixation du premier. Ainsi la fixation du nucléotide affecte le site de fixation du composé guanidilique (lombricine, arginine ou la créatine). Il est possible que le mouvement de la boucle L8 et du domaine NTD soit impliqué dans la fermeture du site actif et dans la fixation du substrat. La boucle L8 (182-201) et le domaine NTD (1-90) possèdent une dynamique proche du K_{cat} de l'enzyme (150 s^{-1}), ce qui suggère que le changement conformationnel de la protéine est une étape limitante dans l'activité catalytique de l'enzyme (130). Malheureusement, nos analyses sur les données CPMG de la CK-MM libre ou complexée n'ont révélé aucun résidu présentant une dynamique de l'ordre de la micro à la milliseconde. La plupart des résidus charnières de la CK-MM se trouve enfoui et ne sera donc pas observable dans nos conditions d'étude. Nous ne pouvons donc conclure sur la présence ou non de mouvement de l'ordre de la ms pour la CK, mais la similitude de séquence des régions charnières, laisse à penser qu'elles devraient être conservées.

Comme démontré précédemment, la CK-MM et ses homologues ont largement été étudiés dans la littérature. Cependant le mécanisme réactionnel de la CK-MM fait toujours l'objet de nombreuses controverses. Deux modèles sont proposés ci-dessous (Figure 45).

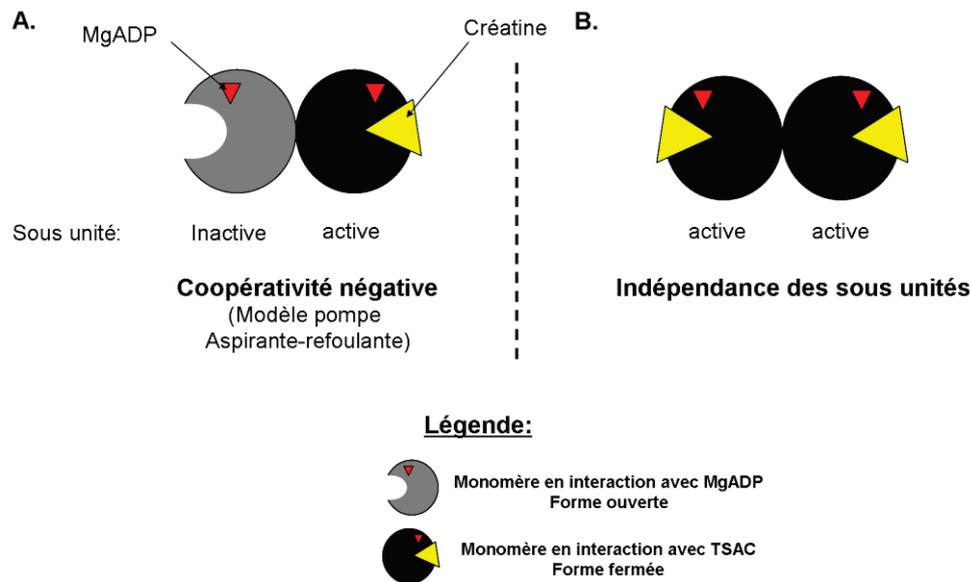


Figure 45 : Schéma de deux modèles du mécanisme réactionnel de la CK-MM. **A)** Le premier modèle représente la coopérativité négative : les sous-unités sont asymétriques (l'une interagit avec Cr-MgADP-NO₃⁻ et l'autre avec MgADP). **B)** le second modèle met en évidence la capacité des domaines à interagir indépendamment avec les substrats.

Le premier modèle concerne la dépendance des monomères de la CK-MM. Dans ce cas, un des sites actifs est responsable de l'activité enzymatique, alors que le second est indispensable au fonctionnement du premier, mais ne participe pas directement à la réaction (Figure 45A). Ainsi les deux monomères auraient une structure tertiaire différente. Ce modèle est confirmé par les structures de la CK-MM complexée à Cr-MgADP-NO₃⁻ qui présente une asymétrie dans la maille cristallographique (43, 44). En effet, un monomère dit "ouvert" interagit avec MgADP, et l'autre dit "fermé" interagit avec Cr-MgADP-NO₃⁻. Les études structurales sur la CK-MM et son homologue, AK dimérique, du concombre de mer *Stichopus japonicus* (présente 60 % d'identité de séquence) ont permis d'identifier l'interface monomère-monomère des homodimères comme les clés de la communication entre les monomères (44, 90). En effet, la délétion des 10 premiers résidus de l'extrémité N-terminale induit une désorganisation de l'interface monomère-monomère et réduit de 15% l'activité du mutant AK_{dimérique} et une augmentation du K_m de l'ATP de 55% en comparaison avec l'AK_{dimérique} sauvage (90). De plus, une comparaison des structures de la CK-TSAC et CK-ADP, met en évidence que la fixation de Cr-MgADP-NO₃⁻ induit le déplacement et le dépliement partiel de l'hélice de l'extrémité N-terminale du monomère fermé de la CK-MM (44) (Figure 46). Ces modifications induisent un changement conformationnel de la boucle 20s qui forme de nouvelles interactions avec la boucle 60s.

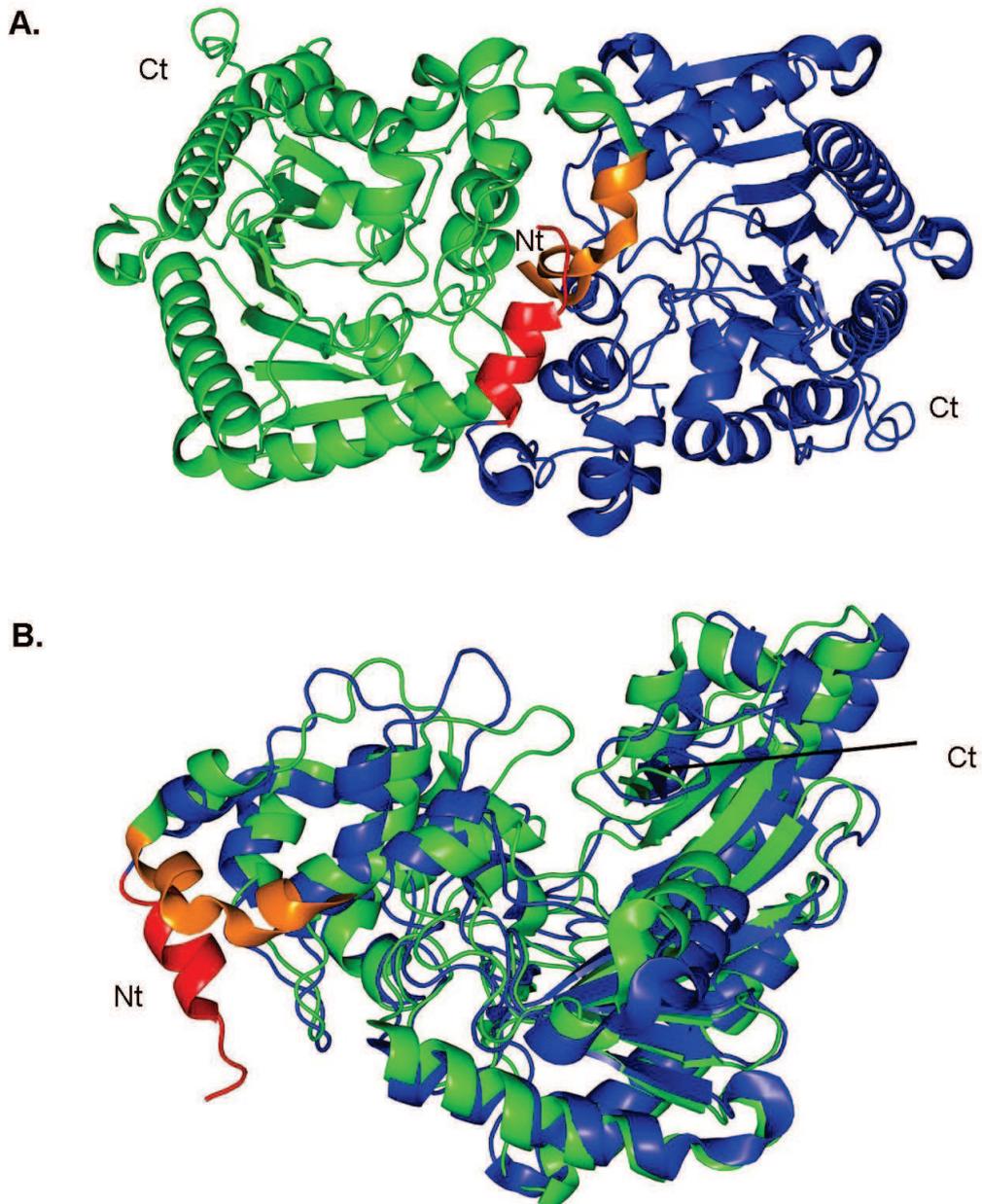


Figure 46 : Réorganisation de l'extrémité N-terminale lors de l'ajout de Cr-MgADP-NO₃⁻. **A)** Représentation en ruban du complexe TSAC. **B)** Superposition des structures des monomères CK-MM/MgADP (en bleu) et du monomère en interaction avec Cr-MgADP-NO₃⁻ (en vert). Les extrémités N-terminales sont représentées en orange pour le monomère fermé et en rouge pour le monomère ouvert (MgADP).

Wu *et al.* précisent le mécanisme de la coopérativité négative des monomères à partir des observations apportées par la résolution récente de la structure du complexe ternaire AK_{dimérique}/AMPPNP/ arginine par Rayons X (code PDB : 3JU6). A partir de cette structure, les auteurs ont observé que le monomère qui fixe les substrats AMPPNP et arginine est plus ouvert" que le monomère qui n'interagit avec aucun substrat. Ainsi, ils ont mis en évidence

l'existence de trois états différents d'un monomère (Figure 47) : fermé (arginine/nitrate/MgADP), repos et ouvert (relargage des produits)

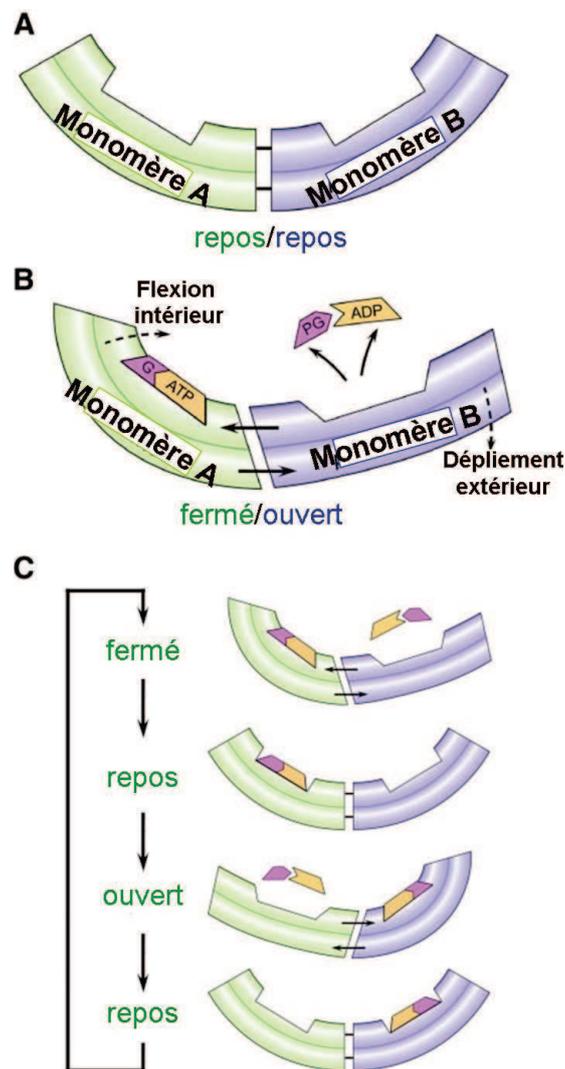


Figure 47 : Représentation schématique du mécanisme de l'AK_{dimérique} et de la communication entre monomère. **A)** Dimère au repos : chacun des monomères est capable de fixer le substrat. **B)** Asymétrie du dimère : la fixation des substrats G (groupement guanidine en rose) et ATP (jaune) induit la fermeture du monomère A. Cette modification conformationnelle est propagée vers le monomère opposé par le biais de liaisons hydrogènes à l'interface du dimère. **C)** Mécanisme proposé par Wu et al. (schéma modifié à partir de (90))

Ces observations concordent avec l'étude enzymatique d'un hybride CK-MB*, dont la sous-unité B* a été inactivée par modification chimique du thiol du centre actif (131). En effet, Hornemann *et al.* observent une diminution de l'activité de 34% pour l'hybride CK-MB* et une augmentation de l'affinité (K_m) pour MgADP et la phospho-créatine. Si les monomères étaient indépendants, l'inactivation d'un site actif aurait conduit à une perte d'activité de 50% et les affinités pour les substrats ne seraient pas modifiées.

Le second modèle repose sur l'indépendance des monomères de la CK-MM. Dans ce modèle, chaque monomère est capable de catalyser la réaction enzymatique simultanément ou alternativement de manière aléatoire (Figure 45B). Ce modèle est confirmé pour les structures cristallographiques de la glycoamine kinase (GK) résolues en présence des substrats glycoamine/MgADP/nitrate (code PDB : 3L2F et 3L2G). Contrairement aux structures de la CK-MM ou de l'AK dimérique, Lim *et al.* n'observent aucune asymétrie de la maille cristallographique. Les deux monomères fixent ainsi simultanément les substrats et sont donc indépendants (132). La GK et la CK présentent une identité de séquence supérieure à 50% (Figure 47). De plus, Mazon *et al.* suggèrent, à partir d'expériences d'échanges proton/deutérium couplés à la spectrométrie de masse sur la créatine kinase musculaire de lapin, que les monomères sont indépendants (89, 133). En effet, ces auteurs observent une diminution de la vitesse d'échange proton/deutérium de la boucle 320s et une protection totale de la boucle enfouie 220s en présence de Cr-MgADP-NO₃⁻. Ces résultats suggèrent que les deux monomères de la CK-MM fixent les substrats (89). Du fait de l'échelle de temps observée par ces expériences, de l'ordre de la seconde, ils n'ont pas pu discerner si les monomères catalysent la réaction enzymatique de façon alternative ou simultanée.

Afin de pouvoir comparer nos expériences RMN avec les structures cristallographiques et les expériences d'échange isotopique proton / deutérium d'Hortense Mazon (89), réalisées sur la CK-MM en présence de Cr-MgADP-NO₃⁻, nous nous sommes placés à des conditions saturantes en substrats lors de l'enregistrement des expériences de type ¹H-¹⁵N HSQC. Les spectres ¹H-¹⁵N HSQC de la CK-MM libre, et complexée à MgADP (Figures 35 et 38) mettent en évidence une symétrie apparente entre les monomères de la CK-MM indiquant que le mécanisme de cette enzyme dans ces conditions est indépendant. En effet, nous n'observons aucun dédoublement des résonances ¹H-¹⁵N sur les spectres de type HSQC de la CK-MM libre ou en interaction avec MgADP. Ce dédoublement aurait dû faire apparaître pour un même résidu, une raie intense (monomère libre) et une raie moins intense (monomère complexé). En présence de Cr-MgADP-NO₃⁻ nous observons sur le spectre ¹H-¹⁵N HSQC de la CK-MM une perte significative du rapport signal sur bruit. Comme décrit page 68 l'élargissement des résonances de la boucle 320s, peut résulter d'un changement de régime en régime d'échange intermédiaire. Dans ce cas les monomères de la CK-MM seraient alternativement sous forme "ouverte" et "fermée". Cependant nos analyses des expériences CPMG n'ont pas mis en évidence la présence de mouvement de l'ordre de la ms pour la boucle 320s quelque soit la forme libre ou complexée de la CK-MM. De plus Borders *et al.*,

ont estimé la constante de dissociation du complexe TSAC à $0,4 \text{ nM}^3$ (50). A une telle affinité le complexe est stable (nous supposons que le complexe TSAC est sous forme fermée, aucune information sur le temps de residence n'est connu dans la littérature). Ceci suggère que les monomères de la CK-MM sont indépendants.

Ces résultats RMN confirment ainsi les expériences d'échange isotopique proton / deutérium d'Hortense Mazon (89) et ne concordent pas avec un modèle coopératif déduit des études cristallographiques de la CK-MM en présence de substrats. Il est probable que l'asymétrie observée dans la maille cristallographique soit induite par les contraintes du cristal. Nous pouvons également supposer que les conditions de cristallogenèse favorisent la cristallisation de cette forme asymétrique de la CK-MM au lieu de la forme symétrique.

IV. Conclusion :

La créatine kinase musculaire (CK-MM) est une enzyme homo-dimérique (2 x 43 kDa) de la famille des guanidino-phosphagènes kinases. Cette enzyme catalyse le transfert réversible d'un groupement phosphate de MgATP vers la créatine pour synthétiser du MgADP et de la phosphocréatine (33). Elle est impliquée dans le processus énergétique de la cellule via la navette phosphocréatine (17). Depuis la découverte de la CK-MM en 1928, de nombreuses études enzymologiques et structurales ont été réalisées afin de caractériser cette protéine. Les structures cristallographiques de la CK-MM en présence ou en absence de substrat (43, 44) ont permis une caractérisation précise des sites actifs et des acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique. Des études de mutagenèse dirigée sur l'interface monomère-monomère de l'enzyme ont mis en évidence que la CK-MM n'est pas active sous forme monomérique (131, 134). Ainsi le maintien de la structure quaternaire de l'homodimère est important pour la réaction enzymatique. Nous savons également que les deux monomères de la CK-MM sont capables d'interagir avec les substrats (33, 89), mais le mécanisme de l'enzyme n'est pas clairement identifié. En effet, deux modèles sont proposés dans la littérature soit les monomères sont coopératifs soit ils sont indépendants.

L'objectif de notre étude était de compléter la compréhension du mécanisme de la CK-MM. Pour cela nous avons réalisé une étude dynamique et structurale de la créatine kinase musculaire de lapin par RMN. Notre étude s'est focalisée sur les huit résidus de la boucle 320s de la CK-MM qui ont pu être attribués sans ambiguïté, du fait de leur dynamique

particulière. Cette boucle est très importante dans la catalyse car elle permet l'alignement correct du nucléotide dans le site actif. Les expériences de perturbation déplacement chimique et de relaxation ont été enregistrées sur la CK-MM libre et à des concentrations saturantes en Cr-MgADP-NO₃⁻, afin de pouvoir comparer nos résultats avec les expériences de Mazon *et al.*, et d'Orhen *et al.* présentées précédemment (cf section III.2.2). Les expériences de relaxation ont mis en évidence la dynamique particulière de la boucle 320s. En absence de substrat, la boucle possède une dynamique rapide de l'ordre de la pico-nanoseconde, avec une valeur moyenne de $R_1 = 1,33 \pm 0,19 \text{ s}^{-1}$, et des signaux fins et plus intenses que le reste de la protéine. Dès l'ajout de MgADP, on observe une diminution des vitesses de relaxation R_1 ($R_1 = 1,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$) et des variations de déplacement chimique des résidus de la boucle 320s. La fixation de MgADP modifie l'environnement électronique de la boucle et probablement la structure de l'enzyme car son rayon de gyration diminue (125). En présence de Cr-MgADP-NO₃⁻, les résonances ¹H-¹⁵N des résidus de la boucle ne peuvent plus être déterminées sans ambiguïté. Cette observation suggère que la dynamique de la boucle est proche de celle du reste de la protéine (de l'ordre de la ms selon les données de dynamique sur l'AK). Cette différence de dynamique de la boucle 320s observée au cours de l'ajout des substrats est due à l'interaction de la boucle 320s avec MgADP et la boucle 60s ce qui permet la fermeture du site actif. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux décrits dans la littérature pour l'AK, homologue de la CK-MM avec 50% d'identité de séquence.

Nos expériences de perturbation de déplacement chimique sur la CK-MM mettent en évidence que les monomères de cette enzyme se comportent indépendamment, et confirme ainsi le modèle en accord avec les résultats obtenus par l'équipe d'Olivier Marcillat (89). Nous observons une symétrie des monomères sur les spectres ¹H-¹⁵N HSQC de la CK-MM libre et complexée à MgADP ou sous forme de TSAC.

Le complexe analogue de transition est la forme fortement inhibée de la CK-MM. Selon Borders *et al.* la constante de dissociation de ce complexe est de 0,4 nM³ (50). Il est probable que l'utilisation des substrats du complexe abortif : Cr-MgADP-NO₃⁻ provoque la fermeture complète des deux monomères. En présence des substrats naturels de la CK-MM en cours de cycle catalytique, il est possible que le mode de fonctionnement de l'enzyme puisse être différent avec des ligands à plus faible affinité. Il est donc envisageable de réaliser une étude RMN avec les véritables substrats de la CK-MM. Nous savons que l'ajout des substrats de l'enzyme provoquent une réaction catalytique (de l'ordre de la minute - cf Tableau 1 et 2 de la section I.1.2.2 page 13), bien inférieure à la durée de l'analyse RMN (quelques heures). Ceci

peut conduire à des spectres moyennés inexploitable. Une des possibilités pour résoudre ce problème serait de diminuer la température lors de l'enregistrement. Il faudrait donc réaliser une étude préliminaire, afin de trouver les meilleures conditions de température, qui permettent de visualiser les différentes populations au cours de la catalyse.

L'étude du comportement des monomères de la CK-MM pourrait également être étudié par modélisation moléculaire en utilisant un long échantillonnage de temps. Selon l'I.U.P.A.C. la définition de cette technique est la suivante : « La modélisation moléculaire est l'investigation des structures et des propriétés moléculaires, utilisant la chimie calculatoire sur ordinateur et les techniques de visualisation graphique afin de donner une représentation tridimensionnelle plausible dans des circonstances définies ». Cette technique s'appuie sur les méthodes de chimie théorique, les données expérimentales RMN et de cristallographie. Les applications de cette technique sont nombreuses. A l'aide de la modélisation moléculaire des simulations d'arrimage entre un ligand et un récepteur peuvent être réalisées. Une étude des mouvements moléculaires, ou de changement conformationnel par le biais de la dynamique moléculaire permettrait sans doute d'améliorer la compréhension du mode de fonctionnement des sous-unités de la CK-MM lors de l'ajout des différents substrats. Cette étude permettrait également d'apporter des éléments de réponse à la question suivante : Quel est le rôle biologique de la structure quaternaire de la CK-MM, et en général de tous les oligomères de la famille des guanidino-phosphagènes kinases ?

Bibliographie :

1. Eggleton, P., and Eggleton, G. P. (1928) Further observations on phosphagen, *J Physiol* 65, 15-24.
2. Lohman, K. (1934) Über die enzymatische aufspaltung de kreatinphosphorsaure; zugleich ein beitrage zum chemismus der muskelkontraktion., *Biochem* 271, 264-277.
3. Dawson, D. M., Eppenberger, H. M., and Kaplan, N. O. (1965) Creatine kinase: evidence for a dimeric structure, *Biochem Biophys Res Commun* 21, 346-353.
4. Nigro, J. M., Schweinfest, C. W., Rajkovic, A., Pavlovic, J., Jamal, S., Dottin, R. P., Hart, J. T., Kamarck, M. E., Rae, P. M., Carty, M. D., and et al. (1987) cDNA cloning and mapping of the human creatine kinase M gene to 19q13, *Am J Hum Genet* 40, 115-125.
5. Mariman, E. C., Broers, C. A., Claesen, C. A., Tesser, G. I., and Wieringa, B. (1987) Structure and expression of the human creatine kinase B gene, *Genomics* 1, 126-137.
6. Kuby, S. A., Noda, L., and Lardy, H. A. (1954) Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle, *J Biol Chem* 209, 191-201.
7. Eppenberger, H. M., Eppenberger, M., Richterich, R., and Aebi, H. (1964) The Ontogeny of Creatine Kinase Isozymes, *Dev Biol* 10, 1-16.
8. Dawson, D. M., Eppenberger, H. M., and Kaplan, N. O. (1967) Comparative Enzymology of Creatine Kinases .2. Physical and Chemical Properties, *Journal of Biological Chemistry* 242, 210-&.
9. Wallimann, T. (1994) Dissecting the Role of Creatine-Kinase, *Current Biology* 4, 42-46.
10. Klein, S. C., Haas, R. C., Perryman, M. B., Billadello, J. J., and Strauss, A. W. (1991) Regulatory element analysis and structural characterization of the human sarcomeric mitochondrial creatine kinase gene, *J Biol Chem* 266, 18058-18065.
11. Stallings, R. L., Olson, E., Strauss, A. W., Thompson, L. H., Bachinski, L. L., and Siciliano, M. J. (1988) Human creatine kinase genes on chromosomes 15 and 19, and proximity of the gene for the muscle form to the genes for apolipoprotein C2 and excision repair, *Am J Hum Genet* 43, 144-151.
12. Hossle, J. P., Schlegel, J., Wegmann, G., Wyss, M., Bohlen, P., Eppenberger, H. M., Wallimann, T., and Perriard, J. C. (1988) Distinct tissue specific mitochondrial creatine kinases from chicken brain and striated muscle with a conserved CK framework, *Biochem Biophys Res Commun* 151, 408-416.
13. Schlegel, J., Wyss, M., Schurch, U., Schnyder, T., Quest, A., Wegmann, G., Eppenberger, H. M., and Wallimann, T. (1988) Mitochondrial creatine kinase from cardiac muscle and brain are two distinct isoenzymes but both form octameric molecules, *J Biol Chem* 263, 16963-16969.
14. Quemeneur, E., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Vial, C., Beauregard, G., and Potier, M. (1988) The radiation inactivation method provides evidence that membrane-bound mitochondrial creatine kinase is an oligomer, *Biochem Biophys Res Commun* 153, 1310-1314.
15. Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R. A., and Wallimann, T. (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism, *Biochim Biophys Acta* 1102, 119-166.
16. Muhlebach, S. M., Gross, M., Wirz, T., Wallimann, T., Perriard, J. C., and Wyss, M. (1994) Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes, *Mol Cell Biochem* 133-134, 245-262.

17. Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., and Eppenberger, H. M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis, *Biochem J* 281 (Pt 1), 21-40.
18. Kammermeier, H. (1987) Why do cells need phosphocreatine and a phosphocreatine shuttle, *J Mol Cell Cardiol* 19, 115-118.
19. Wallimann, T., Schnyder, T., Schlegel, J., Wyss, M., Wegmann, G., Rossi, A. M., Hemmer, W., Eppenberger, H. M., and Quest, A. F. (1989) Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: important aspects of the phosphoryl-creatine circuit, *Prog Clin Biol Res* 315, 159-176.
20. Stockler, S., Holzbach, U., Hanefeld, F., Marquardt, I., Helms, G., Requart, M., Hanicke, W., and Frahm, J. (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism, *Pediatr Res* 36, 409-413.
21. Khatoun, S., Campbell, S. R., Haley, B. E., and Slevin, J. T. (1989) Aberrant guanosine triphosphate-beta-tubulin interaction in Alzheimer's disease, *Ann Neurol* 26, 210-215.
22. Milhorat, A. T. (1953) Creatine and creatinine metabolism and diseases of the neuromuscular system, *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 32, 400-421.
23. Wyss, M., Felber, S., Skladal, D., Koller, A., Kremser, C., and Sperl, W. (1998) The therapeutic potential of oral creatine supplementation in muscle disease, *Med Hypotheses* 51, 333-336.
24. Brewer, G. J., and Wallimann, T. W. (2000) Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons, *J Neurochem* 74, 1968-1978.
25. Pulido, S. M., Passaquin, A. C., Leijendekker, W. J., Challet, C., Wallimann, T., and Rugg, U. T. (1998) Creatine supplementation improves intracellular Ca²⁺ handling and survival in mdx skeletal muscle cells, *FEBS Lett* 439, 357-362.
26. Kanemitsu, F., and Okigaki, T. (1990) Clinical application of subforms of creatine kinase MM and macro creatine kinases, *J Chromatogr* 526, 423-438.
27. Kaddurah-Daouk, R., Lillie, J. W., Daouk, G. H., Green, M. R., Kingston, R., and Schimmel, P. (1990) Induction of a cellular enzyme for energy metabolism by transforming domains of adenovirus E1a, *Mol Cell Biol* 10, 1476-1483.
28. Zhao, J., Schmiege, F. I., Simmons, D. T., and Molloy, G. R. (1994) Mouse p53 represses the rat brain creatine kinase gene but activates the rat muscle creatine kinase gene, *Mol Cell Biol* 14, 8483-8492.
29. Bretonnet, A. S., Jochum, A., Walker, O., Krimm, I., Goekjian, P., Marcillat, O., and Lancelin, J. M. (2007) NMR screening applied to the fragment-based generation of inhibitors of creatine kinase exploiting a new interaction proximate to the ATP binding site, *Journal of Medicinal Chemistry* 50, 1865-1875.
30. Morrison, J. F., and Cleland, W. W. (1966) Isotope exchange studies of the mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate: creatine phosphotransferase, *J Biol Chem* 241, 673-683.
31. Kupriyanov, V. V., Balaban, R. S., Lyulina, N. V., Steinschneider, A., and Saks, V. A. (1990) Combination of 31P-NMR magnetization transfer and radioisotope exchange methods for assessment of an enzyme reaction mechanism: rate-determining steps of the creatine kinase reaction, *Biochim Biophys Acta* 1020, 290-304.
32. Schimerlik, M. I., and Cleland, W. W. (1973) Inhibition of creatine kinase by chromium nucleotides, *J Biol Chem* 248, 8418-8423.

33. McLeish, M. J., and Kenyon, G. L. (2005) Relating structure to mechanism in creatine kinase, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 1-20.
34. Morrison, J. F., and James, E. (1965) Mechanism of Reaction Catalysed by Adenosine Triphosphate-Creatine Phosphotransferase, *Biochemical Journal* 97, 37-&.
35. Maggio, E. T., and Kenyon, G. L. (1977) Properties of a CH₃-blocked creatine kinase with altered catalytic activity. Kinetic consequences of the presence of the blocking group, *J Biol Chem* 252, 1202-1207.
36. Novak, W. R., Wang, P. F., McLeish, M. J., Kenyon, G. L., and Babbitt, P. C. (2004) Isoleucine 69 and valine 325 form a specificity pocket in human muscle creatine kinase, *Biochemistry* 43, 13766-13774.
37. Milner-White, E. J., and Watts, D. C. (1971) Inhibition of adenosine 5'-triphosphate-creatine phosphotransferase by substrate-anion complexes. Evidence for the transition-state organization of the catalytic site, *Biochem J* 122, 727-740.
38. Saks, V. A., Kupriyanov, V. V., Elizarova, G. V., and Jacobus, W. E. (1980) Studies of energy transport in heart cells. The importance of creatine kinase localization for the coupling of mitochondrial phosphorylcreatine production to oxidative phosphorylation, *J Biol Chem* 255, 755-763.
39. McLaughlin, A. C., Leigh, J. S., Jr., and Cohn, M. (1976) Magnetic resonance study of the three-dimensional structure of creatine kinase-substrate complexes. Implications for substrate specificity and catalytic mechanism, *J Biol Chem* 251, 2777-2787.
40. Borders, C. L., Jr., Snider, M. J., Wolfenden, R., and Edmiston, P. L. (2002) Determination of the affinity of each component of a composite quaternary transition-state analogue complex of creatine kinase, *Biochemistry* 41, 6995-7000.
41. Mohana Rao, J. K., Bujacz, G., and Wlodawer, A. (1998) Crystal structure of rabbit muscle creatine kinase, *FEBS Letters* 439, 133-137.
42. Shen, Y. Q., Tang, L., Zhou, H. M., and Lin, Z. J. (2001) Structure of human muscle creatine kinase, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 1196-1200.
43. Lahiri, S. D., Wang, P. F., Babbitt, P. C., McLeish, M. J., Kenyon, G. L., and Allen, K. N. (2002) The 2.1 Å structure of *Torpedo californica* creatine kinase complexed with the ADP-Mg(2+)-NO(3)(-)-creatine transition-state analogue complex, *Biochemistry* 41, 13861-13867.
44. Ohren, J. F., Kundracik, M. L., Borders, C. L., Jr., Edmiston, P., and Viola, R. E. (2007) Structural asymmetry and intersubunit communication in muscle creatine kinase, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 381-389.
45. Webb, T. I., and Morris, G. E. (2001) Structure of an intermediate in the unfolding of creatine kinase, *Proteins* 42, 269-278.
46. Guo, S.-Y., Wang, Z., Ni, S.-W., and Wang, X.-C. (2003) Consequences of a six residual deletion from the N-terminal of rabbit muscle creatine kinase, *Biochimie* 85, 999-1005.
47. Cox, J. M., Davis, C. A., Chan, C., Jourden, M. J., Jorjorian, A. D., Brym, M. J., Snider, M. J., Borders, C. L., Jr., and Edmiston, P. L. (2003) Generation of an active monomer of rabbit muscle creatine kinase by site-directed mutagenesis: the effect of quaternary structure on catalysis and stability, *Biochemistry* 42, 1863-1871.
48. Zhao, T.-J., Feng, S., Wang, Y.-L., Liu, Y., Luo, X.-C., Zhou, H.-M., and Yan, Y.-B. (2006) Impact of intra-subunit domain-domain interactions on creatine kinase activity and stability, *FEBS Letters* 580, 3835-3840.
49. Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., and Vial, C. (2005) Local dynamics measured by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry of creatine kinase digested by two proteases, *Biochimie* 87, 1101-1110.

50. Forstner, M., Muller, A., Stolz, M., and Wallimann, T. (1997) The active site histidines of creatine kinase. A critical role of His 61 situated on a flexible loop, *Protein Sci* 6, 331-339.
51. Mourad-Terzian, T., Steghens, J. P., Min, K. L., Collombel, C., and Bozon, D. (2000) Creatine kinase isoenzymes specificities: histidine 65 in human CK-BB, a role in protein stability, not in catalysis, *FEBS Lett* 475, 22-26.
52. Wang, P. F., Flynn, A. J., McLeish, M. J., and Kenyon, G. L. (2005) Loop movement and catalysis in creatine kinase, *IUBMB Life* 57, 355-362.
53. Edmiston, P. L., Schavolt, K. L., Kersteen, E. A., Moore, N. R., and Borders, C. L. (2001) Creatine kinase: a role for arginine-95 in creatine binding and active site organization, *Biochim Biophys Acta* 1546, 291-298.
54. Bittl, J. A., DeLayre, J., and Ingwall, J. S. (1987) Rate equation for creatine kinase predicts the in vivo reaction velocity: ³¹P NMR surface coil studies in brain, heart, and skeletal muscle of the living rat, *Biochemistry* 26, 6083-6090.
55. Jourden, M. J., Geiss, P. R., Thomenius, M. J., Horst, L. A., Barty, M. M., Brym, M. J., Mulligan, G. B., Almeida, R. M., Kersteen, B. A., Myers, N. R., Snider, M. J., Borders, C. L., Jr., and Edmiston, P. L. (2005) Transition state stabilization by six arginines clustered in the active site of creatine kinase, *Biochim Biophys Acta* 1751, 178-183.
56. Rosevear, P. R., Desmeules, P., Kenyon, G. L., and Mildvan, A. S. (1981) Nuclear magnetic resonance studies of the role of histidine residues at the active site of rabbit muscle creatine kinase, *Biochemistry* 20, 6155-6164.
57. Chen, L. H., Borders, C. L., Jr., Vasquez, J. R., and Kenyon, G. L. (1996) Rabbit muscle creatine kinase: consequences of the mutagenesis of conserved histidine residues, *Biochemistry* 35, 7895-7902.
58. Gross, M., Furter-Graves, E. M., Wallimann, T., Eppenberger, H. M., and Furter, R. (1994) The tryptophan residues of mitochondrial creatine kinase: roles of Trp-223, Trp-206, and Trp-264 in active-site and quaternary structure formation, *Protein Sci* 3, 1058-1068.
59. Min, K. L., Steghens, J. P., Henry, R., Doutheau, A., and Collombel, C. (1998) Identification of the creatine binding domain of creatine kinase by photoaffinity labeling, *Biochim Biophys Acta* 1387, 80-88.
60. Buechter, D. D., Medzihradzky, K. F., Burlingame, A. L., and Kenyon, G. L. (1992) The active site of creatine kinase. Affinity labeling of cysteine 282 with N-(2,3-epoxypropyl)-N-amidinoglycine, *J Biol Chem* 267, 2173-2178.
61. McLaughlin, A. C., Cohn, M., and Kenyon, G. L. (1972) Specificity of creatine kinase for guanidino substrates. Kinetic and proton nuclear magnetic relaxation rate studies, *J Biol Chem* 247, 4382-4388.
62. Uda, K., and Suzuki, T. (2004) Role of amino acid residues on the GS region of Stichopus arginine kinase and Danio creatine kinase, *Protein J* 23, 53-64.
63. Cantwell, J. S., Novak, W. R., Wang, P. F., McLeish, M. J., Kenyon, G. L., and Babbitt, P. C. (2001) Mutagenesis of two acidic active site residues in human muscle creatine kinase: implications for the catalytic mechanism, *Biochemistry* 40, 3056-3061.
64. Wang, P. F., McLeish, M. J., Kneen, M. M., Lee, G., and Kenyon, G. L. (2001) An unusually low pK(a) for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase, *Biochemistry* 40, 11698-11705.
65. Wang, P. F., Flynn, A. J., Naor, M. M., Jensen, J. H., Cui, G., Merz, K. M., Jr., Kenyon, G. L., and McLeish, M. J. (2006) Exploring the role of the active site cysteine in human muscle creatine kinase, *Biochemistry* 45, 11464-11472.

66. Naor, M. M., and Jensen, J. H. (2004) Determinants of cysteine pKa values in creatine kinase and alpha1-antitrypsin, *Proteins* 57, 799-803.
67. Mahowald, T. A., Noltmann, E. A., and Kuby, S. A. (1962) Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. III. Inhibition reactions, *J Biol Chem* 237, 1535-1548.
68. Zhou, H. M., and Tsou, C. L. (1987) The presence of reactive SH groups in the enzymatically active dicyano derivative of creatine kinase, *Biochim Biophys Acta* 911, 136-143.
69. Wu, H., Yao, Q. Z., and Tsou, C. L. (1989) Creatine kinase is modified by 2-chloromercuri-4-nitrophenol at the active site thiols with complete inactivation, *Biochim Biophys Acta* 997, 78-82.
70. der Terrossian, E., and Kassab, R. (1976) Preparation and properties of S-cyano derivatives of creatine kinase, *Eur J Biochem* 70, 623-628.
71. Smith, D. J. a. K., G.L. (1974) Nonessentiality of the active sulfhydryl group of rabbit muscle creatine kinase, *J Biol Chem* 249, 3317-3318.
72. Price, N. C., and Hunter, M. G. (1976) Non-identical behaviour of the subunits of rabbit muscle creatine kinase, *Biochim Biophys Acta* 445, 364-376.
73. O'Sullivan, W. J., and Cohn, M. (1966) Nucleotide specificity and conformation of the active site of creatine kinase. Magnetic resonance and sulfhydryl reactivity studies, *J Biol Chem* 241, 3116-3125.
74. Kuby, S. A., Noda, L., and Lardy, H. A. (1954) Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. III. Kinetic studies, *J Biol Chem* 210, 65-82.
75. Roustan, C., Kassab, R., Pradel, L. A., and van Thoai, N. (1968) [Interaction of ATP:guanidine phosphotransferases with their substrates, studies by differential spectrophotometry], *Biochim Biophys Acta* 167, 326-338.
76. Reed, G. H., and Cohn, M. (1972) Structural changes induced by substrates and anions at the active site of creatine kinase. Electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic relaxation rate studies of the manganous complexes, *J Biol Chem* 247, 3073-3081.
77. Reed, G. H., and Leyh, T. S. (1980) Identification of the six ligands to manganese(II) in transition-state-analogue complexes of creatine kinase: oxygen-17 superhyperfine coupling from selectively labeled ligands, *Biochemistry* 19, 5472-5480.
78. Ray, B. D., Chau, M. H., Fife, W. K., Jarori, G. K., and Rao, B. D. (1996) Conformation of manganese(II)-nucleotide complexes bound to rabbit muscle creatine kinase: ¹³C NMR measurements using [2-¹³C]ATP and [2-¹³C]ADP, *Biochemistry* 35, 7239-7246.
79. Jarori, G. K., Ray, B. D., and Nageswara Rao, B. D. (1985) Structure of metal-nucleotide complexes bound to creatine kinase: ³¹P NMR measurements using Mn(II) and Co(II), *Biochemistry* 24, 3487-3494.
80. Cleland, W. W. (1967) Enzyme kinetics, *Annu Rev Biochem* 36, 77-112.
81. Zhou, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, W. R., and Chapman, M. S. (1998) Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8449-8454.
82. Borders, C. L., Jr., MacGregor, K. M., Edmiston, P. L., Gbeddy, E. R., Thomenius, M. J., Mulligan, G. B., and Snider, M. J. (2003) Asparagine 285 plays a key role in transition state stabilization in rabbit muscle creatine kinase, *Protein Sci* 12, 532-537.
83. Couthon, F., Clottes, E., Ebel, C., and Vial, C. (1995) Reversible dissociation and unfolding of dimeric creatine kinase isoenzyme MM in guanidine hydrochloride and urea, *Eur J Biochem* 234, 160-170.

84. Couthon, F., Clottes, E., and Vial, C. (1997) High salt concentrations induce dissociation of dimeric rabbit muscle creatine kinase. Physico-chemical characterization of the monomeric species, *Biochim Biophys Acta* 1339, 277-288.
85. Couthon, F., Clottes, E., Angrand, M., Roux, B., and Vial, C. (1996) Denaturation of MM-creatine kinase by sodium dodecyl sulfate, *J Protein Chem* 15, 527-537.
86. Leydier, C., Clottes, E., Couthon, F., Marcillat, O., Ebel, C., and Vial, C. (1998) Evidence for kinetic intermediate states during the refolding of GdnHCl-denatured MM-creatine kinase. Characterization of a trapped monomeric species, *Biochemistry* 37, 17579-17589.
87. Zhou, H. M., Zhang, X. H., Yin, Y., and Tsou, C. L. (1993) Conformational changes at the active site of creatine kinase at low concentrations of guanidinium chloride, *Biochem J* 291 (Pt 1), 103-107.
88. Davulcu, O., Flynn, P. F., Chapman, M. S., and Skalicky, J. J. (2009) Intrinsic domain and loop dynamics commensurate with catalytic turnover in an induced-fit enzyme, *Structure* 17, 1356-1367.
89. Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., and Vial, C. (2003) Changes in MM-CK conformational mobility upon formation of the ADP-Mg(2+)-NO(3)(-)-creatine transition state analogue complex as detected by hydrogen/deuterium exchange, *Biochemistry* 42, 13596-13604.
90. Wu, X., Ye, S., Guo, S., Yan, W., Bartlam, M., and Rao, Z. (2010) Structural basis for a reciprocating mechanism of negative cooperativity in dimeric phosphagen kinase activity, *FASEB J* 24, 242-252.
91. Perraut, C., Clottes, E., Leydier, C., Vial, C., and Marcillat, O. (1998) Role of quaternary structure in muscle creatine kinase stability: tryptophan 210 is important for dimer cohesion, *Proteins* 32, 43-51.
92. Cai, M., Huang, Y., Sakaguchi, K., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Craigie, R. (1998) An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in *Escherichia coli*, *J Biomol NMR* 11, 97-102.
93. Van de Ven, F. J. M. (1995) *Multidimensional NMR in liquids: Basic principles and Experimental methods.*, VCH publishers.
94. Beraud, S. (2002) Caractérisation Structurale et Dynamique par Résonance Magnétique Nucléaire d'une protéine de 25 kDa: la Méthionine Sulfoxyde Réductase d'*Erwinia chrysanthemi.*, Thèse.
95. Venters, R. A., Farmer, B. T., 2nd, Fierke, C. A., and Spicer, L. D. (1996) Characterizing the use of perdeuteration in NMR studies of large proteins: ¹³C, ¹⁵N and ¹H assignments of human carbonic anhydrase II, *J Mol Biol* 264, 1101-1116.
96. Gardner, K. H., and Kay, L. E. (1998) The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 357-406.
97. Marley, J., Lu, M., and Bracken, C. (2001) A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins, *J Biomol NMR* 20, 71-75.
98. Muchmore, D. C., McIntosh, L. P., Russell, C. B., Anderson, D. E., and Dahlquist, F. W. (1989) Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance, *Methods Enzymol* 177, 44-73.
99. Piszczek, G., Lee, J. C., Tjandra, N., Lee, C. R., Seok, Y. J., Levine, R. L., and Peterkofsky, A. (2011) Deuteration of *Escherichia coli* enzyme I(Ntr) alters its stability, *Arch Biochem Biophys* 507, 332-342.
100. Brockwell, D., Yu, L., Cooper, S., McClelland, S., Cooper, A., Attwood, D., Gaskell, S. J., and Barber, J. (2001) Physicochemical consequences of the perdeuteration of glutathione S-transferase from *S. japonicum*, *Protein Sci* 10, 572-580.

101. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
102. Clottes, E., Leydier, C., Couthon, F., Marcillat, O., and Vial, C. (1997) Denaturation by guanidinium chloride of dimeric MM-creatine kinase and its proteinase K-nicked form: evidence for a multiple-step process, *Biochim Biophys Acta* 1338, 37-46.
103. Hagihara, Y., Tan, Y., and Goto, Y. (1994) Comparison of the conformational stability of the molten globule and native states of horse cytochrome c. Effects of acetylation, heat, urea and guanidine-hydrochloride, *J Mol Biol* 237, 336-348.
104. Leydier, C. (1998) Etude structurale de la créatine kinase cytosolique MM. Caractérisation des processus de dépliement-repliement, *Thèse de l'Université Claude bernard Lyon 1*.
105. Font, B., Vial, C., Goldschmidt, D., Eichenberger, D., and Gautheron, D. C. (1981) Heart mitochondrial creatine kinase solubilization. Effect of mitochondrial swelling and SH group reagents, *Arch Biochem Biophys* 212, 195-203.
106. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J Biomol NMR* 6, 277-293.
107. Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1995) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data *Journal of Biomolecular NMR* 4, 603-614.
108. Goddard, T. D., and Kneller, D. G. Sparky 3, University of California, San Francisco.
109. Hubbard, S. J., and Thornton, J. M. (1993) NACCESS, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London.
110. Bodenhausen, G. R., D.J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy., *Chem. Phys. Lett.* 69, 185-189.
111. Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wuthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12366-12371.
112. Fernandez, C., and Wider, G. (2003) TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules, *Curr Opin Struct Biol* 13, 570-580.
113. Riek, R., Pervushin, K., and Wuthrich, K. (2000) TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution, *Trends Biochem Sci* 25, 462-468.
114. Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sorensen, O. W., and Griesinger, C. (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients, *J Biomol NMR* 4, 301-306.
115. Grzesiek, S. B., A. (1992) Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein., *J. Magn. Reson.* 96, 432-440.
116. Fesik, S. W., Luly, J. R., Erickson, J. W., and Abad-Zapatero, C. (1988) Isotope-edited proton NMR study on the structure of a pepsin/inhibitor complex, *Biochemistry* 27, 8297-8301.
117. Hattori, A., Crespi, H. L., and Katz, J. J. (1965) Effect of side-chain deuteration on protein stability, *Biochemistry* 4, 1213-1225.
118. Hattori, A., Crespi, H. L., and Katz, J. J. (1965) Association and Dissociation of Phycocyanin and the Effects of Deuterium Substitution on the Processes, *Biochemistry* 4, 1225-1238.
119. Liu, X., Hanson, B. L., Langan, P., and Viola, R. E. (2007) The effect of deuteration on protein structure: a high-resolution comparison of hydrogenous and perdeuterated haloalkane dehalogenase, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 1000-1008.

120. Folch, B. (2010) Etude bioinformatique de la stabilité thermique des protéines : conception de potentiels statistiques dépendant de la température et développement d'approches prédictives/Bioinformatic study of protein thermal stability : development of temperature dependent statistical potentials and design of predictive approaches.
121. Pollastri, G., Baldi, P., Fariselli, P., and Casadio, R. (2002) Prediction of coordination number and relative solvent accessibility in proteins, *Proteins* 47, 142-153.
122. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and nucleic Acids*, John Wiley.
123. Schwarzingler, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2000) Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: implementation of random coil shift data in NMRView, *J Biomol NMR* 18, 43-48.
124. Davulcu, O. (2008) The intrinsic dynamics of arginine kinase., In *Department of Chemistry ans biochemistry* Florida state university, USA.
125. Forstner, M., Kriechbaum, M., Laggner, P., and Wallimann, T. (1998) Structural changes of creatine kinase upon substrate binding, *Biophys J* 75, 1016-1023.
126. Yousef, M. S., Fabiola, F., Gattis, J. L., Somasundaram, T., and Chapman, M. S. (2002) Refinement of the arginine kinase transition-state analogue complex at 1.2 angstrom resolution: mechanistic insights, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 58, 2009-2017.
127. Niu, X., Bruschiweiler-Li, L., Davulcu, O., Skalicky, J. J., Bruschiweiler, R., and Chapman, M. S. (2011) Arginine kinase: joint crystallographic and NMR RDC analyses link substrate-associated motions to intrinsic flexibility, *J Mol Biol* 405, 479-496.
128. Yousef, M. S., Clark, S. A., Pruett, P. K., Somasundaram, T., Ellington, W. R., and Chapman, M. (2003) Induced fit in guanidino kinases - comparison of substrate-free and transition state analog structures of arginine kinase, *Protein Sci.* 12, 103-111.
129. Bush, D. J., Kirillova, O., Clark, S. A., Davulcu, O., Fabiola, F., Xie, Q., Somasundaram, T., Ellington, W. R., and Chapman, M. S. (2011) The structure of lombricine kinase: implications for phosphagen kinase conformational changes, *J Biol Chem* 286, 9338-9350.
130. Davulcu, O., Skalicky, J. J., and Chapman, M. S. (2011) Rate-Limiting Domain and Loop Motions in Arginine Kinase, *Biochemistry*.
131. Hornemann, T., Rutishauser, D., and Wallimann, T. (2000) Why is creatine kinase a dimer? Evidence for cooperativity between the two subunits, *Biochim Biophys Acta* 1480, 365-373.
132. Lim, K., Pullalarevu, S., Surabian, K. T., Howard, A., Suzuki, T., Moulton, J., and Herzberg, O. (2010) Structural basis for the mechanism and substrate specificity of glycoamine kinase, a phosphagen kinase family member, *Biochemistry* 49, 2031-2041.
133. Mazon, H. (2003) Caractérisation des variations structurales de la créatine kinase à l'aide de sondes spectroscopiques et de l'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse., Université Claude Bernard, Lyon.
134. Awama, A. M., Mazon, H., Vial, C., and Marcillat, O. (2007) Despite its high similarity with monomeric arginine kinase, muscle creatine kinase is only enzymatically active as a dimer, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 458, 158-166.

Chapitre II : Le domaine UIM-SH3 de STAM2

I Contexte biologique de la protéine STAM2

Dans une cellule, les protéines impliquées dans l'homéostasie, le métabolisme énergétique ou le maintien de l'information génétique sont renouvelés constamment et leurs taux sont finement régulés. Ceci implique des processus permanents de synthèse et de dégradation protéolytique. Les voies de dégradation protéosomale et lysosomale sont deux voies majeures utilisées par la cellule et dépendantes de l'ubiquitine. Elles jouent un rôle non négligeable dans la régulation fonctionnelle de ces protéines.

Cette étude porte sur la protéine STAM 2 qui intervient dans la voie de dégradation lysosomale des récepteurs membranaires. Cette voie est constituée de deux étapes majeures, résumées dans la figure 1, qui sont :

- L'internalisation des récepteurs membranaires par endocytose
- La formation des corps multi-vésiculaires (MVBs) et fusion des MVBs avec les lysosomes.

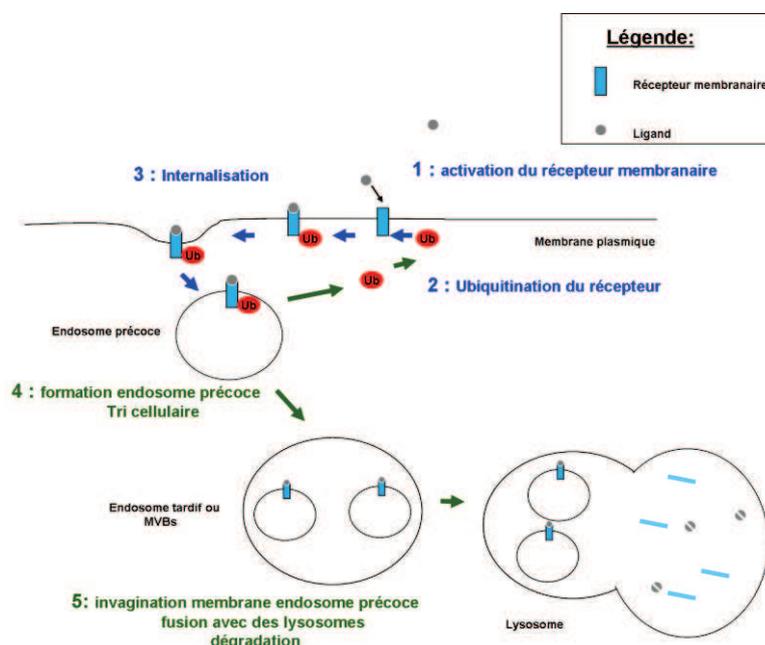


Figure 1 : Schéma des différentes étapes impliquées dans la voie de dégradation lysosomale. Les récepteurs localisés à la surface cellulaire sont activés par la fixation de leurs ligands (1), puis sont ubiquitinés (2). L'ubiquitine est le signal de l'internalisation des récepteurs (endocytose) et de la formation des endosomes précoces (3). Un tri des protéines membranaires se produit dans l'endosome précoce (3). Les récepteurs ubiquitinés sont internalisés via des vésicules intraluminales formant ainsi les MVBs (5), qui fusionneront avec les lysosomes. Les protéines non ubiquitinées sont recyclées vers la membrane plasmique.

I.1. La voie de dégradation lysosomale

I.1.1. Ubiquitination et reconnaissance des récepteurs ubiquitinés

I.1.1.1. L'ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine ubiquitaire de 76 acides aminés, qui est fortement conservée dans l'évolution. Elle possède un motif di-glycine à l'extrémité C-terminale, dans lequel le dernier résidu (Gly76) est impliqué dans l'ubiquitination.

L'ubiquitination des protéines membranaires est le signal moléculaire de la voie de dégradation lysosomale, et intervient également dans de nombreux processus cellulaires. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle, qui permet la formation d'une liaison peptidique entre le groupement carbonyle du résidu glycine 76 de l'ubiquitine et le groupement ϵ -amino d'un résidu lysine d'une protéine cible (substrat). Cette modification se déroule en trois étapes (Figure 2). Dans un premier temps, l'ubiquitine est activée par une enzyme activatrice d'ubiquitine : E1. Une liaison thioester est formée entre les cystéines catalytiques d'E1 et le groupement carboxyle de la glycine 76 de l'ubiquitine ; cette étape requiert l'hydrolyse de l'ATP. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une cystéine du site actif d'une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine : E2. Finalement, l'enzyme E2 interagit avec une protéine ubiquitine ligase E3. Cette dernière est responsable de la reconnaissance de la protéine cible et du transfert de l'ubiquitine sur celle-ci (Figure 2A-B).

Il existe deux grandes familles d'ubiquitine ligases: celle pourvu d'un domaine RING, et celle possédant un domaine HECT. Les enzymes E3 contenant un domaine RING permettent le rapprochement de l'enzyme E2 à proximité de la protéine cible. Ainsi l'enzyme E2 peut directement effectuer le transfert de l'ubiquitine activée vers le substrat (1) (Figure 2A). Le domaine RING possède une séquence consensus riche en résidus cystéine et histidine, formant une structure en croix qui est capable de fixer deux ions Zn^{2+} (1). Les enzymes E3 possédant le domaine HECT, sont capables de catalyser directement l'ubiquitination d'une protéine cible (2, 3). Le domaine HECT contient 350 acides aminés, dont une cystéine qui est fortement conservée. L'enzyme E2 transfère l'ubiquitine sur cette cystéine du domaine HECT de l'enzyme E3, qui le transfère par la suite au substrat (2, 3)

(Figure 2B). Une variante a été observée dans des cellules où les enzymes E3 ont été supprimées par des expériences ARN interférence (4). Dans ce cas, l'enzyme E2 catalyse directement le transfert de l'ubiquitine de sa cystéine active vers la protéine cible (Figure 2C).

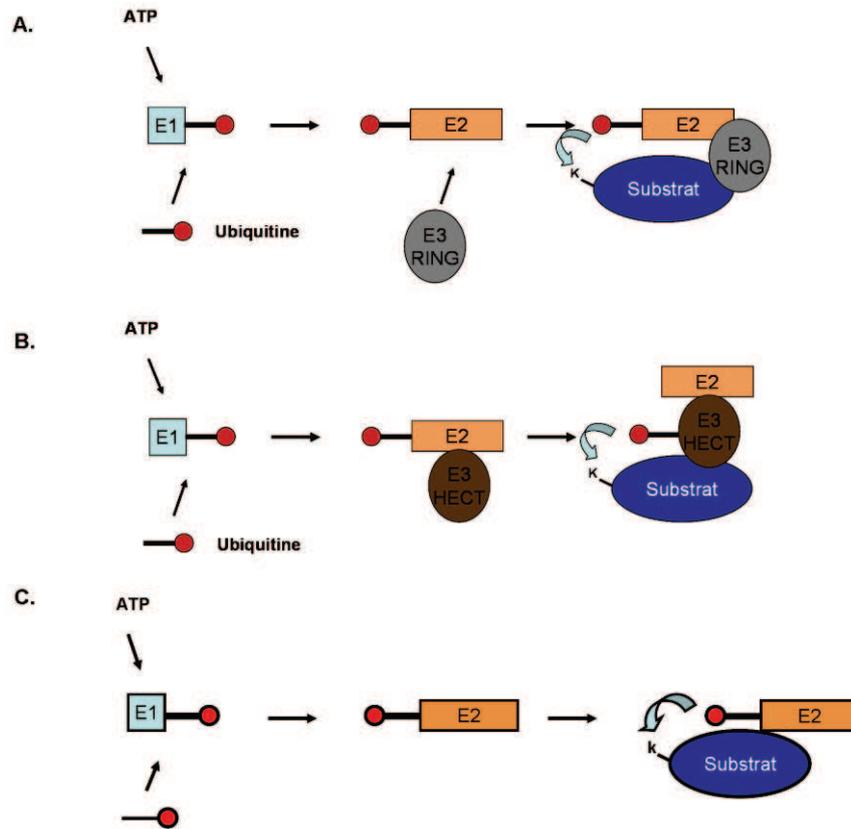


Figure 2 : Schéma de la cascade enzymatique impliquée dans l'ubiquitination. **A)** Ubiquitination directe entre l'enzyme E2 et la protéine cible, l'enzyme E3 permet le rapprochement de ces derniers. **B)** L'ubiquitine activée est transférée de l'enzyme E1 à l'enzyme E2 puis à l'enzyme E3, qui ubiquitine la protéine cible. **C)** Ubiquitination directe de la protéine par l'enzyme E2, sans interaction avec l'enzyme E3.

Il existe différents profils d'ubiquitination. Une protéine peut être :

- Monoubiquitinée, il s'agit de la fixation d'une ubiquitine sur une lysine du substrat (Figure 3A).
- Multi-monoubiquitinée, c'est lorsque la protéine cible est monoubiquitinée sur plusieurs lysines (Figure 3B).
- Polyubiquitinée, il s'agit de plusieurs molécules d'ubiquitines qui liées entre elles, forment des chaînes de polyubiquitine sur une unique lysine (ex : K63, K48) du substrat (Figure 3C).

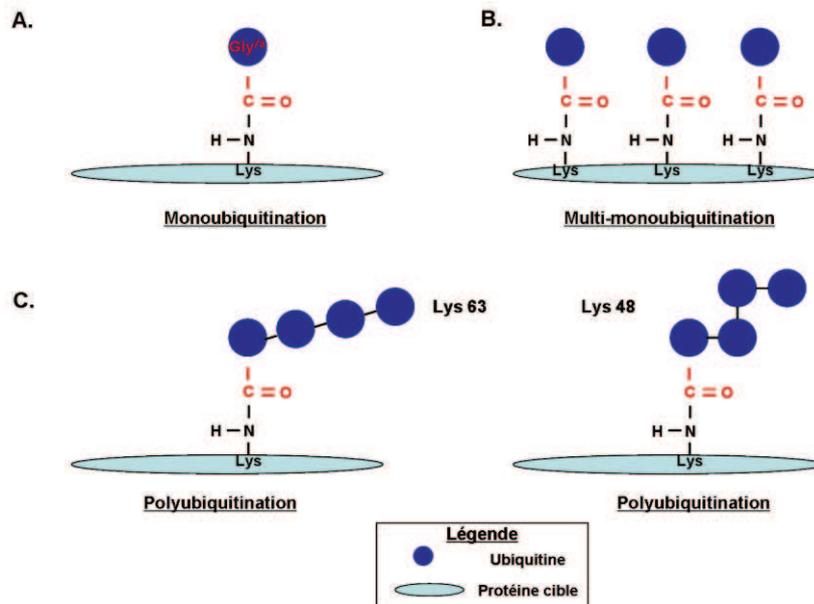


Figure 3 : Différents profils d'ubiquitination d'une protéine cible. La protéine cible peut être modifiée par la fixation : **A)** d'une ubiquitine : Monoubiquitination, **B)** de plusieurs molécules d'ubiquitine : multi-monoubiquitination, **C)** d'une chaîne de polyubiquitine, on parle alors de polyubiquitination (ici chaînes K63 et K48).

L'ubiquitine contient sept résidus lysines qui sont tous capables de former des chaînes de poly-ubiquitine (5) (Figure 4). Les chaînes de poly-ubiquitines liées via les lysines 48 et 63 sont les plus répandues. Les chaînes Lys48 servent de signal de reconnaissance pour diriger les protéines vers le protéasome (6). Les chaînes Lys63 jouent un rôle important dans les interactions avec les machineries protéiques impliquées dans l'endocytose, la réponse inflammatoire, la traduction des protéines, et la réparation de l'ADN (6).

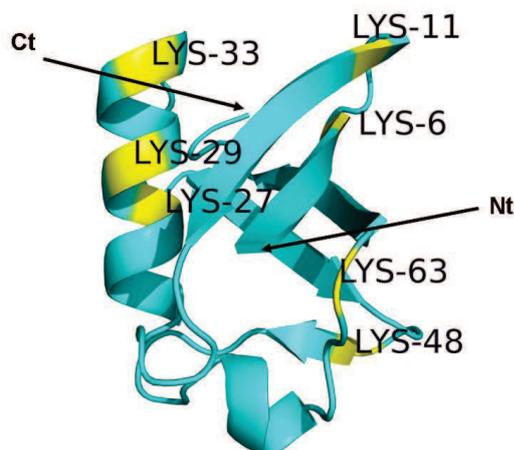


Figure 4 : Structure de l'ubiquitine (code PDB : 1UBQ). Les sept résidus lysines sont représentés en jaune.

De même, il est largement admis que la monoubiquitination est le signal moléculaire de reconnaissance dans le trafic membranaire, la régulation de machinerie d'endocytose, et éventuellement d'autres processus cellulaires (7-9). L'ubiquitination est un processus réversible. En effet, le clivage d'une ubiquitine sur les protéines et le désassemblage des chaînes de poly-ubiquitine (10) sont catalysés par des enzymes appelées enzymes de déubiquitination (DUBs) (11). Elles sont nécessaires au recyclage de l'ubiquitine, et interviennent dans la régulation de processus cellulaire tel que le tri dans l'endosome précoce (12). Les DUBs s'avèrent aussi importants que les ubiquitine ligases pour la régulation des voies de dégradation dépendantes de l'ubiquitine.

I.1.1.2. Reconnaissance des récepteurs ubiquitinés par des UBDs

Les protéines de reconnaissance à l'ubiquitine (PRUb) identifient les récepteurs ubiquitinés via leur UBDs (Ubiquitin binding domain). Les UBDs sont des domaines de protéine modulaire, capables d'interagir de façon non covalente avec l'ubiquitine. Dans la littérature, on dénombre 25 UBDs (13, 14).

UBDs	PRUb	Affinité		structure		note
		Kd (en μM)	Méthodes	Code PDB	Méthode (résolution)	
UBA	Dsk2	14,8 \pm 5,3	SPR	1WR1	RMN	UBA2 en interaction avec 2 Ub Structure d'un UBA
	hHR23A	400 \pm 100 (mono-Ub)	RMN	1ZO6	Rayon X (1,8 Å)	
	Mud1	390 \pm 50 (mono-Ub)	SPR	1Z96	RMN	
	Ede1	83 \pm 9	RMN	2G3Q	RMN	
CUE	Vps9	20 \pm 1	ITC	1P3Q	Rayon X (1,7 Å)	CUE dimérique
	Cue2	155 \pm 9	RMN	1OTR	RMN	CUE monomérique
GAT	GGA3	181 \pm 39	ITC	1YD8	Rayon X (2,8 Å)	2 sites d'interaction à l'ubiquitine; Ub se fixe sur le site 1 dans la structure cristallographique
	GGA3	409 \pm 13	SPR	1WR6	Rayon X (2,6 Å)	
	TOM1			1WRD	Rayon X (1,75 Å)	
UEV	Vps23			1UZX	Rayon X (1,85 Å)	
	Tsg101	510 \pm 35	SPR	1S1Q	Rayon X (2,0 Å)	
Ubc	UbcH5	~300	RMN	2FUH	RMN	
UIM	Vps27	277 \pm 8 (UIM 1)	RMN	1Q0W	RMN	UIM1-Ub
		177 \pm 17 (UIM 2)				
	Vps27	246 \pm 1 (UIM 1)		1O06	Rayon X (1,45 Å)	UIM2 seulement sans Ub
		1690 \pm 40 (UIM 2)				
	S5a	~350 (UIM 1)	RMN	1YX5	RMN	
	S5a	73 (UIM 2)	RMN	1YX6	RMN	
DUIM	Hrs	190 wt	SPR	2D3G	Rayon X	Interaction avec deux Ubs
MIU	Rabex-5	29 \pm 4,8 (Y25A, SPR)	SPR, ITC	2FID, 2FIF	Rayon X (2, 5 Å)	
		29 \pm 1 (Y26A, ITC)		2C7N	Rayon X (2,1 Å)	
		28,7	1Q5W	RMN		
NZF	NpI4	126 \pm 26	SPR	1Q5W	RMN	
A20 ZnF	Rabex-5	22 \pm 0,4 (A58D)	SPR	2FID, 2FIF	Rayon X (2,5 Å)	
	Rabex-5	12	ITC	2C7N	Rayon X (2,1 Å)	
ZnF UBP	Isopeptidase T	2,8	ITC	2G45	Rayon X (2,0 Å)	

Tableau 1 : Récapitulatif des données structurales et de constante d'affinité pour une sélection de 11 UBDs. Les valeurs de K_d sont obtenues à partir d'expériences RMN, de SPR (résonance plasmonique de surface) ou de ITC (calorimétrie de titration isotherme). (NB : Ub = ubiquitine (13)).

Une interaction UBD-ubiquitine n'est pas suffisante pour induire l'internalisation d'un récepteur car l'affinité est très faible (Tableau 1). Il existe plusieurs mécanismes qui permettent l'augmentation de l'avidité de l'UBDs pour l'ubiquitine (Figure 5). L'affinité représente les forces de répulsion et de liaison entre une ubiquitine et un UBD. La notion d'avidité correspond à l'ensemble des forces avec laquelle une protéine ubiquitinée interagit avec une PRUb possédant plusieurs UBDs.

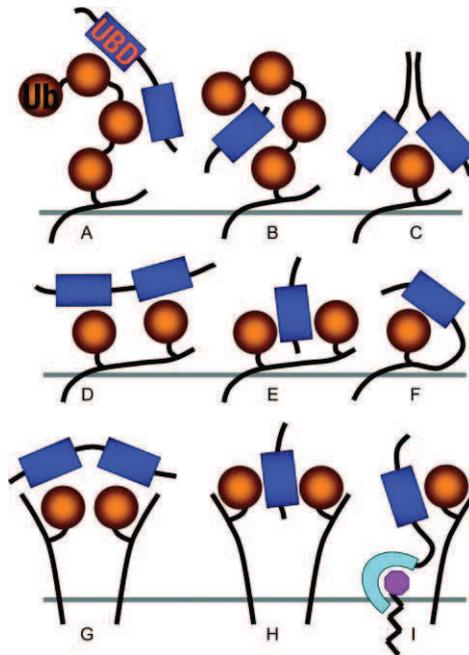


Figure 5 : Les différents mécanismes permettant une augmentation de l'avidité des UBDs pour l'ubiquitine(13) :

A- La reconnaissance d'une chaîne de poly-ubiquitine par plusieurs UBDs (15).

B- La reconnaissance d'une chaîne de poly-ubiquitine par deux surfaces différentes d'un UBD.

C- La reconnaissance d'une mono-ubiquitine par un dimère d'UBDs.

D- La reconnaissance d'une protéine multi mono-ubiquitinée par un tandem UBDs.

E- La reconnaissance d'une protéine multi mono-ubiquitinée par un UBD sur deux surfaces d'interaction différentes.

F- La reconnaissance d'une PRUb mono-ubiquitinée par son propre UBD, cette situation est observée à des fortes concentrations locales des PRUbs.

G- La reconnaissance d'un cluster de protéines mono-ubiquitinées par un tandem d'UBDs.

H- La reconnaissance d'un cluster de protéines mono-ubiquitinées par un UBD sur deux surfaces d'interaction différentes.

I- La reconnaissance d'une protéine membranaire mono-ubiquitinée par une PRUb contenant un motif d'interaction à la membrane et un UBD (16).

I.1.2. Les voies d'internalisation

I.1.2.1. L'endocytose

Chez les levures, l'ubiquitine joue un rôle important dans le trafic protéique intracellulaire. En effet, l'ubiquitine est requise pour l'internalisation et le ciblage des protéines vers les vacuoles (17, 18). La monoubiquitination des récepteurs transmembranaires est un signal suffisant pour l'internalisation, même si ce processus est accéléré avec les chaînes de polyubiquitine Lys 63. Chez les cellules animales (humaines), les récepteurs et les protéines permettant la reconnaissance de l'ubiquitine et l'invagination de la membrane plasmique peuvent être ubiquitinés (19). Cependant, les voies d'internalisation sont nombreuses et ne sont pas toutes régulées par l'ubiquitine.

I.1.2.1.1. Diversité des voies d'endocytose chez les cellules eucaryotes supérieures.

L'endocytose est un mécanisme de transport qui permet l'internalisation de molécule, ou de protéine à l'intérieur de la cellule. Il existe deux voies majeures, une en présence de manteau de clathrine et une seconde en présence de cavéoles.

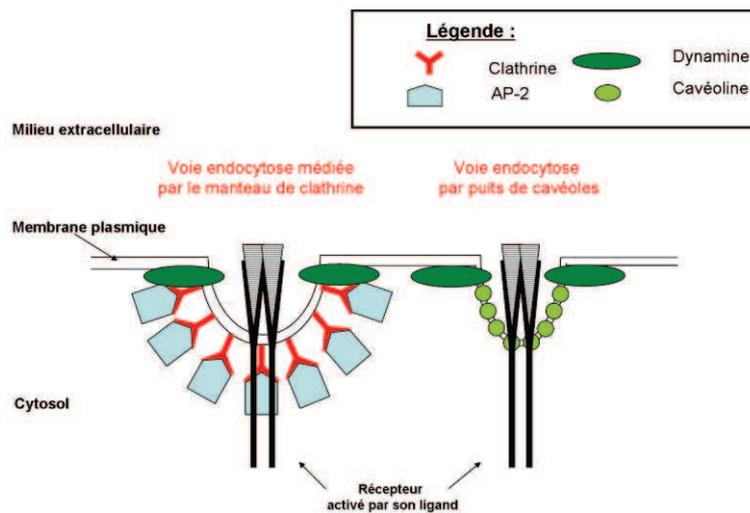


Figure 6 : Les principales voies d'endocytose chez les cellules animales.

➤ La voie d'endocytose dépendante de la clathrine est une voie importante responsable de l'internalisation de nombreuses protéines à la surface cellulaire (20). La clathrine est un hexamère constitué de trois chaînes de 192 kDa, fixant chacune une chaîne légère de 30 kDa. Cette protéine est présente sous deux formes dans la cellule : elles peuvent être libres dans le cytosol ou recouvrir la membrane sous forme de manteau (Figure 6) (21). Le manteau de clathrine recrute des protéines adaptatrices qui sont capables d'interagir et de concentrer les protéines à internaliser en des points précis de la cellule. La concentration de protéine induit la courbure de la membrane plasmique, puis l'invagination est accentuée par la présence de multiples protéines accessoires de la voie d'endocytose. La scission de la membrane est effectuée par la GTPase Dynamine (21). AP₂ est la principale protéine adaptatrice de l'endocytose médiée par manteau de clathrine. Elle est capable de recruter des acteurs de l'endocytose tels que Eps15 et l'epsine.

➤ La voie d'endocytose indépendante de la clathrine

La voie d'endocytose dépendante de la clathrine n'est pas la seule voie d'internalisation de récepteur dans les cellules animales. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'endocytose dépendante de la clathrine a permis de démontrer l'importance physiologique de différentes voies alternatives. Par exemple, Pelkmans *et al.* (22) ont étudié l'endocytose induite par les puits de cavéoles. Au microscope électronique, ceux-ci apparaissent comme des petites invaginations recouvertes par une protéine membranaire : la cavéoline (23). Cette voie d'internalisation est directement impliquée dans l'endocytose de certains composants de la membrane plasmique, tels que les protéines à ancrage GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol), de certaines toxines et de plusieurs virus enveloppés (22).

L'inhibition des voies d'endocytose dépendante de la clathrine dans des cellules dépourvues de cavéolines a permis de mettre en évidence l'existence d'autres voies d'internalisation à la membrane plasmique. Parmi elles l'endocytose via les radeaux lipidiques (micro-domaines dynamiques de la membrane plasmique riches en cholestérol et sphingolipides) des IgE (24) et des récepteurs de l'interleukine-2 (IL-2R) (25).

I.1.2.1.2. Mécanisme de l'endocytose : modèle endocytose du récepteur EGFR.

L'étude des récepteurs de la famille tyrosine kinase, a permis de comprendre le rôle de l'ubiquitine dans le trafic membranaire (internalisation et dégradation via les lysosomes). L'un des exemples les mieux caractérisés est celui du récepteur tyrosine kinase : EGFR. Les premières études basées sur une protéine chimère EGFR- ubiquitine mutée⁷ ont montré que la monoubiquitination d'EGFR est suffisant pour induire l'internalisation du récepteur dans la cellule, mais à un taux inférieur au récepteur de type sauvage qui est poly-ubiquitiné (26). Plus récemment, l'analyse par spectrométrie de masse quantitative a révélé que EGFR était à la fois mono- et poly-ubiquitiné (chaînes liées à Lys63) (27). Ces données suggèrent que, comme chez les levures, la monoubiquitination permet une internalisation mais que les chaînes de polyubiquitine Lys63 génèrent un signal d'internalisation plus efficace⁸. Dans la littérature, il a été démontré que l'internalisation du récepteur EGFR est possible même si le site de liaison de l'ubiquitine ligase Cbl est muté (27-29). Huang *et al.* suggèrent ainsi la présence de plusieurs voies d'internalisation alternatives régulées par des signaux différents (ex : phosphorylation des tyrosines du côté C-terminal du récepteur).

En fonction de la concentration en EGF, la voie d'endocytose privilégiée est soit celle par manteau de clathrine, soit celle par cavéole (28, 30) (Figure 7).

⁷ Mutation sur les sept lysines de l'ubiquitine provoquant une incapacité à créer une chaîne de poly-ubiquitine.

⁸ Peut-être en augmentant l'avidité à se lier à des protéines contenant UBD.

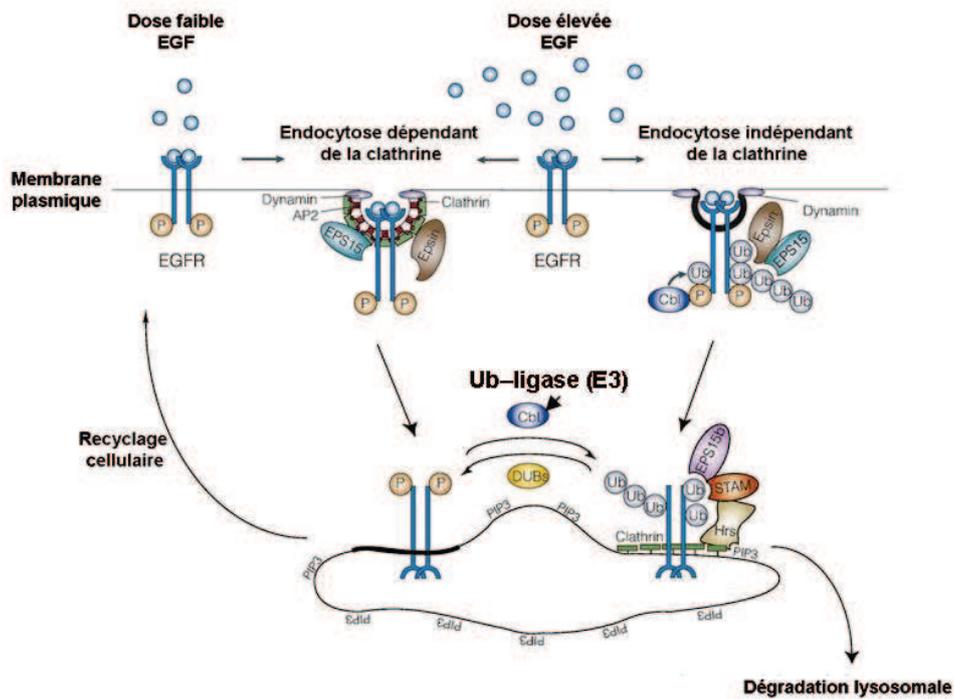


Figure 7 : Schéma du trafic membranaire des récepteurs EGFR. La première étape est un tri à la membrane plasmique, puis il y a internalisation des récepteurs selon différentes voies endocytiques selon l'effet dose (31).

A faible concentration d'EGF, les récepteurs ne sont pas ubiquitinés et ils sont internalisés par endocytose dépendante des manteaux de clathrine uniquement. A forte concentration d'EGF, les deux voies d'endocytose dépendante et indépendante des manteaux de clathrine sont mises en jeu et les récepteurs sont ubiquitinés. En effet, l'ubiquitination d'EGFR semble être nécessaire pour l'endocytose indépendante de la clathrine, tandis qu'il n'est pas indispensable pour l'internalisation dépendante de la clathrine (28). Il est probable qu'il existe un mécanisme de contrôle de l'ubiquitination du récepteur qui dépend de la dose d'EGF. La majorité des protéines ciblées vers l'endocytose dépendante du manteau de clathrine sont dirigées vers la voie de recyclage cellulaire (28). Par contre, les protéines empruntant la voie d'internalisation indépendante du manteau de clathrine sont dirigées vers la voie de dégradation lysosomale (28).

I.1.2.2. Synthèse des corps multi-vésiculaires : les complexes ESCRTs

Toutes les voies d'internalisation, dépendante ou indépendante de la clathrine, convergent vers les endosomes précoces. Dans ces organites, les protéines non ubiquitinées sont recyclées vers la membrane plasmique ou redirigées vers un autre compartiment intracellulaire. Les protéines ubiquitinées sont triées dans des vésicules intraluminales (ILVs) générant ainsi les corps multivésiculaires (MVBs) (32-34). Ceux-ci fusionnent avec les lysosomes, où les protéines sont dégradées par protéolyse enzymatique. L'ubiquitination des protéines joue un rôle très important dans l'activation de la voie de dégradation induite par la formation des MVBs.

I.1.2.2.1. ESCRTs

Les recherches sur la synthèse des MVBs ont permis la découverte chez la levure de quatre complexes protéiques appelés complexe de tri endosomal requis pour le transport : ESCRT-0, I, II, et III (35-37). La voie ESCRT est conservée chez les eucaryotes et joue un rôle identique à celui observé chez la levure dans la synthèse des MVBs (Tableau 2). Ces complexes ESCRTs jouent un rôle important dans :

- La reconnaissance des protéines ubiquitinées à la surface de l'endosome précoce,
- La biosynthèse des MVBs en provoquant l'invagination et la scission des ILVs,
- L'incorporation des protéines dans les MVBs.

Les interactions entre les ESCRTs, la membrane endosomale et les protéines cargo (protéine à dégrader = protéine ubiquitinée) sont résumées dans le Tableau 2.

ESCRT Activité	Mammifère	Motifs et domaines	Rôle biochimique
ESCRT-0 Reconnaissance des protéines ubiquitinées	Hrs	FYVE, GAT, PTAP, motif d'interaction à la clathrine (38). UBDs : DUIM (39), VHS.	-Fixation à la membrane PIP3. -Interaction avec ESCRT-I. -Reconnaissance des protéines cargo (protéine à dégrader). -Fixation à la clathrine. -Interaction avec STAMs (domaine GAT)
	STAMs : STAM 1 et STAM 2	GAT (40) UBDs : VHS et UIM (41). SH3 (42, 43)	-Interaction avec Hrs (domaine GAT) -Reconnaissance des protéines cargo. -Recrute les DUBs : AMSH et UBPY.
ESCRT-I Bourgeonnement de la membrane (interaction avec ESCRT-II)	VPS23 (TGS101)	UEV, linker riche en proline,	-Interaction avec ESCRT-0. -Reconnaissance des protéines cargo.
	VPS28	C-terminal VPS28	-Interaction avec ESCRT-II.
	VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D.	Hélice basique	-Interaction avec la membrane.
	MVB12A, MVB12B.		-Stabilise ESCRT-I. -Interaction avec l'ubiquitine.
ESCRT-II Bourgeonnement de la membrane (interaction avec ESCRT-I)	VPS22 (EAP30)	Hélice basique, WH2	-Interaction avec la membrane.
	VPS25 (EAP20)	WH2	-Interaction avec VPS20 de ESCRT-III. -Recrute ESCRT-III et l'active.
	VPS36 (EAP45)	GLUE, WH2	-Interaction avec la membrane. -Interaction avec ESCRT-I et protéines cargo.
ESCRT-III Scission de la membrane	VPS20 (CHMP6)	MIM2, myristoylation	-Initiation de l'assemblage d'ESCRT-III. -Scission de la membrane. -MIM2 interagit avec VPS4 (désassemblage ESCRT-III)
	SNF7A (CHMP4A) SNF7B (CHMP4B) SNF7C (CHMP4C)	MIM2	-Scission de la membrane.
	VSP4 (CHMP3)	MIM1	-Scission complète de la membrane. -Recrute DUB AMSH.
	VSP2A (CHMP2A) VSP2B (CHMP2B)	MIM1	-Recrute VPS4. -Initiation du désassemblage d'ESCRT-III.

Tableau 2 : Récapitulatif des composants des complexes ESCRTs chez les mammifères, et présentation des domaines et motifs ayant une fonction biologique dans la synthèse et l'incorporation des récepteurs endocytés dans les MVBs (issus de (9)).

Le mécanisme fonctionnel de cette voie n'est pas connu mais plusieurs modèles ont été proposés, à partir d'études fonctionnelles et structurales, tels que :

- Le modèle du tapis roulant : les complexes ESCRTs (ESCRT-0, -I, -II, -III) se relaient les récepteurs ubiquitinés (EGFR par exemple) grâce à leurs UBDs. La membrane formerait un bourgeon à cause de la concentration des récepteurs à un endroit précis de la membrane de l'endosome précoce (44). Le complexe ESCRT-III jouerait également un rôle dans la déubiquitination des cargos avant la formation des MVBs. Le bourgeonnement et la scission de la membrane endoplasmique sont dus à une accumulation de protéines cargos.

- Le modèle du cercle concentrique (44) : dans ce modèle les complexes ESCRT-0, I, II sont capables de reconnaître différents récepteurs ubiquitinés grâce à leurs UBDs. Cette concentration de récepteur augmente l'avidité des UBDs pour l'ubiquitine. Le recrutement du complexe ESCRT-III permet l'invagination et la scission de la membrane de l'endosome précoce pour former les MVBs. Il permet notamment la déubiquitination ainsi que le décrochage des autres ESCRTs. L'oligomérisation des complexes ESCRTs est le fondement de ce modèle (45, 46).

- Wollert & Hurley (47) ont proposé un modèle qui repose sur une reconstitution des complexes ESCRT-0, I, II marqués par des sondes fluorescentes sur des vésicules unilamellaires géantes.

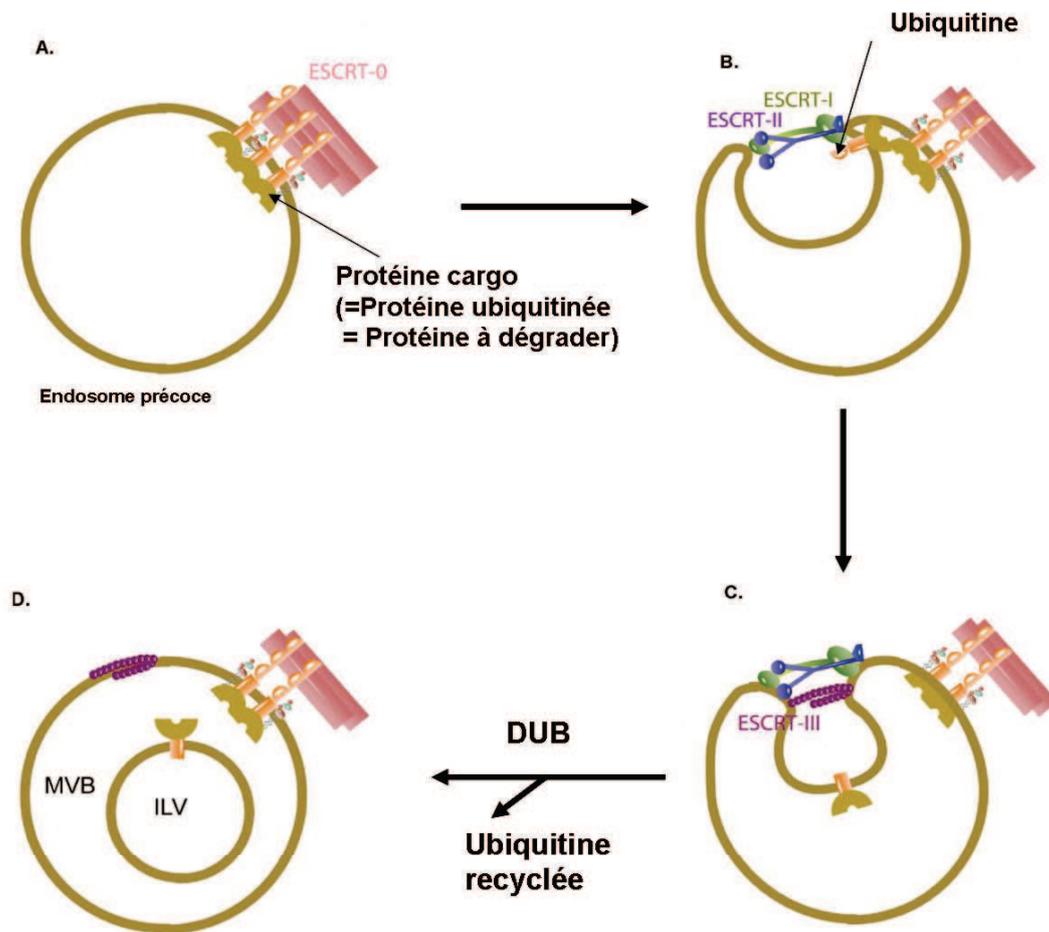


Figure 8 : Modèle du mécanisme moléculaire de la synthèse des MVBs proposé par Wollert et Hurley en 2010 (47). **A)** ESCRT-0 interagit avec les protéines cargos via ses UBDs. **B)** ESCRT-I et II interagissent avec les protéines cargos ce qui permet la libération du complexe ESCRT-0. **C)** Recrutement de ESCRT-III via ESCRT-I et II ce qui permet le processus de déubiquitination par l'action des DUBS. **D)** Obtention des ILVs contenant uniquement les protéines à dégrader.

Dans ce modèle, le complexe ESCRT-0 interagit directement avec les récepteurs ubiquitinés via ses UBDs. Les protéines cargos sont concentrées à un endroit précis de la membrane de l'endosome précoce grâce à la sous-unité Hrs du complexe ESCRT-0 (Figure 8A). Les complexes ESCRT-I et II induisent le bourgeonnement de la membrane et recrutent, via leurs UBDs, les récepteurs ubiquitinés (Figure 8B). Ces complexes recrutent également le complexe ESCRT-III qui est responsable de la déubiquitination des protéines destinées à la dégradation, en recrutant des DUBs. Par la suite ESCRT-III, localisé à la base du bourgeonnement (Figure 8C), provoque la scission de la membrane via ses sous-unités Vps20 et Snf7 (9), formant ainsi les ILVs (Figure 8D). Les ILVs contiennent uniquement la protéine, et sont dépourvues d'ESCRT.

I.1.2.2.2. Le rôle des DUBs : AMSH et UBPY dans la formation des MVBs.

Le tri des protéines membranaires destinées à la dégradation lysosomale nécessite la présence des ESCRTs et d'une étape de déubiquitination des protéines cargos effectuée par des déubiquitinases (DUBs).

Les DUBs sont des protéases qui clivent de façon spécifique l'ubiquitine. Ce sont des protéines modulaires contenant trois domaines : un domaine catalytique, un domaine d'interaction à l'ubiquitine (UBDs), et un domaine d'interaction protéine-protéine. Dans le génome humain, 100 protéines ont été définies comme ayant potentiellement une activité de déubiquitination. Elles sont classées dans cinq familles (48) : UCH (Ubiquitine C-terminal hydrolase), USP/UBP (protéase spécifique à l'ubiquitine), OTU (tumeur ovarienne), JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme), et la famille 'adenain' (protéase à cystéine telle que ULP). Les déubiquitinases interviennent dans les voies régulées par l'ubiquitine. Trois rôles importants sont identifiés :

- Synthèse d'ubiquitine libre à partir de chaîne de poly-ubiquitine (49),
- Recyclage de l'ubiquitine (50, 51),
- Régulation négative de l'ubiquitination (10).

Parmi ces DUBs, seules deux sont capables d'interagir avec le complexe ESCRT-III. Grâce à cette interaction elles sont capables d'induire le signal d'internalisation des protéines cargos ainsi que le recyclage de l'ubiquitine sur l'endosome précoce (52). Il s'agit des DUBs : AMSH et UBPY.

❖ AMSH est un membre de la famille JAMM, il s'agit d'une métalloprotéase dépendante du zinc (Figure 9). Elle est constituée d'un domaine MIT (Microtubule Interacting Domain), d'une séquence de localisation nucléaire (NLS), d'un domaine d'interaction à la clathrine (CBD), d'un motif consensus P-X-V/I-D/N-R-X-X-K-P, et d'un site catalytique (domaine JAMM). AMSH interagit avec la protéine CHMP3 du complexe ESCRT-III via son domaine MIT (42, 53). Son activité catalytique est dépendante de sa localisation sur la membrane de l'endosome précoce grâce à l'interaction de son domaine CBD (Clathrin Binding Domain) avec la chaîne lourde de la clathrine (54). Cette DUB interagit également avec le complexe ESCRT-0, plus précisément avec le domaine SH3 de la

protéine STAM2 via son motif P-X-V/I-D/N-R-X-X-K-P (différent du motif riche en proline P-X-X-P) (52) (Figure 9A). *In vitro*, AMSH clive préférentiellement les chaînes de poly-ubiquitine K63 (51, 55). La structure d'AMSH a été résolue par diffraction Rayons X (code PDB : 2ZNR) (Figure 9B).

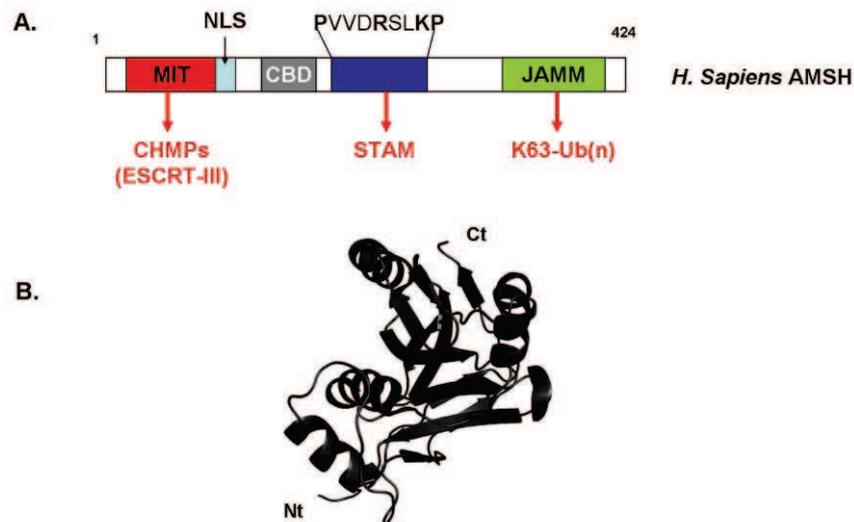


Figure 9 : **A)** Représentation schématique de la structure modulaire de la déubiquitinase AMSH et **B)** représentation en ruban de la partie C-terminale [259-436] de la structure cristallographique de AMSH-LP (humaine) (code PDB : 2ZNR, résolution de 1,2 Å) (56).

❖ UBPY, connue aussi sous le nom d'USP8, est une protéase à cystéine et appartient à la famille USP. UBPY est régulée par phosphorylation et par la fixation d'un inhibiteur (57). UBPY joue un rôle dans le contrôle de la stabilité protéique de trois protéines grâce à son activité de déubiquitination. Il s'agit des protéines Cdc25Mm (facteur d'échange de la protéine Ras spécifique du cerveau (58)), GRAIL et Ndrp1 (E3 ligases impliquées dans le processus d'endocytose (59, 60)). Comme AMSH, UBPY est aussi capable d'interagir avec STAM2 via ses motifs consensus P-X-V/I-D/N-R-X-X-K-P (Figure 10) (61). UBPY est composé de trois domaines (Figure 10A): Rhodanese-like (Rhod), DUF-1873, domaine catalytique. Le domaine Rhod est connu pour interagir avec une ubiquitine ligase Nrdp1, qui induit l'ubiquitination du récepteur ErbB3 (62). La fonction du domaine DUF-1873, localisé à l'extrémité N-terminale, n'a jamais été indentifiée. Row *et al.* suggèrent que ce domaine serait un domaine MIT capable d'interagir avec la protéine CHMP du complexe ESCRT-III (63). UBPY est spécifique via son domaine catalytique aux chaînes de poly-ubiquitine K48 et K63 (12, 55, 64). La structure d'USP8 a été résolue par diffraction Rayons X (code PDB : 3N3K) (56) (Figure 10B).

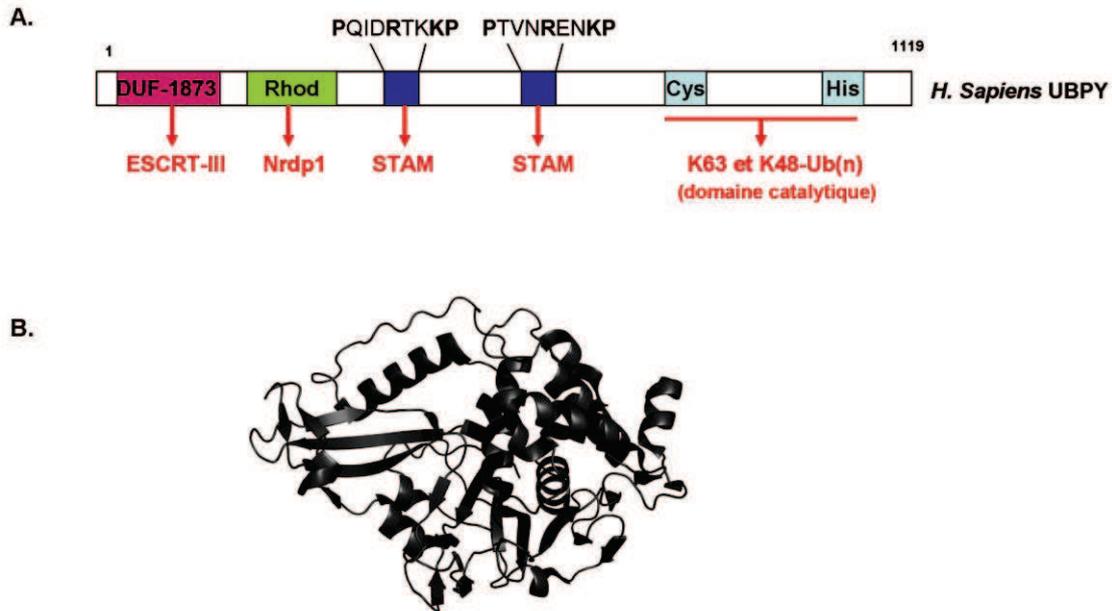


Figure 10 : **A)** Représentation schématique de la structure modulaire de la déubiquitinase UBPY. **B)** Représentation en ruban de la partie C-terminale [775-1120] d'USP8 (humaine) (code PDB : 3N3K), résolution de 2,60 Å) (56).

I.1.2.3. Régulation de la voie de dégradation lysosomale

La voie de dégradation lysosomale peut être régulée de deux façons différentes, grâce à l'activité des DUBs, AMSH et UBPY :

- Soit par contrôle du nombre de protéines capables de reconnaître les protéines cargos lors de l'endocytose et/ou au niveau du tri sur l'endosome précoce,
- Soit par contrôle de la quantité des protéines cargos dirigées vers la dégradation.

I.1.2.3.1. La mono-ubiquitination couplée

Toutes les protéines de reconnaissance à l'ubiquitine (PRUb) possédant un ou plusieurs UBD peuvent être mono-ubiquitinées, ce processus est alors appelé mono-ubiquitination couplée (65). Le domaine d'interaction à l'ubiquitine d'une PRUb n'est plus capable de reconnaître une protéine cargo car celui-ci interagit avec la molécule d'ubiquitine qui a été ajoutée. Récemment deux mécanismes moléculaires de la mono-ubiquitination couplée ont été identifiés en utilisant la protéine Eps15 comme modèle.

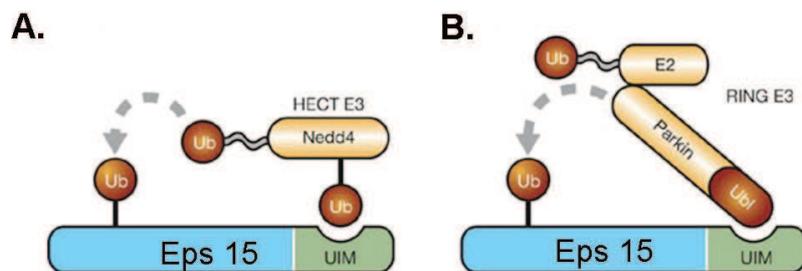


Figure 11 : Représentation schématique des deux mécanismes de la mono-ubiquitination couplée pour la protéine Eps15 directement par **A)** l'enzyme E3 (Nedd4) ou **B)** par l'enzyme E2 qui interagit avec l'enzyme E3 (66).

Le premier mécanisme décrit par la Figure 11A, montre l'existence d'une interaction entre le domaine UIM de la protéine adaptatrice Eps15 et l'enzyme ubiquitine ligase E3 HECT (Nedd4) modifiée par mono-ubiquitination. Cette enzyme E3 ubiquitinée est capable alors de transférer une seconde ubiquitine liée par une liaison thioester à son site actif vers le substrat Eps15 (67).

Le second mécanisme est décrit sur la Figure 11B : l'enzyme E3 (RING) interagit avec le domaine UIM d'Eps15 via son domaine Ubl (Ub-like), et induit le transfert de l'ubiquitine directement liée à l'enzyme E2 vers Eps15 (68).

La fonction biologique de la monoubiquitination couplée (auto-ubiquitination des récepteurs d'ubiquitine) n'est pas clairement définie. Une hypothèse serait l'auto-inhibition du récepteur d'ubiquitine, permettant une régulation de la quantité des protéines effectrices capables de promouvoir un signal (Figure 12). Ces protéines peuvent-être rapidement activées par l'effet des DUBs. La voie de dégradation lysosomale peut alors débiter.

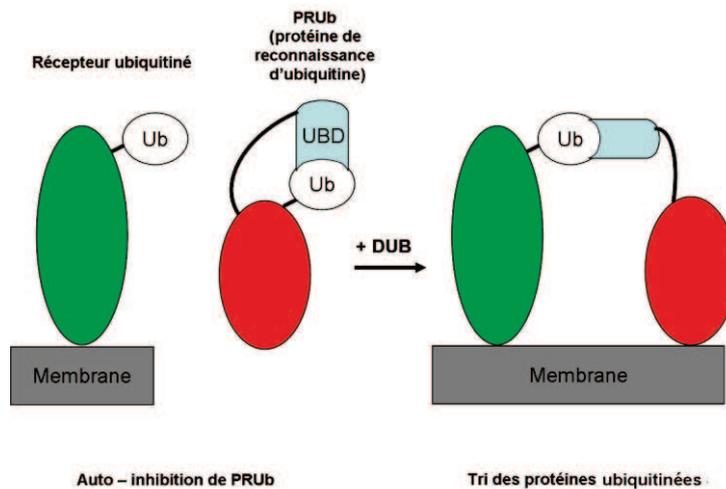


Figure 12 : Modèle de régulation des protéines modifiées par la mono-ubiquitination impliquées dans la voie de dégradation lysosomale. Si une protéine de reconnaissance à l'ubiquitine (PRUb) est mono-ubiquitinée, l'interaction avec le récepteur sera impossible. En présence de DUB, la PRUb sera déubiquitinée et pourra interagir avec le récepteur.

I.1.2.3.2. UBPY et AMSH.

AMSH et UBPY induisent l'internalisation des protéines à dégrader dans les MVBs (cf section I.1.2.2.2. page 110-112). Elles sont également impliquées dans la régulation de la voie de dégradation lysosomale grâce à leur capacité à déubiquitiner les protéines cargos avant la prise en charge par les complexes ESCRT-II et -III.

En effet, la DUB AMSH grâce à son interaction avec le domaine SH3 de STAM2 est activée puis déubiquitine les protéines cargos, qui sont dirigées par la suite dans la voie de recyclage (51). La DUB UBPY catalyse la déubiquitination des récepteurs membranaires activés par la fixation de leurs ligands directement à la surface cellulaire (69). Le récepteur n'étant plus ubiquitiné, il reste à la surface cellulaire et la transduction du signal est maintenue (70).

I.2. La protéine STAM 2

STAM 1 et STAM 2 sont deux membres de la famille STAM (Signal Transducing Adaptor Molecular), qui ont été identifiés pour la première fois respectivement en 1996 (71), et en 2000 (72). L'alignement des séquences de ces protéines indique une identité égale à 53% sur la totalité de la séquence, 71% sur les domaines VHS et UIM, 89% sur le domaine SH3 et 41% du côté C-terminal possédant un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (Figure 13). Chaque protéine est constituée de deux UBDs (Ubiquitin

binding domains), VHS (Vsp27, Hrs/STAM) et UIM (motif d'interaction à l'ubiquitine), d'un domaine SH3 (Src homology 3) et d'un domaine GAT (GGA and TOM) qui permet l'interaction avec Hrs pour former le complexe ESCRT-0. STAM 1 et STAM 2 sont ubiquitaires (71, 72), et sont impliquées dans de nombreuses voies cellulaires telles que :

- La transduction du signal intracellulaire médiée par des cytokines et des facteurs de croissance,

- La synthèse et la réparation de l'ADN,

- L'induction de myc lors de la stimulation par les interleukines 2 (IL-2) et GM-CSF,

- La dégradation lysosomale des récepteurs transmembranaires, grâce à son interaction avec Hrs. Les protéines STAM2 et Hrs forment le complexe ESCRT-0. Celui-ci est impliqué dans la reconnaissance des récepteurs ubiquitinés et dans le recrutement de la voie ESCRTs (cf section I.1.2.2.1 pages 106-109).

STAM 1 et STAM 2 ont les mêmes fonctions et interagissent avec les mêmes partenaires. La délétion par 'knock out' de ces deux protéines dans des cellules de fibroblastes, induit une inhibition de la dégradation des récepteurs EGFR (73). La délétion d'une des deux protéines n'a aucun effet sur la dégradation lysosomale. Ces informations suggèrent que ces deux protéines ont un effet compensatoire. Les protéines STAM1 et 2 peuvent être phosphorylées sur des tyrosines lors de l'activation via plusieurs cytokines (71, 72), empêchant ainsi l'interaction avec l'ubiquitine du fait de la modification de la surface d'interaction.

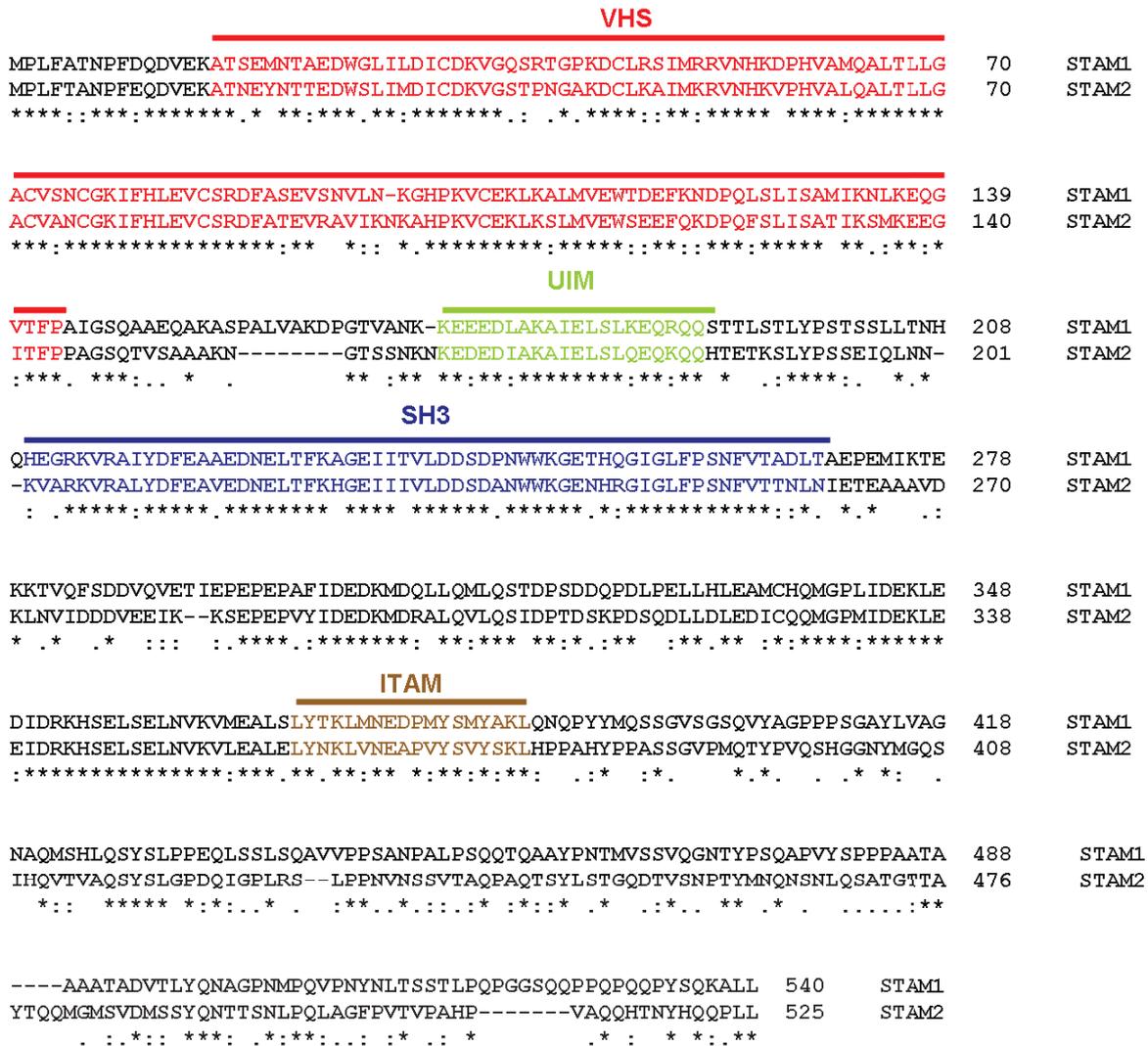


Figure 13 : Alignement des séquences de STAM1 (uniprot Q92783) et STAM2 (uniprot O75886) par ClustalW.

Notre étude repose sur les domaines UIM et SH3 de STAM 2 seuls ou en interaction avec l'ubiquitine.

1.2.1. Le domaine UIM

Le domaine UIM est un motif de vingt résidus, organisé en hélice α . Ce domaine a été identifié pour la première fois dans la sous-unité S5a (appelé aussi RPN10) du complexe 26S du protéasome (74). Ce domaine peut interagir avec l'ubiquitine (75). Le domaine UIM est identifié dans les protéines impliquées dans l'endocytose et le tri cellulaire dans l'endosome précoce (ex : Hrs, Vps27, STAM1 et 2 et Eps15). L'alignement de séquences multiples de ces protéines met en évidence une séquence consensus :

X- ψ - ψ - ψ - ψ - ϕ -X-X-Ala-X-X-X-Ser-X-X- ψ -X-X-X-X, où X représentent les résidus les moins conservés, ϕ les résidus hydrophobes et ψ représentent les résidus acides (Glu, Asp) (Figure 14).

Consensus	X$\psi$$\psi$$\psi$$\psi$$\phi$XXAXXXSXX$\psi$XXXX
S5A UIM-2	TEEEQIAYAMQMSLQGAIEFG
Vps27 UIM-2	EEDPDLKAAIQESLREAEAA
Eps15 UIM-2	QEQEDLELAIALSKEISEA
STAM1 UIM	KEEEDLAKAIELSLKEQRQQ
Vps27 UIM-1	DEEELIRKAIELSLKESRNS
Eps15 UIM-1	SEEDMIEWAKRESEREERQR
Hrs UIM	QEEEEELQLALALSQSEAEK
STAM2 UIM	KEDEDIAKAIELSLQEQRQQ
	↓ ↓ ↓ ↓ 176 179 183 186

Figure 14 : Alignement des séquences de domaine UIM de s5A (Q9VFE4), Vps27 (P40343), Eps15 (P42566), Hrs (O14964), STAM1 (Q92783), et STAM2 (O75886) par ClustalW. Sont représentés en bleu les résidus acides (Ψ), en vert les résidus hydrophobes (Φ) et en rouge les résidus fortement conservés (Ser et Ala). Les résidus sont numérotés selon la séquence Vps27.

Le domaine UIM, *in vitro*, interagit avec une affinité modeste ($K_d = 0,1- 1\text{mM}$) avec l'ubiquitine (76, 77). Le domaine UIM de Hrs est atypique, il est nommé DUIM (double motif interaction à l'ubiquitine) car il est capable d'interagir avec deux molécules d'ubiquitine (Figure 15A) avec la même affinité (39). La caractérisation des domaines UIM de Hrs, Vps27 et STAM2 par le logiciel Heliquest (logiciel disponible sur la plateforme bioinformatique Expasy ou <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (Figure 15B), a permis d'identifier les surfaces hydrophobes impliquées dans l'interaction avec l'ubiquitine. On remarque que pour le domaine UIM de Hrs il existe deux surfaces hydrophobes S-L-A-L et S-L-Q-L localisé de part et d'autre de l'hélice (Figure 15A). Dans le cas du domaine UIM-2 de Vps27 on ne trouve qu'une seule surface hydrophobe sur l'hélice α , il s'agit d'une hélice amphiphile (Figure 15B).

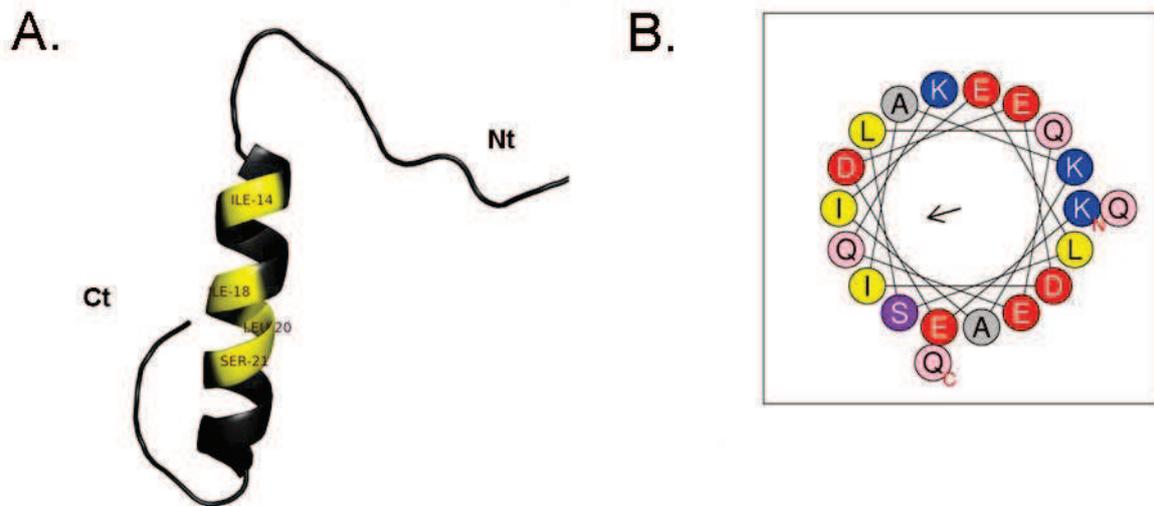


Figure 16 : **A)** Structure du domaine UIM de STAM 2 modélisée par homologie de séquence via CNS. **B)** Résultat du programme Heliquist : représentation de la surface hydrophobe sur le domaine UIM de STAM2 par une flèche. Les résidus hydrophobes sont colorés en jaune.

1.2.2. Le domaine SH3

Le domaine SH3 est un domaine d'interaction protéique présent chez de nombreuses protéines. Il a été dénombré dans la banque de données Pfam environ 2000 protéines possédant une séquence primaire et une topologie similaires à ce domaine (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Celui-ci est impliqué dans la régulation d'interactions protéine-protéine et dans de nombreux processus biologiques tels que : le recrutement des cellules immunitaires, l'endocytose, la synthèse des corps multi-vésiculaires dans la voie de dégradation lysosomale, etc. Le domaine SH3 est constitué d'environ 60 acides aminés. Les différentes structures cristallographiques ou RMN de ce domaine, indique la présence d'une hélice 3_{10} et d'un corps en tonneau β (β -barrel) constitué de cinq feuillets β connectés par trois boucles appelées RT, n-Src, et distale (Figure 17).

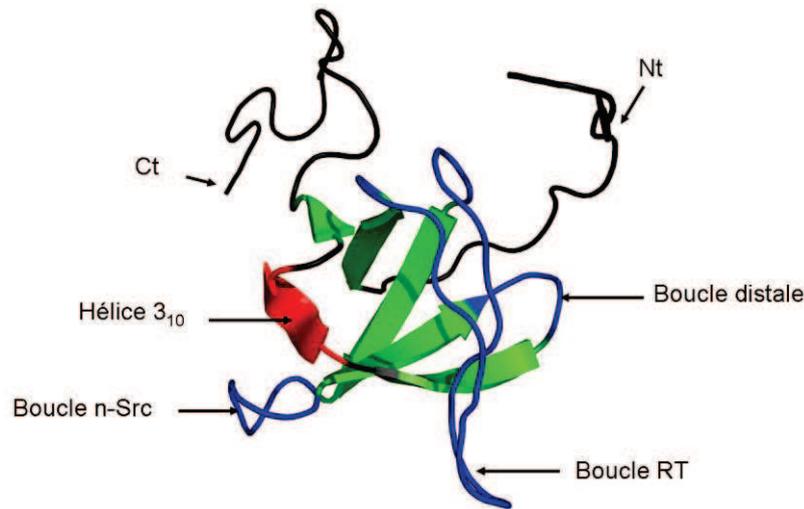


Figure 17 : Représentation de la structure du domaine SH3 de STAM2. (Code PDB : 1X2Q)

Les domaines SH3 peuvent interagir avec de nombreux motifs. Dans la littérature, les motifs riches en proline possédant un motif consensus P-X-X-P sont les plus répandus. Cependant il a été démontré récemment que certains de ces domaines pouvaient interagir avec des motifs dépourvus de proline, tels que l'ubiquitine (79).

1.2.2.1. SH3 en interaction avec les motifs riches en proline

Le domaine SH3 interagit avec des protéines possédant une séquence riche en proline (PRS) de type : P-X-X-P (affinité faible de l'ordre du μM). Il existe deux classes de motif PRS : la classe 1 P-X-X-P-X-X-R et la classe 2 X-P-X-X-P-X-R. Dans les deux cas, le ligand adopte une hélice gauche poly-proline de type 2 (PPII)(80).

Dans la littérature, il a été mis en évidence que certains domaines SH3 étaient capables d'interagir avec des ligands ne possédant pas le motif P-X-X-P. Par exemple, le domaine SH3 de Eps8 fixe un motif consensus P-X-X-D-Y (81), le domaine SH3 de Hpb interagit avec UBPY (P-X-(V/I)(D/N)R-X-X-K-P) (61), et le domaine SH3 de CIN85 fixe un motif atypique proline-arginine (P-X-X-P-R) de Cbl, une ubiquitine ligase. Cette interaction est dépendante de la phosphorylation de Cbl par EGFR, ce qui suggère une modification structurale qui expose ou stabilise le motif P-X-X-P-R (82, 83). L'ensemble de ces motifs atypiques mime une hélice PPII.

Dans tous ces cas, la surface d'interaction sur le domaine SH3 implique des résidus hydrophobes localisés dans trois poches peu profondes définies par l'hélice 3_{10} et les boucles n-Src et RT.

1.2.2.2. SH3 est un domaine en interaction avec l'ubiquitine (UBDs)

Stamenova *et al.*, ont identifié par pull-down deux protéines endocytiques Sla1 et CIN85 capable d'interagir avec l'ubiquitine et les protéines cargos via leurs domaines SH3 (79).

Sla1 est une protéine de 1244 acides aminés impliquée dans la régulation de l'actine du cytosquelette et est requise dans l'internalisation rapide des récepteurs transmembranaires (84). Elle interagit avec de nombreuses protéines endocytiques telles que l'endophiline de levure (Rvs167), la synaptojanine (Sjl2) et l'ubiquitine ligase Rsp5 (85, 86). Sla1 possède trois domaines SH3 : SH3-1, SH3-2 (résidus 1-130) séparé par un long linker acide de 223 acides aminés du domaine SH3-3 (350-420). La délétion de ce dernier domaine induit une diminution sévère de l'interaction de l'ubiquitine avec Sla1. Ce résultat suggère que le domaine SH3-3 de Sla1 est responsable de la reconnaissance de l'ubiquitine.

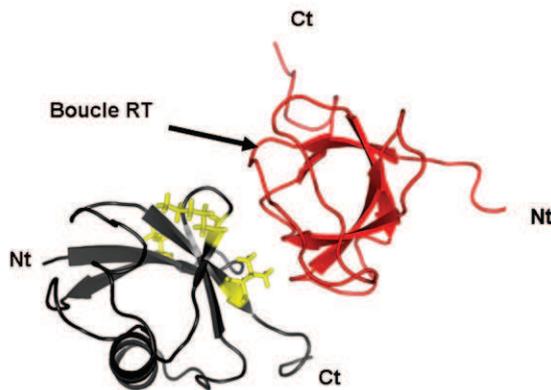
CIN85 est une protéine de 665 résidus, qui présente 35% d'identité avec la protéine Sla1 (Figure 18A). Elle est impliquée dans l'internalisation des récepteurs de facteur de croissance et interagit avec l'endophiline, Hip1R et l'ubiquitine ligase Cbl (87-89). Comme Sla1, CIN85 possède trois domaines SH3 : SH3-A, SH3-B et SH3-C. Des expériences GST pull down ont mis en évidence que ces trois domaines sont capables d'interagir avec l'ubiquitine, ce sont donc des UBDs (79).

Comment le domaine SH3 reconnaît l'ubiquitine, qui ne possède aucun motif riche en proline ou de motif atypique ?

A.

```
KSKDYCKVIFPYEAQNDELTIKGDIVTLINKDCIDVGWWEGLN--GRRGVFPDNFVKLLPP 62 CIN85
KSKKRGI VQYDFMAESQDELTIKSGDKVYILD-DKSKDWMWMCQLVDSGKSGLVPAQFIEPVRD 63 SLA1
***. * : : *.:*****.** * ::: * . .** :* *: **.* :*:: :
```

B.



C.

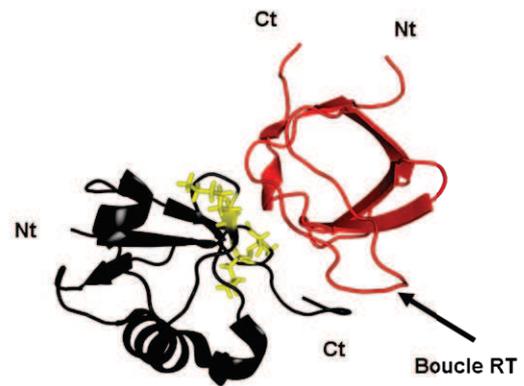


Figure 18 : Les domaines SH3-3 de Sla1 et SH3-C de CIN85 en interaction avec l'ubiquitine. **A)** Alignement de séquence des domaines SH3 de Sla1 (levure) et de CIN85 (souris) par clustalW. **B)** Structure en ruban du complexe SH3-3 (Sla1)/ubiquitine code PDB : 2JT4. **C)** Structure en ruban du complexe SH3-C (CIN85)/ubiquitine code PDB : 2K6D.

Les structures des domaines SH3-3 de Sla1 et SH3-C de CIN85 en interaction avec l'ubiquitine ont été résolues respectivement par Rayons X et par RMN (respectivement 2JT4 et 2K6D) (Figure 18B) (90, 91). Ces complexes SH3/ubiquitine ont été également caractérisés par RMN (79, 91). Les expériences de perturbation de déplacement chimique permettent d'identifier les surfaces d'interaction sur les différents partenaires et de mesurer les constantes de dissociation. Comme tous les UBDs, l'affinité du domaine SH3 pour l'ubiquitine est faible puisque le K_d est de 40 μ M pour la protéine Sla1 (90) et de 171 μ M pour CIN85 (91). Dans les deux cas, les résidus de l'ubiquitine impliqués dans l'interaction sont localisés sur le patch hydrophobe : Leu8, Ile44, Val70, et Leu73 (90, 91). Du côté des domaines SH3 de Sla1 et CIN85, les résidus impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine sont localisés sur les boucles RT, n-Src et hélice 3₁₀. De plus, une compétition entre l'ubiquitine et un motif PRS observée par RMN (CIN85- (91)) et GST pull down (Sla1-(79)) a été décrite dans la littérature.

Les mutations des résidus conservés Y362A, Q408A, F409A, F364A, W391 du domaine SH3 de Sla1, abolissent l'interaction avec l'ubiquitine (79). Ce résultat suggère que ces résidus, localisés sur l'hélice 3₁₀ et les boucles n-Src et RT, sont impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine (Figure 19B).

I.2.2.3. Le domaine SH3 de STAM2

La délétion du domaine SH3 de STAM2 provoque une régulation négative sur la synthèse d'ADN stimulée par les interleukines-2 et par les macrophages granulocytes (92), ce qui suggère que ce domaine est impliqué dans la régulation de cette voie cellulaire.

Le domaine SH3 de STAM2 est connu pour interagir avec la protéine Rin1 via un motif riche en proline (93). Cette protéine est capable de bloquer la mort cellulaire induite par Ras (94). Des études ont mis en évidence que Rin1 est recruté par EGFR via son domaine SH2 et régule la transduction du signal induite par l'activation du facteur de croissance EGF (31).

Le domaine SH3 de STAM2 interagit également avec deux déubiquitinasés UBPY (Figure 19A) (Ubiquitin specific protease Y) et AMSH (associated molecule of SH3 domaine of STAM) (43, 52, 61), au cours de la biogenèse des corps multi-vésiculaires MVBs, via leur motif consensus P-X-V/I-D/N-R-X-X-K-P (cf section I.1.2.2.2 pages 110-112). La capacité d'UBPY à cliver spécifiquement les chaînes de poly-ubiquitines K48 et K63 permet respectivement de protéger STAM2 de la dégradation protéosomale et d'internaliser les protéines cargos dans les ILVs. Par des expériences de fluorescence, l'affinité du complexe SH3-STAM2/peptide-UBPY a été estimée à ~27μM (43). Dans la littérature, il existe deux structures du domaine SH3 de STAM2 : en absence de substrat (1X2Q) et en interaction avec le peptide dérivé de la DUB UBPY (1UJ0) (Figure 19A) (43).

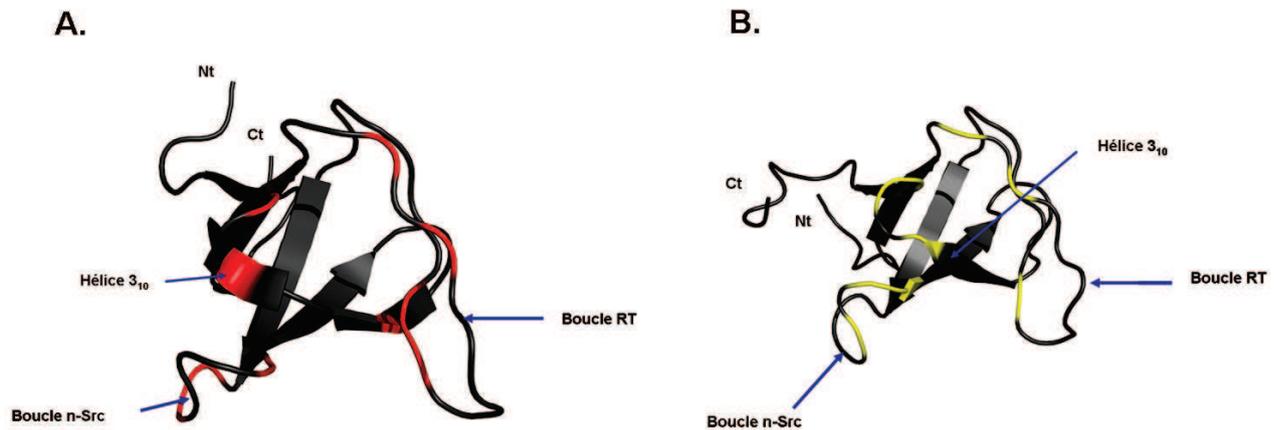


Figure 19 : Surface d'interaction du domaine SH3 de STAM2 lors de l'interaction avec **A)** UBPY en rouge (code PDB : 1UJ0- STAM2) et **B)** SH3 de Sla1 en interaction avec l'ubiquitine en jaune (code PDB : 2JT4- Sla1).

L'alignement multiple de quatorze séquences de domaines SH3 (Figure 20), met en évidence que la nature du résidu localisé en position 76 joue un rôle crucial dans l'interaction entre les domaines SH3 et l'ubiquitine (79) (Figure 20). On peut noter que les domaines SH3 de Sla1 (SH3-3), de CIN85 (SH3-A, B et C), et de l'amphiphisine1 connus pour être des UBDs (90, 91), possèdent à cette position une phénylalanine. Alors que les domaines SH3-1, SH3-2 de Sla1 et SH3-1, SH3-2 de GRB2, connus pour ne pas interagir avec l'ubiquitine, possèdent à cette position une tyrosine (Figure 20). Des études structurales indiquent que ce résidu est localisé dans le cœur hydrophobe des domaines SH3. Des études de mutagenèse sur le domaine SH3-3 de Sla1 et SH3-C de CIN85 ont démontré que le remplacement de la Phe76 (Phe409 dans la séquence primaire de Sla1 et CIN85) par une tyrosine induit un clash stérique qui abolit l'interaction SH3/ubiquitine (90, 91).

Les domaines SH3 de STAM2, et STAM1 ne sont pas connus pour être des UBDs. Or d'après l'alignement de séquence (Figure 20) ces domaines possèdent en position 76 une phénylalanine comme les domaines SH3 de CIN85. Ce résultat suggère que le domaine SH3 de STAM2 serait capable d'interagir avec l'ubiquitine. Récemment, des expériences *GST pull down* réalisées par le Dr Daniela Hoëller, à l'université de Vienne (Autriche), ont montré que le domaine SH3 de STAM2 est capable d'interagir avec l'ubiquitine (résultats non présentés ici). Afin de confirmer cette interaction, Anja Lange a réalisé, au cours de sa thèse au laboratoire, des expériences préliminaires de titration du domaine ¹⁵N-UIM-SH3 de STAM2 par l'ubiquitine. Au cours de cette étude, il a été démontré que le domaine SH3 de STAM2 est affiné pour l'ubiquitine. La constante d'affinité du complexe SH3/Ub a été estimée à (630 ± 100) μM à partir d'expériences RMN de perturbation de déplacement chimique (95).

Notre objectif est de reproduire ces résultats et de caractériser plus précisément le complexe UIM - SH3/ubiquitine par RMN, en identifiant par exemple la stoechiométrie, la nature des interactions et les surfaces d'interaction de chacun des partenaires. Enfin, une étude de compétition sur UIM-SH3 entre l'ubiquitine et UBPY, a permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes de régulation de la voie de dégradation lysosomale.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel biologique.

II.1.1. Production et purification des domaines UIM-SH3 de STAM2.

Les domaines UIM-SH3 de la protéine STAM2 (résidus 162 à 265) sont exprimés à partir d'un plasmide pETEM60, fourni par le Dr Daniela Höller. La protéine UIM-SH3 est exprimée avec un tag de fusion (His)₆-NusA du coté N-terminal. Ce Tag est éliminé au cours de la purification grâce à un site de clivage spécifique à l'enzyme TEV localisé après les tags. La séquence en acides aminés de UIM-SH3 donnée en Figure 21:

162-GAMGMNKNKEDEDIAKAIELSLQEQQQHTETKSLYPSSEIQLNNKVARKVRLALYDFEAVEDNELTFKHGE
IIIVLDDSDANWWKGENHRGIGLFPDFVTTNLNIETE-265

Figure 21 : Séquence en acides aminés de la protéine UIM-SH3. Les résidus du motif UIM sont en bleu, ceux du domaine SH3 sont en rouge, et ceux du linker en vert.

Les protocoles d'expression et de purification des protéines décrits ci-dessous ont été utilisés par Anja Lange lors de sa thèse au laboratoire (95).

II.1.1.1. Production UIM-SH3 non marquée et marquée uniformément en ¹⁵N et ou ¹³C.

Une colonie de bactéries *E. coli* BL21 (DE3) transformée par le vecteur recombinant pETEM60-UIMSH3 est introduit dans 50 mL de LB (1% bactériotryptone ; 0,5% d'extrait de levure, 1% NaCl) supplémenté de 50 µL de kanamycine (solution stock à 50 mg/mL). Cette préculture est incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation (~220 rpm).

25 mL de préculture LB est inoculée dans un litre de milieu LB dont on a ajouté 1 mL de kanamycine. Le milieu de culture est incubé à 37°C sous agitation (~220 rpm). Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,8 l'expression de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (1 mL à 1 mM). Les bactéries sont incubées à 30°C sous agitation, pendant cinq heures. Les cellules sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 25 minutes. Puis le culot bactérien est conservé à -80°C jusqu'à la purification.

Pour le marquage uniforme en ^{15}N , et ^{15}N - ^{13}C d'UIM-SH3 le protocole de production est identique au précédent (Figure 22). Seul le milieu de culture est différent, on utilise un milieu minimum M9 (KH_2PO_4 à 95,5 mM, K_2HPO_4 à 57,4 mM, K_2SO_4 à 13,8 mM, Na_2HPO_4 à 25,1 mM, pH=7,2) supplémenté par 1 mM MgSO_4 , 1mM Ca Cl_2 , 4 g/L ^{12}C -(D)-glucose, 6 $\mu\text{g/L}$ thiamine et 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ comme source d'azote. Pour le marquage ^{13}C - ^{15}N de la protéine le ^{12}C -(D)-glucose est remplacé par 4 g/L de ^{13}C -(D)-glucose. La vitesse de croissance des bactéries *E. coli* dans un milieu minimum est fortement diminuée, ainsi le temps d'obtention d'une DO_{660} de 0,8 est d'environ 8 Heures. La phase d'induction se déroule ensuite sur la nuit à une température de 21°C sous agitation, au lieu de 5 heures à 30°C.

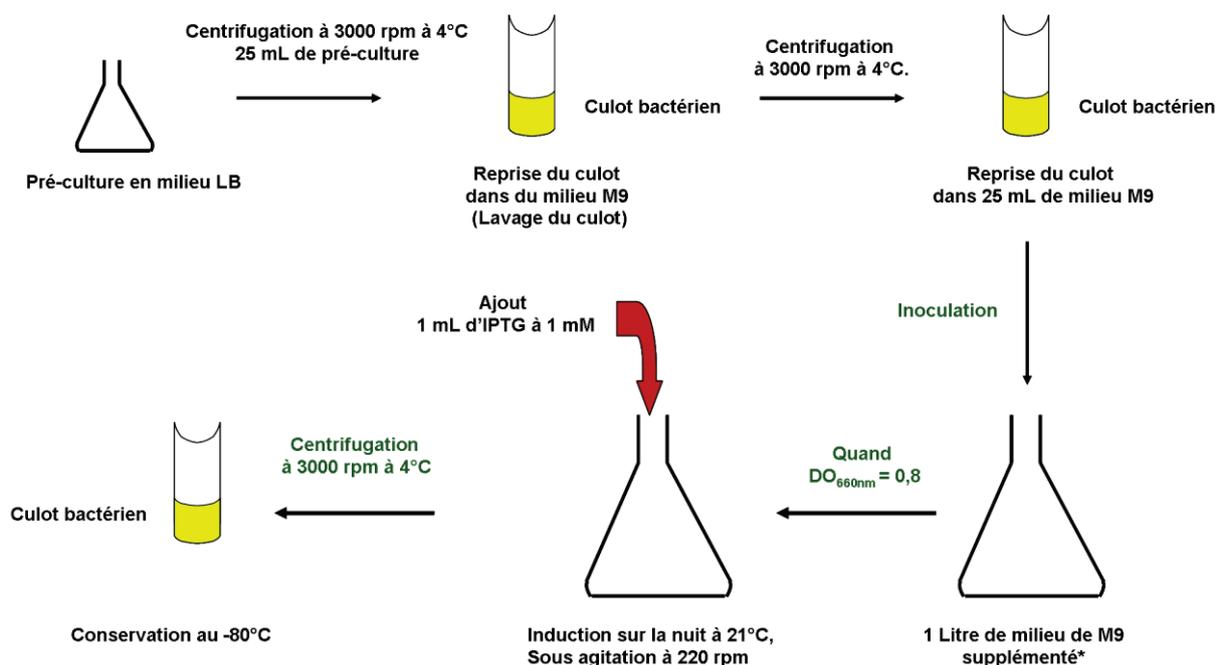


Figure 22 : Protocole de production des domaines UIM-SH3 de STAM2, marqués uniformément en ^{15}N ou ^{15}N - ^{13}C .

II.1.1.2. Purification

Le protocole de purification est identique quelque soit le marquage de la protéine. La figure 23 indique les six étapes qui permettent d'obtenir une protéine UIM-SH3 pure :

1- Lyse bactérienne : le culot bactérien correspondant à 1L de culture, est repris dans 50 mL de tampon de lyse à pH=7,2. (Tris à 50 mM, NaCl à 250 mM, 5% de glycérrol, 10mM d'imidazole) supplémenté par 1 mM de PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride = inhibiteur

de protéase à sérine et acétylcholinestérase), 2,5µg/mL de STI (Soybean Trypsin Inhibitor), et 20µL de β-mercapto-éthanol. La suspension cellulaire est ensuite soniquée, selon le programme indiqué dans la figure 23 (Sonicateur : Satorius stedim LABSONIC-P), puis centrifugée à 12000 rpm à 4°C (pour sédimenter les débris cellulaires). Le surnageant contenant notre protéine d'intérêt et les protéines bactériennes est récupéré.

2- Purification de la protéine de fusion (His)₆-NusA-site de clivage-UIMSH3 : le surnageant est introduit dans une colonne de 5 mL HisTrap FF (GE Healthcare). Cette étape permet d'éliminer les protéines bactériennes. La protéine His-NusA-UIM-SH3 est retenue sur la colonne par sa queue histidine qui possède une forte affinité pour le nickel (Ni). La protéine est lavée avec un tampon de chargement à pH=7,2 (Tris à 50 mM, NaCl à 250 mM, 1% glycérol, imidazole à 10 mM) et éluee avec un gradient croissant de tampon d'élution à pH équivalent (Tris à 50 mM, NaCl à 250 mM, 1% glycérol, Imidazole à 400 mM).

3- Clivage par l'enzyme TEV : les fractions contenant la protéine de fusion sont mises en contact avec l'enzyme TEV pendant toute la nuit à 4°C, le milieu est supplémenté avec 10 mM de β-mercapto-éthanol, 1mM d'EDTA. On obtient ainsi un mélange de protéine UIM-SH3 et de Tag (His)₆-NusA.

4- Eliminations des tags (His)₆-NusA et l'enzyme TEV : le mélange est dialysé, afin d'éliminer l'excès d'imidazole, contre 4L de tampon de dialyse (Tris/HCl 50 mM, NaCl à 250 mM, 5 mM d'imidazole) pendant une nuit, puis pendant trois heures de plus contre 2 L de tampon. Le mélange protéique (supplémenté par 10% de glycérol) est introduit dans une colonne de Ni-NTA équilibré par le tampon de lavage. Cette étape permettra de récupérer UIM-SH3 non retenue par la colonne. Les Tags et l'enzyme TEV sont élués en augmentant la concentration d'imidazole dans le tampon d'élution (Tris à 50 mM, NaCl à 250 mM, 1% glycérol, imidazole à 400 mM à pH = 7,6).

5- En cas de faible contamination d'UIM-SH3 par (His)₆-NusA la cinquième étape permet d'obtenir une protéine pure. UIM-SH3 est séparée de ses contaminants par une chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne de Sephacryl 100 16/60 (GE Healthcare).

6- UIM-SH3 dans les conditions d'étude RMN. La protéine est dialysée contre le tampon utilisé en RMN (20 mM de sodium phosphate à pH = 6,8) afin d'éliminer le sel du tampon de la colonne précédente (20 mM de sodium phosphate, 130 mM NaCl, à pH = 6,8) pendant une nuit. Ensuite la solution de protéine est concentrée par des filtres à centrifugés (marque AMICON, rejection à 3kDa, Millipore). Puis la concentration d'UIM-SH3 est estimée par un dosage de Pierce.

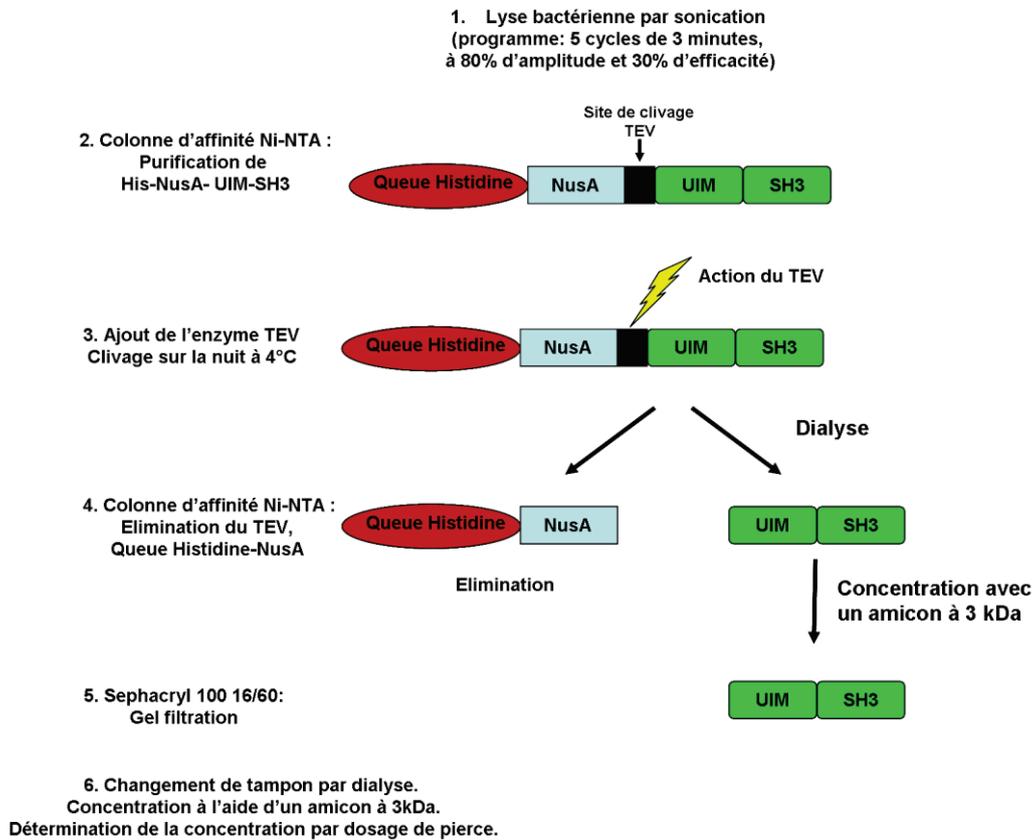


Figure 23 : Schéma du principe du protocole de purification de la protéine UIM-SH3.

La pureté de la protéine UIM-SH3 est testée par SDS page au cours de chaque étape de la purification (Figure 24).

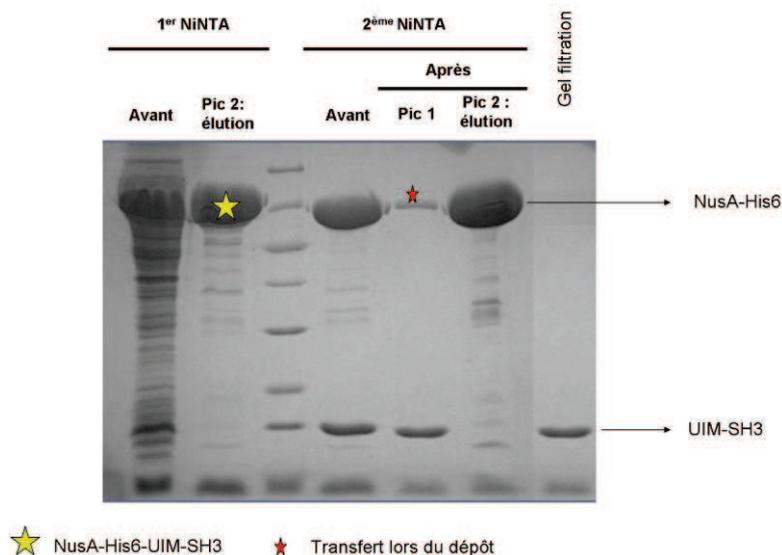


Figure 24 : Suivi de la purification de la protéine UIM-SH3 par gel dénaturant SDS.

II.1.2. Production et purification de l'enzyme de clivage TEV.

La protéine TEV est produite sous la forme d'une protéine de fusion MBP-site clivage spécifique à TEV- (His)₆-TEV, grâce à un plasmide fourni par le Dr Daniela Höller. Celui-ci est transformé dans *E. coli* BL21 (DE3). Le protocole est identique au protocole de production d'UIM-SH3 non marqué. Lorsque la DO_{660 nm} = 1, l'expression de la protéine est induite après ajout d'IPTG. L'induction se déroule sur la nuit à 20°C, sous agitation. Durant l'expression la protéine de fusion s'autoclive et libère la protéine TEV en fusion avec un tag (His)₆ en N-terminal. La purification de la protéine de fusion (His)₆-TEV est réalisée sur une colonne HisTrapFF (GE Healthcare). La protéine est ensuite conservée dans 50% de glycérol et congelée à -80°C.

II.1.3. Production et purification de Ub ¹⁴N et ¹⁵N.

Les protéines d'ubiquitine sauvage ou mutée : Ub L8AI44AD77, et Ub (K48C) sont exprimées à partir du plasmide pET2a, qui porte un gène de résistance à l'ampicilline. Ces plasmides recombinants ont été fournis par le Prof. David Fushman, de l'université du Maryland (USA).

II.1.3.1. Production d'ubiquitine sauvage ou mutée, non marquée ou uniformément marquée en ¹⁵N.

Le milieu d'expression de l'ubiquitine sauvage ou mutée est un milieu d'auto-induction (Figure 25). Pour l'ubiquitine non marquée, le milieu d'auto-induction est composé de 3,3 g de (NH₄)₂SO₄, 6,8 g de KH₂PO₄, 7,1 g de Na₂HPO₄, 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 1 mM de MgCl₂, 0,5 g de glucose, 2 g lactose et 5 g de glycérol par litre de milieu. Pour le marquage uniforme en ¹⁵N, le milieu d'auto-inhibition comprend 6,8 g de KH₂PO₄, 1,4 g de Na₂SO₄, 0,04% de citrate de fer, 1 mM de MgCl₂, 0,5 g de glucose, 2 g de lactose et 5 g de glycérol complété avec 1 g ¹⁵NH₄Cl. Au cours de la croissance bactérienne, le glucose et le glycérol sont les sources de carbone. Quand les réserves vont être épuisées, les bactéries utiliseront alors le lactose comme nouvelle source de carbone et l'expression de la protéine débutera. Les plasmides recombinants qui expriment l'ubiquitine sauvage ou mutée sont transformés dans *E. coli* BL21 (DE3). Les milieux de culture sontensemencés avec 1/10 de

volume de préculture qui a poussé pendant 6 heures. Les milieux de culture sont ensuite incubés à 37°C pendant une nuit. Les bactéries sont enfin culottées par centrifugation (3000 rpm), puis congelées à -80°C.

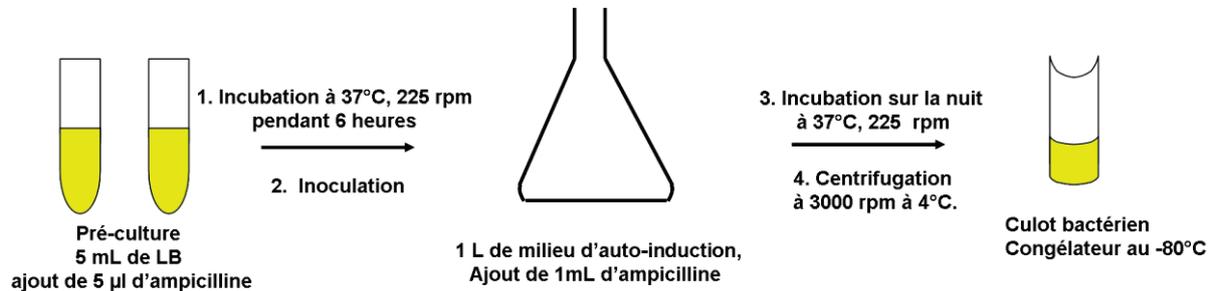


Figure 25 : Protocole de production d'ubiquitine non marquée ou marquée uniformément ^{15}N .

II.1.3.2. Purification

Les cellules récoltées sont remises en suspension dans 50 mM Tris / HCl pH 7,6, 0,02% (v / v) Triton X-100, 10 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF et des IST 2,5 µg/mL. Après sonication, le lysat est centrifugé pendant 20 minutes à 12 000 rpm (Beckman Coulter, 45Ti). Les protéines bactériennes sont précipitées par ajout de 1 à 2 % (v / v) d'acide perchlorique sous agitation continue. Par centrifugation les protéines bactériennes dénaturées sont éliminées (20 min à 12 000 rpm). Le surnageant est dialysé contre 50 mM de tampon acétate d'ammonium pH 4,5 pendant au moins 6 heures. Ensuite, le surnageant dialysé est chargé sur une colonne 5ml SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de charge (50 mM acétate d'ammonium pH 4,5). L'ubiquitine est ensuite éluée par un gradient de sel (jusqu'à 350mM). L'ubiquitine est concentrée et le tampon est échangé (20 mM de phosphate de sodium pH 6,8) à l'aide d'amicon Ultra-15 (rejection à 3kDa).

La concentration a été déterminée par l'absorbance à 280nm en utilisant le coefficient d'extinction massique de $0,16 \text{ (mg / ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.2. Méthodes RMN.

II.2.1. Méthodes générales

L'ensemble des données RMN a été enregistré à 288 K (15°C). Les échantillons sont conditionnés dans un tampon contenant 20 mM de sodium phosphate pH = 6,8, 10 % de D₂O, 0,02 % (w/v) NaN₃, et en absence ou en présence de chlorure de sodium 100mM.

II.2.2. Attribution de la protéine UIM-SH3

Pour effectuer l'attribution, la protéine UIM-SH3 est uniformément marquée en [¹³C - ¹⁵N]. La méthode d'attribution repose sur une combinaison d'expériences hétéronucléaires 3D HN(CO)CA, HNCA, HNCO et NOESY-HSQC. Le principe de chacune de ces expériences est présenté dans le chapitre Matériels et Méthodes de la CK-MM (cf chapitre 1- section II.2.3 pages 48-49).

Les paramètres d'acquisition de ces différentes expériences sont résumés dans le Tableau 4 suivant :

Echantillons	Expériences	ns	t_1 (¹ H)	t_2 (¹³ C)	t_3 (¹⁵ N)	Temps (en H)
[¹⁵ N- ¹³ C]-UIMSH3 [UIMSH3] = 1,16 mM	HN(CO)CA	20	1024	70	46	27H
	HNCA	16	1024	80	46	78H15
	HNCO	24	1024	32	46	15H50

Tableau 4 : Paramètres d'acquisition des expériences 3D pour l'enregistrement et le traitement des données (t_1 (¹H), t_2 (¹³C), t_3 (¹⁵N) sont les nombres de points dans les dimensions proton, carbone et azote respectivement ; ns = nombre de scans).

II.2.3. Etude structurale des complexes UIM-SH3/ubiquitine et UIM-SH3 / ubiquitine /peptide UBPY

II.2.3.1. Expérience de titration et analyses

Afin de caractériser les surfaces d'interaction entre UIM-SH3 et l'ubiquitine ou le peptide dérivé de UBPY, des séries d'expériences 2D ¹H-¹⁵N HSQC sont enregistrées en

marquant un partenaire en ^{15}N et en ajoutant progressivement le second partenaire non marqué.

Le peptide UBPY a été synthétisé par Covalab *via* la méthode standard Fmoc. Sa séquence en acides aminés est : TPMVNRENKPP (voir pages 111-112). Dans la littérature, il a été démontré que ce motif interagit avec le domaine SH3 de STAM2, avec une affinité de $27\mu\text{M}$ (43).

Les tableaux de concentration des différentes expériences sont présentés ci-contre (le détail des expériences se trouve en Annexe A-3 et A-4 pages 193-195):

Expériences de titration	[UIM-SH3]	[Ub] ₀	Rapport de concentration
^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine en présence de sel (100 mM)	220 μM	20 mM	[Ub]/[UIM-SH3] = 0 à 12,5
^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine en absence de sel	250 μM	4,97 mM	[Ub]/[UIM-SH3] = 0 à 12,12
^{15}N -ubiquitine/ ^{14}N - UIM-SH3 en présence de sel (100 mM)	250 μM	180 μM	[UIM-SH3]/[Ub]= 0 à 9,27
^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine [L8AI44AD77] en présence de sel (100 mM)	220 μM	20 mM	[Ub]/[UIM-SH3] = 0 à 27,18
^{15}N -UIM-SH3/ peptide UBPY en absence de sel	250 μM	1,1 mM	[Ub]/[UIM-SH3] = 0 à 6,4

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des expériences de titration sur le complexe UIM-SH3/ubiquitine. [Ub]₀: concentration de la solution mère en ubiquitine et [UIM-SH3] : concentration initiale en UIM-SH3 en absence d'ubiquitine.

Expériences de compétition	[UIM-SH3]	[peptide] ₀	[Ub] ₀	Rapport de concentration
^{15}N -UIM-SH3/peptide UBPY/ ^{14}N -ubiquitine	250 μM	1,1 mM	4,97 mM	[peptide]/[UIM-SH3] = 0 à 6,4 [Ub]/[UIM-SH3] = 0 à 2,65
^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine/peptide UBPY	220 μM	1,1 mM	4,97 Mm	[Ub]/[UIM-SH3] = 0 à 6,28 [peptide]/[UIM-SH3] = 0 à 1,40

Tableau 6 : Récapitulatif des expériences de compétition entre le peptide UBPY et l'ubiquitine sur UIM-SH3 (en absence de sel). [Ub]₀ et [peptide]₀ correspondent respectivement à la concentration de la solution mère en ubiquitine et du peptide UBPY ; et [UIM-SH3] correspond à la concentration initiale en UIM-SH3 en absence d'ubiquitine et peptide.

La perturbation de déplacement chimique ($\Delta\delta$) décrit le changement de position des résonances amide (-NH) sur le spectre HSQC en fonction de la concentration en substrat ajouté. Le $\Delta\delta$ est calculé à partir de l'équation suivante (96):

$$\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta_{IH}^2 + \Delta\delta_{ISN}^2 / 5} / \sqrt{2} \quad (1)$$

Le $\Delta\delta$ est aussi utilisé pour calculer la constante de dissociation, K_d , des complexes UIM-SH3/ubiquitine (du côté UIM-SH3 et du côté de l'ubiquitine) et UIM-SH3/peptide UBPY (du côté d'UIM-SH3). Si on considère un modèle où le motif UIM et le domaine SH3 interagissent chacun avec une molécule d'ubiquitine, le K_d est calculé à partir de cette équation:

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{LB} \left(\frac{[L_0] + [P_0] + K_d - \sqrt{([L_0] + [P_0] + K_d)^2 - 4[L_0][P_0]}}{2[P_0]} \right) \quad (2)$$

où $[P_0]$ et $[L_0]$ sont les concentrations molaires de la protéine marquée et de la protéine partenaire non marquée.

Le K_d and $\Delta\delta_{LB}$ sont ajustés par une régression non linéaire par un programme Matlab (The Math-Works, Inc). Les erreurs sont estimées à partir d'un échantillonnage comprenant 10 % d'erreur sur la concentration des protéines.

II.2.3.2. Détermination de la stœchiométrie de l'interaction : mesure des vitesses de relaxation longitudinale R_1 et transversale R_2 et mesure de paramètre nOe.

La mesure des paramètres nOe, et des vitesses de relaxation longitudinale R_1 , et transversale R_2 permettent d'obtenir des informations sur la dynamique globale d'une protéine. Ces vitesses de relaxation sont responsables du retour à l'équilibre de l'aimantation macroscopique après excitation des systèmes de spin par une ou plusieurs impulsions de champs radiofréquence. Le principe de la relaxation de spin est détaillé dans le chapitre 1 section II.2.4 pages 49-50.

Le paramètre nOe correspond au phénomène de relaxation croisée, qui se traduit par un échange d'aimantation entre deux spins en interaction dipolaire. Il peut fournir des informations de distances entre deux protons d'une biomolécule. Le paramètre nOe hétéronucléaire entre les spins ^{15}N et ^1H , dont la distance qui les sépare peut être supposée constante et connue ($r_{\text{HN}} \sim 1,01 \text{ \AA}$), ne dépend plus que du temps de corrélation effectif entre les deux spins (c'est-à-dire de l'amplitude de leur mouvement).

En pratique, la mesure du paramètre nOe se fait à l'aide de deux expériences HSQC afin de quantifier la perte du signal tout au long de la séquence et ne mesurer que la quantité de signal transféré par effet nOe. Dans la première expérience (expérience de saturation), on exerce une irradiation de quelques secondes sur les ^1H afin de créer un état stationnaire, puis on observe l'effet de cette perturbation sur l'aimantation longitudinale du spin ^{15}N . Pour la seconde expérience (expérience de référence), l'irradiation en résonance des protons est remplacée par une irradiation hors résonance afin de produire le même échauffement que dans la première expérience. Les paramètres nOe sont directement obtenus en faisant le rapport des intensités des pics de corrélation ^1H - ^{15}N issus de chaque expérience (respectivement I_{sat} et I_{ref}) :

$$nOe = \frac{I_{\text{sat}}}{I_{\text{ref}}} = \frac{I_{\text{on}}}{I_{\text{off}}} \quad (3)$$

Plus la liaison N-H est rigide, moins la perturbation des ^1H affectera la relaxation des spins ^{15}N , donc plus le nOe sera proche de 1 (I_{sat} proche de I_{ref}). Au contraire, une liaison H-N mobile se traduit par un nOe $\ll 1$ ($I_{\text{sat}} \ll I_{\text{ref}}$).

A partir des valeurs de R_1 , R_2 et nOe, il est possible de déterminer le temps de corrélation (τ_c) de la protéine étudiée grâce aux équations suivantes (97) :

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \gamma^2 \langle B^2 \rangle J(\omega_0) \quad (4)$$

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{1}{2} \gamma^2 \langle B^2 \rangle [J(\omega_0) + 3J(\omega_0)] \quad (5)$$

Lorsqu'on remplace $J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$ on obtient :

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = 2\gamma^2 \langle B^2 \rangle \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} \quad (6)$$

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \gamma^2 \langle B^2 \rangle \left[\tau_c + \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} \right] \quad (7)$$

Ainsi pour une protéine de haut poids moléculaire, dont le τ_c est faible, la vitesse de relaxation R_1 diminue, alors que la vitesse de relaxation R_2 augmente. Dans le cas d'une protéine de petite taille, avec un τ_c élevé (proche de la picoseconde), les vitesses de relaxation R_1 et R_2 augmentent car le terme $J(0)$ de l'équation 5 est négligeable (Figure 26).

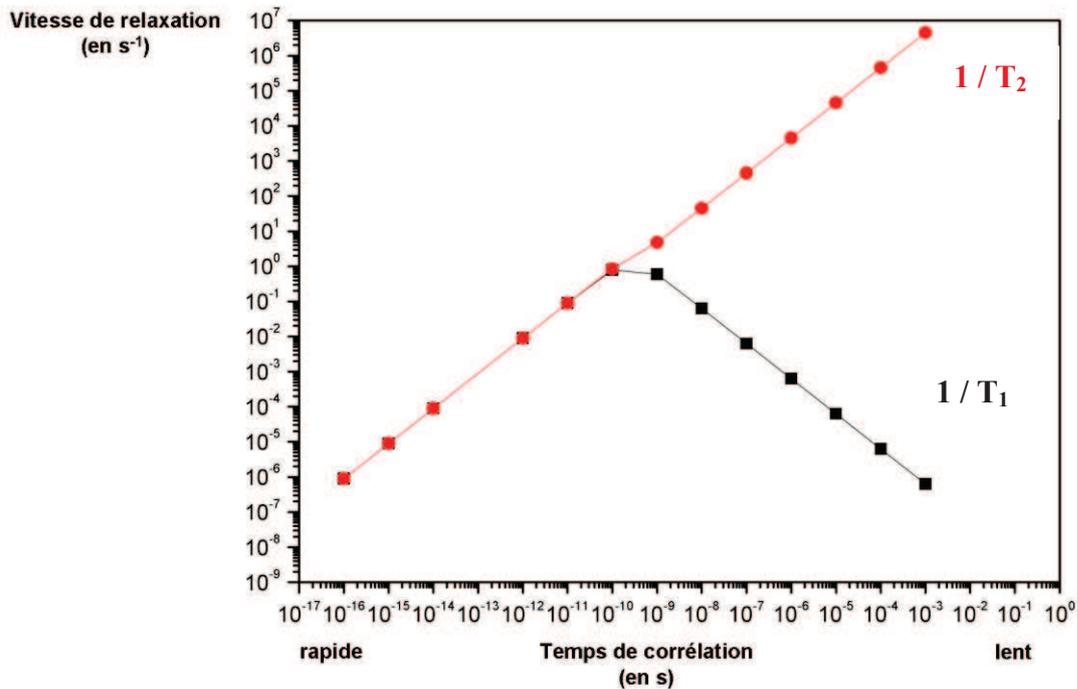


Figure 26 : Dépendance des R_1 et R_2 sur le temps de corrélation τ_c (à partir des équations 10 et 11). En utilisant $\gamma^2 \langle B^2 \rangle = 4,5 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ et $\omega_0/2\pi = 600 \text{ MHz}$. Les deux axes sont logarithmiques.

Le temps de corrélation représente le temps moyen nécessaire pour qu'une protéine évolue d'un radian dans l'espace. Pour les protéines globulaires une approximation sphérique peut être utilisée et le temps de corrélation de rotation est donné par la loi de Stokes :

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT} \quad (8)$$

où η est la viscosité du solvant, r est le rayon hydrodynamique efficace de la protéine, k est la constante de Boltzmann et T est la température. Le rayon hydrodynamique peut être estimé à partir de la masse moléculaire de la protéine (M_w) :

$$r = \sqrt[3]{\frac{3M_w \tau_c}{4\pi\eta}} \quad (10)$$

où ρ est la densité moyenne pour les protéines (1,37 g/cm³), N_a est le nombre d'Avogadro, et r_w est le rayon d'hydratation (98).

Les expériences de relaxation sont réalisées sur des échantillons uniformément marqués de ¹⁵N-Ub et ¹⁵N-UIM-SH3 seul ou en complexe avec respectivement ¹⁴N-UIM-SH3 et ¹⁴N-Ub. Des expériences ont aussi été réalisées sur le complexe ¹⁵N-UIM-SH3 / peptide / ¹⁴N-Ub ([Ub] / [UIM-SH3] = 2.65 et [peptide] / [Ub] = 1). Les différents temps de mélange utilisés sont présentés dans le Tableau suivant.

	Temps de mélange R_1 (en ms)	Temps de mélange R_2 (en ms)
[¹⁵ N]-Ub	10, 40, 80 (x2), 200, 480, 800, 1200, 1400	10, 30, 50, 90, 130, 170, 250, 310
[¹⁵ N]-Ub / [¹⁴ N]-UIM-SH3	10, 40, 120, 200, 400, 600, 1000, 1400	10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150
[¹⁵ N]-UIM-SH3	0, 100, 200, 400, 600 (x 2), 800, 1100, 1500, 1900	10, 30, 50, 70 (x2), 90, 130, 170, 210, 250
[¹⁵ N]-UIM-SH3/[¹⁴ N]-Ub	0, 100, 200, 400, 600 (x 2), 800, 1100, 1500, 1900	10, 30, 50, 70 (x2), 90, 130, 170, 210, 250
[¹⁵ N]-UIM-SH3 / peptide / [¹⁴ N]-Ub	10, 100, 300, 700, 1000	10, 30, 70, 110, 150

Tableau 7 : Paramètres d'acquisition des expériences de relaxation pour les différentes protéines seules ou complexées..

Pour les expériences R_1 et R_2 , le temps de recyclage est de 4 s. Les nOes hétéronucléaires ¹H-¹⁵N sont enregistrés en présence ou en absence de saturation en ¹H, pour les quatre échantillons. Le temps de recyclage est de 6 s.

II.2.3.3. Détermination de distance : expérience de perturbation de relaxation par paramagnétique et marquage Ub (K48C) par MTSL.

Les expériences de relaxation paramagnétique (PRE) permettent d'obtenir des informations de distance entre deux protéines. Ces expériences sont basées sur l'atténuation des résonances des noyaux de la protéine proches dans l'espace d'une sonde paramagnétique. En effet, l'électron non apparié de la sonde induit une augmentation de la vitesse de

relaxation, $\Delta R_{2\text{para}}$, et entraîne un élargissement des résonances. Cet effet est dépendant de la distance, ainsi l'atténuation du signal observé peut être utilisé comme une information structurale qui sera utilisée pour modéliser une structure. $\Delta R_{2\text{para}}$ peut être déterminée pour chaque groupement amide, grâce aux rapports d'intensité des résonances des spectres ^1H - ^{15}N HSQC enregistrés avec la sonde paramagnétique dans les états oxydé et réduit selon (99) :

$$\Delta R_{2\text{para}} = R_{2\text{ox}} - R_{2\text{red}} = \frac{I_{\text{red}}}{I_{\text{ox}}} \quad (11)$$

où t est le temps total d'expérimentation lorsque l'aimantation du proton amide est dans le plan transversal. D'après l'équation (1), il existe une relation entre $\Delta R_{2\text{para}}$ et la distance r entre les noyaux de la protéine et la sonde paramagnétique (100):

$$\Delta R_{2\text{para}} = \frac{1}{20} \left(\frac{\gamma_H^2 \mu_0^2 g_e^2 \beta_e}{r^6} \right) \quad (12)$$

$$\text{où } \Delta R_{2\text{para}} = R_{2\text{ox}} - R_{2\text{e}} \quad (13)$$

où le τ_c temps de corrélation rotationnel de la molécule, γ_H et ω_H sont respectivement la constante gyromagnétique et la fréquence de résonance du ^1H , g_e représente le facteur g électronique et β_e le rayon de Bohr. Le marquage d'une protéine par une sonde paramagnétique permet d'obtenir des informations de distances jusqu'à environ 25 Å, alors que les expériences nOe permettent de mesurer des informations de distances jusqu'à environ 5 Å seulement.

Pour notre étude nous utilisons comme espèce paramagnétique MTSL (1-oxyl-2,2,5,5,-tétra-méthyl-3-pyrroline-3-méthyl)méthanesulfonate) (Figure 27). Il est hautement spécifique pour les groupements thiols (101). MTSL est lié de manière covalente à un résidu cystéine de l'ubiquitine-K48C et de l'ubiquitine-T12C. MTSL (dissous dans l'acétonitrile) est ajouté à l'échantillon protéique (concentration supérieur à 0,5 mM) avec un ratio molaire de 3 : 1 MTSL/protéine. Le mélange est incubé à température ambiante pendant une nuit sous atmosphère dépourvue d'oxygène (Argon). L'excès de MTSL est éliminé par trois étapes d'échange de tampon 20 mM phosphate pH = 6,8 (à l'aide de membrane à centrifugée de marque AMICON, cutt off 3 kDa, Millipore).

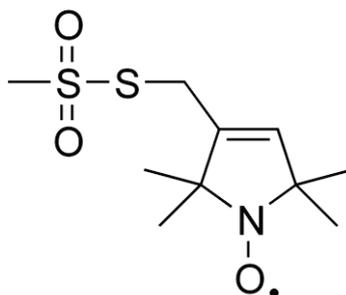


Figure 27 : Structure chimique de la sonde paramagnétique utilisé dans notre étude : MTSL.

L'atténuation du signal causé par MTSL est quantifiée à l'aide de deux expériences ^1H - ^{15}N HSQC effectuées sur la protéine marquée par l'agent paramagnétique l'une en présence de MTSL dans un état oxydé (effet paramagnétique) et l'autre lorsque MTSL est réduit par l'ajout d'une solution d'acide ascorbique trois fois plus concentrée que la concentration en MTSL.

La structure du construit UIM-SH3 n'a jamais été résolue. Cependant, des structures de protéines homologues ont été résolues. Dix modèles structuraux de la protéine UIM-SH3 ont été construits par homologie avec le logiciel MODELLER (<http://salilab.org/modeller/>). Ce logiciel permet la modélisation comparative d'une structure 3D d'une protéine à partir d'un alignement de séquence et d'une structure connue des domaines connexes (102, 103), tout en respectant les contraintes spatiales (104, 105). La structure du domaine SH3 de STAM2 sans partenaire est disponible (code PDB : 1X2Q). Le domaine UIM de STAM2 n'a jamais été résolu. Pour créer ce modèle on utilise le domaine UIM-1 de Vps27 qui présente 55% d'identité et 35% de similarité pour le domaine UIM de STAM2. L'alignement de séquence utilisé par le logiciel MODELLER pour construire le modèle UIM-SH3 est présenté par la Figure 29A et nous avons représenté un des dix modèles sur la Figure 29B.

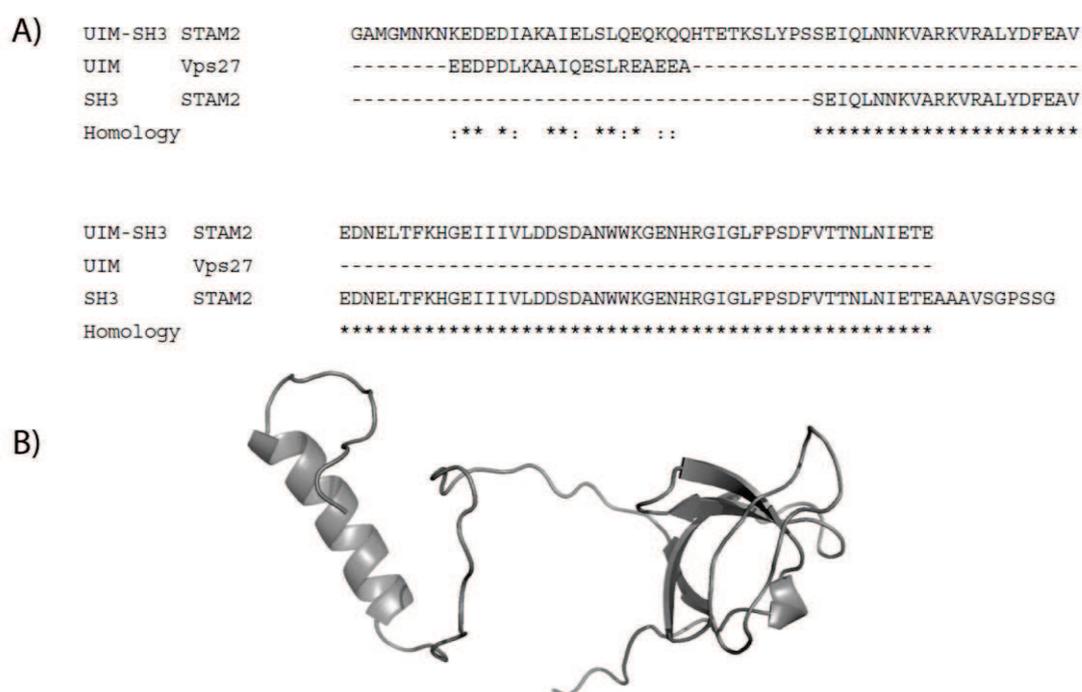


Figure 29 : **A)** Alignement multiple de séquence UIM-SH3 de STAM2, UIM de Vps27 et du domaine SH3 de STAM2. **B)** Un modèle structural parmi les dix construits de la protéine UIM-SH3 obtenu par le logiciel MODELLER.

Les expériences 3D nous ont aussi permis d'attribuer 108 $^{13}\text{C}_\alpha$ (dont 11 sont superposés) et 88 ^{13}CO (dont 4 superposés) du construit UIM-SH3. Nous avons utilisé le programme CSI afin de prédire la structure secondaire à partir des déplacements chimiques ^1H , $^{13}\text{C}_\alpha$ et ^{13}CO (106). Les résultats sont représentés en Annexe A-2 page 193 et confirment la présence d'une hélice α entre les résidus E173 et K189 du domaine UIM. Par ailleurs, les éléments de

structure secondaire rencontrés dans le domaine SH3 sont tout à fait corrélés avec la structure publiée (code PDB 1X2Q). Les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N et ^{13}C sont répertoriés dans un Tableau en Annexe A-1 pages 191-193.

III.2. Le complexe UIM-SH3/ ubiquitine

La protéine STAM2 est une protéine endocytaire modulaire constituée de deux domaines d'interaction à l'ubiquitine (domaines VHS et UIM) (95, 107) et d'un domaine d'interaction protéine-protéine (domaine SH3). Un domaine SH3 est capable de reconnaître *via* son motif WW une séquence riche en proline (PRS) ou un motif proline atypique (cf section I.2.2.1 page 120). Stamenova *et al.* ont mis en évidence que certains domaines SH3 tels que CIN85, Sla1 et Amphiphisine1 sont également capables d'interagir avec une région comprenant les résidus Leu8, Ile44, et Val70 et constituant le patch hydrophobe. L'interaction entre le domaine SH3 de STAM2 et l'ubiquitine n'a jusqu'à présent jamais été publiée. Dans la littérature, ce domaine est connu pour interagir avec une protéine Rin1 (93) et deux déubiquitinases: UBPY et AMSH (43, 52).

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sur ce complexe ont été présentés au cours de la thèse d'Anja Lange (soutenue le 15 décembre 2010). A partir d'une attribution incomplète et d'expériences de titration (^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine et ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N -UIM-SH3), une interaction entre le domaine UIM et l'ubiquitine ainsi qu'une interaction entre le domaine SH3 et l'ubiquitine avaient été montrées. Des constantes de dissociation à partir de la perturbation de déplacement chimique de résidus facilement identifiables avec les données de l'Institut RIKEN avaient été calculées. Un K_d de $260 \pm 50 \mu\text{M}$ pour le domaine UIM, et un K_d de $630 \pm 100 \mu\text{M}$ pour le domaine SH3 ont été déduits. De même, un K_d de $600 \pm 85 \mu\text{M}$ du côté de l'ubiquitine a été mesuré.

L'objectif de notre étude était de poursuivre ses travaux et de caractériser le complexe UIM-SH3 / ubiquitine par RMN à l'aide d'une attribution complète du construit UIM-SH3. Nous avons identifié les surfaces d'interaction de l'ubiquitine sur les domaines UIM et SH3 à l'aide de l'expérience de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine. La surface d'interaction sur l'ubiquitine a été identifiée à partir des expériences de titration sur le complexe ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N -UIM-SH3. Les constantes de dissociation des UBDs pour l'ubiquitine et inversement ont été déterminées à partir des perturbations de déplacement

chimique en présence et en absence de NaCl. Puis à l'aide d'expériences de relaxation R_1 et R_2 , nous avons déterminé la stoechiométrie du complexe. Enfin, afin d'améliorer notre compréhension de la fonction du domaine SH3 de STAM2, nous avons réalisé des expériences de compétition sur ^{15}N -UIM-SH3 entre l'ubiquitine et un peptide dérivé d'UBPY.

III.2.1. Caractérisation du complexe UIM-SH3/ ubiquitine.

III.2.1.1. Surface d'interaction sur la protéine UIM-SH3.

Afin de compléter les informations sur la surface d'interaction d'UIM-SH3 déterminées au cours de la thèse d'Anja Lange, nous avons analysé des expériences de titration sur ^{15}N -UIM-SH3 en présence de 100 mM de NaCl. La Figure 30 représente une superposition de spectres ^1H - ^{15}N HSQC du construit ^{15}N -UIM-SH3 en présence de concentration croissante en ^{14}N -ubiquitine.

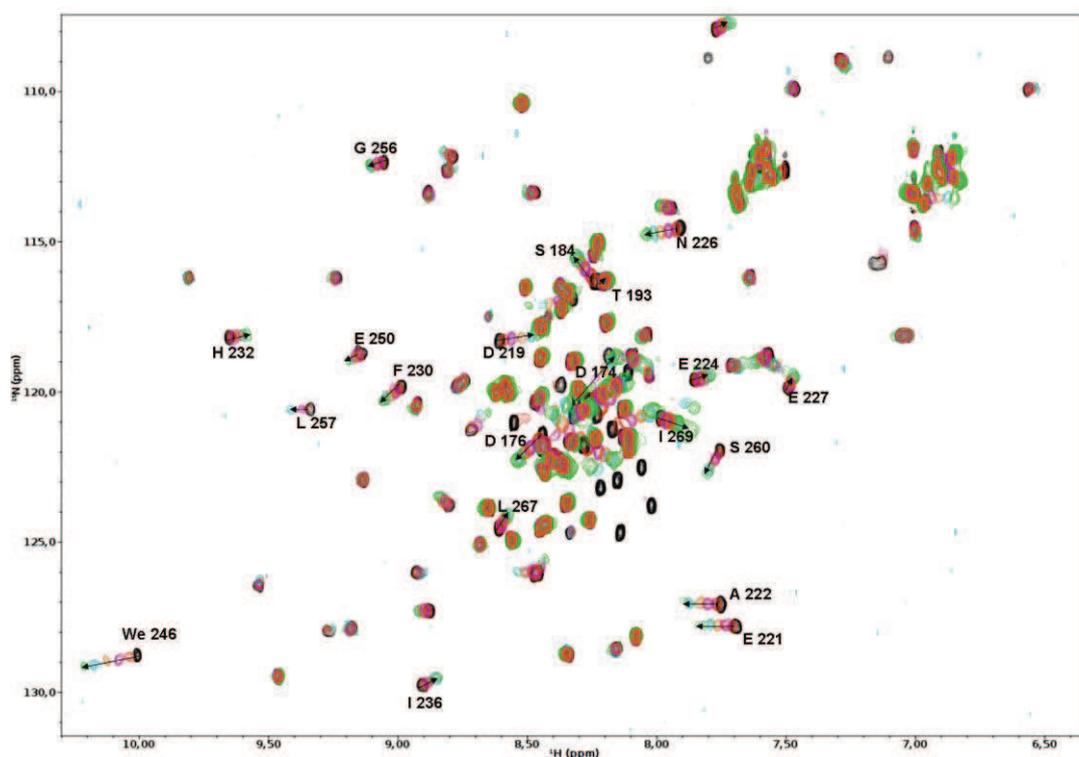


Figure 30 : Superposition de spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -UIM-SH3 titrée avec des concentrations croissantes en ubiquitine, en présence de 100 mM de NaCl. Les rapports de concentration $[\text{ubiquitine}] / [\text{UIM-SH3}]$ sont les suivantes : 0 (noir) ; 0,4 (orange) ; 0,7 (magenta) ; 1,1 (marron) ; 1,5 (turquoise) ; 3,7 (vert pâle). Les résidus qui représentent les perturbations de déplacement chimique les plus importantes sont identifiés sur le spectre par des flèches.

A partir de ces expériences de titration, nous avons calculé les variations de déplacement chimique ($\Delta\delta$) de chaque résidu du construit UIM-SH3 (équation 1 – section II.2.3.1. page 135) (Figures 31A-B). Les résidus possédant une valeur de $\Delta\delta$ supérieure à la moyenne de l'ensemble des déplacements chimiques d'UIM-SH3 c'est-à-dire 0,1 ppm sont colorés sur la structure de chaque domaine UIM et SH3 afin de visualiser la surface d'interaction avec l'ubiquitine (Figures 31D-E). Enfin, l'affinité de chaque UBD pour l'ubiquitine est calculée à partir des variations $\Delta\delta$ en fonction du rapport de concentration entre l'ubiquitine et UIM-SH3 (Figures 31B -C).

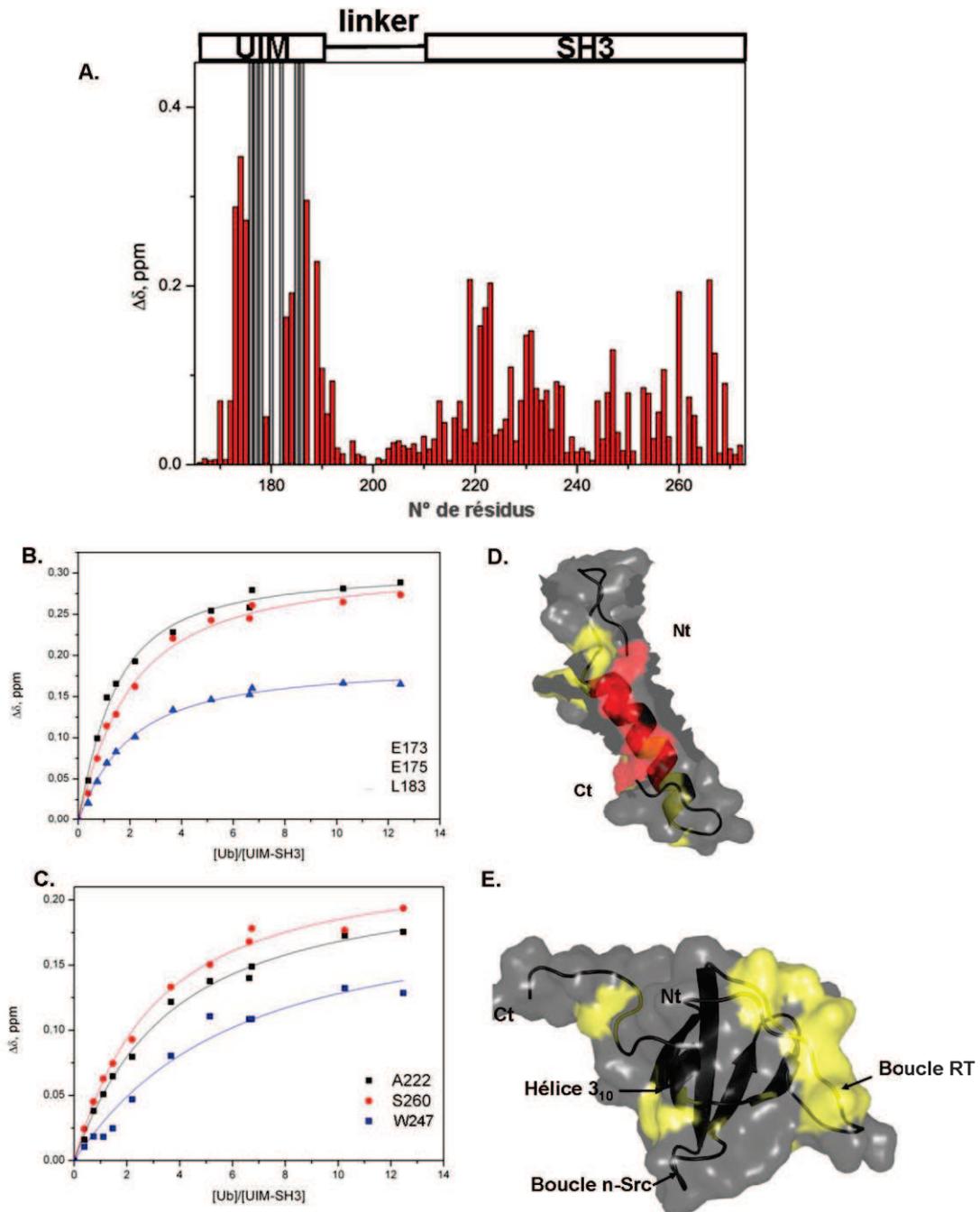


Figure 31 : **A)** Analyse des perturbations de déplacement chimique pour le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ubiquitine en présence de 100 mM NaCl. Les barres grises correspondent aux résidus qui disparaissent au premier point de la titration. **B)** Présentation des courbes de titration de certains résidus impliqués dans l'interaction du complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine du côté UIM. **C)** Présentation des courbes de titration de certains résidus impliqués dans l'interaction du complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine du côté SH3. **D)** Représentation de la surface d'interaction de l'ubiquitine sur le domaine UIM. Les résidus qui disparaissent au premier point de la titration sont représentés en rouge (= forte interaction avec Ub). Les résidus représentés en jaune sont significativement perturbés par la présence de l'ubiquitine ($\Delta\delta > 0,1$ ppm). **E)** Représentation de la surface d'interaction de l'ubiquitine sur le domaine SH3. Les résidus représentés en jaune possèdent un $\Delta\delta > 0,1$ ppm.

On observe sur le domaine UIM, une forte perturbation aux extrémités N- et C-terminales, suggérant que les résidus Asp174, Glu175, Leu183, Ser184, Glu187, Lys189, et Gln190 sont impliqués dans l'interaction. Les résonances ^1H - ^{15}N des résidus Asp176, Ile177, Ala178, Ala180, Gln182, Leu185 et Glu186 s'élargissent et disparaissent dans le bruit dès le premier point de titration (rapport $[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 0,4$) (Figure 31A). Ceux-ci sont localisés sur la surface hydrophobe de l'hélice α du domaine UIM (Figure 31D). En général, la disparition de résonances HN sur un spectre ^1H - ^{15}N HSQC peut avoir 2 origines :

- Soit les H^{N} passent en échange rapide avec l'eau, catalysé par des groupements acido – basiques à l'interface d'interaction.
- Soit ces résidus passent en échange intermédiaire. Dans ce cas la disparition serait due à un élargissement très important des résonances HN car le k_{ex} (constante d'échange) est proche de $\Delta\nu$ (différence de fréquence en Hz) (108).

Dans notre cas la disparition a lieu dès le premier point de titration. Dans ces conditions de concentration, la protéine UIM-SH3 n'est pas saturée en ubiquitine. Comme nous le verrons plus loin l'interaction entre UIM et l'Ub est de nature plutôt hydrophobe. Ainsi la disparition des résonances est probablement due à un phénomène d'échange intermédiaire.

Du côté du domaine SH3, les résidus impliqués dans l'interaction sont localisés sur les boucles RT (Asp219, Glu221, Ala222, Val223, Phe230, Lys231), n-Src (Trp247), sur l'hélice 3_{10} (Leu257, Ser260) et les résidus Asn266, Leu267, Ile269 (Figure 31E).

Les courbes de titration obtenues pour UIM-SH3 (Figure 31 B-C) indiquent que l'interaction avec l'ubiquitine se fait de manière indépendante pour les domaines UIM et SH3. Par conséquent, il est possible de traiter ces données séparément pour les domaines UIM et SH3. Ainsi la constante de dissociation du complexe UIM-SH3 / ubiquitine est calculée séparément pour chacun des domaines à partir des courbes de titration (Figure 31B et C) dans le cas d'un modèle de stœchiométrie 1 :1. En considérant les résidus du domaine SH3 (Lys209 à Glu273), on obtient un $K_d = 706 \pm 47 \mu\text{M}$. Pour le domaine UIM, on obtient un $K_d = 243 \pm 15 \mu\text{M}$.

Des expériences supplémentaires de titration sur le complexe ^{15}N - UIM-SH3/ ^{14}N - ubiquitine en absence de sel ont été enregistrées afin de déterminer s'il existe des contributions électrostatiques impliquées dans le complexe UIM-SH3 / ubiquitine en plus des interactions hydrophobes. Les résultats sont représentés sur la Figure 32.

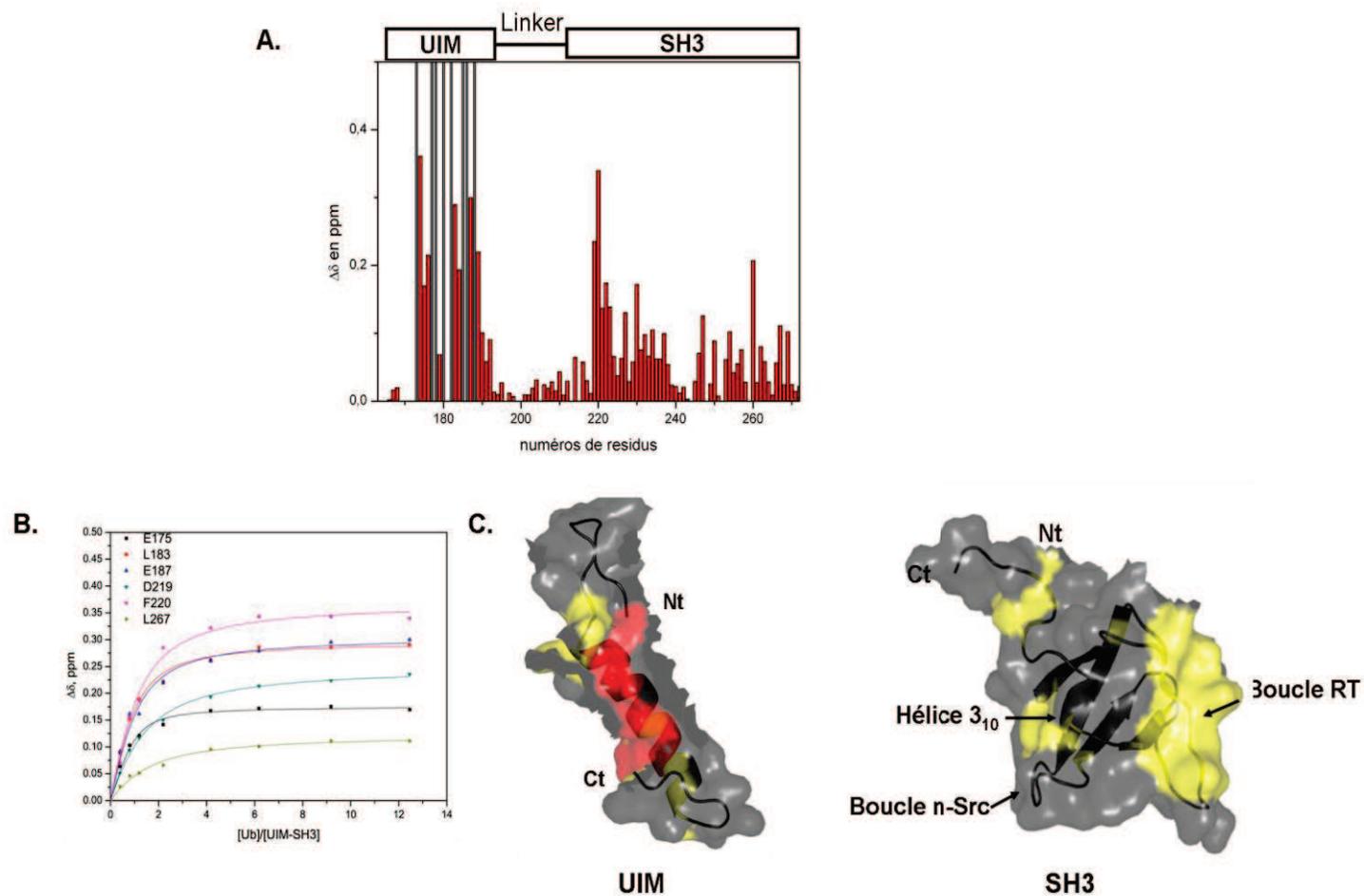


Figure 32 : A) Analyse des perturbations de déplacement chimique pour le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine en absence de NaCl. Les barres grises correspondent aux résidus qui disparaissent au premier point de la titration. B) Courbes de titration de certains résidus impliqués dans l'interaction du complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine pour chaque domaine (UIM : E175, L183 et E187; SH3 : D219, F220 et L267). C) Représentation de la surface d'interaction pour chaque domaine (jaune = résidus ayant $\Delta\delta > 0,1$ ppm; rouge = résidus qui disparaissent au 1^{er} point de la titration).

A partir de ces expériences de perturbation de déplacement chimique sur ^{15}N -UIM-SH3, on obtient un K_d de $75 \pm 10 \mu\text{M}$ pour le domaine UIM et un K_d de $251 \pm 25 \mu\text{M}$ pour le domaine SH3. En absence de sel (Figure 32A), on peut noter que la surface d'interaction sur le domaine UIM ne change pas. En effet, on observe toujours une perturbation importante des résidus Asp174, Glu175, Asp176, Leu183, Ser184, Glu187, Lys189, Gln190 localisés aux extrémités N- et C-terminales. On observe de même la disparition des résidus Asp176, Ile177, Ala178, Ala180, Gln182, Leu185 et Glu186. En ce qui concerne le domaine SH3, on observe une forte perturbation des résidus des boucles RT (Asp219, Phe220, Glu221, Ala222, Val223, Glu227, Phe230, Glu234), n-Src (Trp247), de l'hélice 3_{10} (Gly254, Ser260) et enfin des résidus Leu267, et Ile269. Ces derniers sont localisés à l'extrémité C-terminale d'UIM-SH3 à l'opposé de la surface d'interaction sur le domaine SH3 : c'est-à-dire l'hélice 3_{10} , les boucles n-Src et RT. Les expériences de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub sans sel indiquent également que trois résidus de l'extrémité C-terminale d'UIM-SH3 sont perturbés par l'ajout d'ubiquitine, il s'agit des résidus : Asn266, Leu267, et Ile269. Il existe plusieurs explications possibles :

- Soit ces résidus sont perturbés par une seconde ubiquitine. Cette hypothèse repose sur les variations de déplacements chimiques de ces résidus observés (expérience CSP) après chaque ajout d'ubiquitine.
- Soit les résidus du domaine SH3 sont perturbés par l'hélice α du domaine UIM. Cette hypothèse repose sur le fait qu'il existe plusieurs conformations des domaines UIM et SH3 du fait de la flexibilité du linker (cf les expériences nOe dont les résultats sont présentés plus loin en section III.2.2 page 157).

Les expériences de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub en absence et en présence de sel, suggèrent que l'interaction entre UIM-SH3 et l'ubiquitine fait intervenir des liaisons électrostatiques et hydrophobes. Ces contributions électrostatiques sont probablement impliquées dans le positionnement de l'ubiquitine sur les UBDs. Des expériences de perturbation de déplacement chimique sur un mutant du domaine UIM de Hrs indiquent que les résidus chargés localisés à l'extrémité C-terminale de l'hélice sont impliqués dans l'interaction, et plus précisément dans le positionnement correct de l'ubiquitine sur UIM (76). La structure SH3-3 de Sla1 et SH3-C de CIN85 en interaction avec l'ubiquitine a été résolue par cristallographie (respectivement code PDB : 2JT4 et 2K6D). L'analyse de ces structures par le logiciel PDBsum suggère que ces complexes sont stabilisés par des liaisons hydrogènes

inter-moléculaires et des contacts hydrophobes. Un récapitulatif des interactions est présenté dans le Tableau 9.

	2JT4		2K6D	
	SH3-3 (Sla1)	Ubiquitine	SH3-C (CIN85)	Ubiquitine
Résidus impliqués	13	10	15	16
Interaction hydrophobe	53		107	
Liaison hydrogène	4		2	
Surface d'interaction (Å ²)	595	594	788	842

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes stabilisant le complexe SH3 / ubiquitine pour Sla1 et CIN85.

Les protéines CIN85 et Sla1 sont impliquées dans la voie de dégradation lysosomale des récepteurs membranaires ubiquitinés et possèdent un ou plusieurs domaines SH3 capables d'interagir avec l'ubiquitine (79, 90, 91). Les valeurs de constante de dissociation trouvées dans la littérature pour les domaines SH3 de CIN85, Sla1 sont comparées à nos résultats dans le tableau 8. On remarque que, comme les autres UBDs, les affinités de ces domaines SH3 sont de l'ordre de la centaine de μM (14).

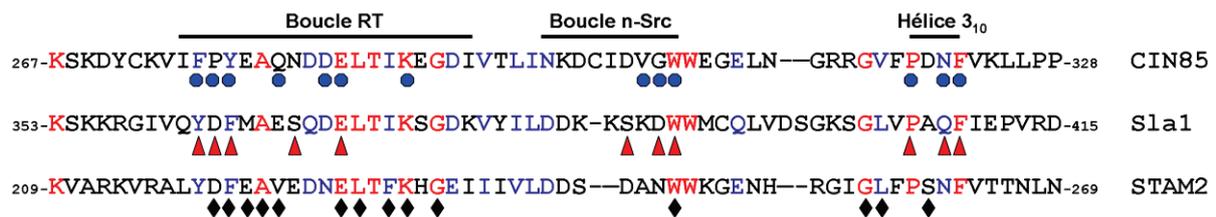
	SH3-3 de Sla1	SH3 de CIN85	SH3 de STAM2
K_d (en μM) complexe SH3/ubiquitine	39 \pm 9 (du coté de l'ubiquitine)	500 \pm 18 (SH3-A) 1150 \pm 120 (SH3-B) 171 \pm 7 (SH3-C)	250 \pm 25 (0 mM NaCl) 706 \pm 47 (100 mM NaCl)
Méthodes	RMN- expérience CSP	RMN- expérience CSP	RMN- expérience CSP
Conditions de mesure			
Tampon	20 mM phosphate	50mM phosphate	20mM phosphate
pH	pH = 6	pH = 6,4	pH = 6,8
[NaCl] en mM	0	150	0 et 100
Références	(79)	(91)	Notre étude

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des constantes de dissociation du complexe SH3/ubiquitine pour différents domaines. La méthode utilisée pour mesurer le K_d apparent de chaque complexe SH3 / Ub est l'expérience de perturbation de déplacement chimique (CSP : Chemical Shift Perturbation)

Les résidus des domaines SH3 de Sla1, CIN85 et STAM2 impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine sont localisés principalement sur l'hélice 3₁₀, et les boucles RT et n-Src (Figure 33B). L'alignement multiple de séquences, présenté en Figure 33A, indique que les

domaines SH3-C de CIN85, SH3-3 de Sla1 et SH3 de STAM2 présentent 50% d'identité. On note également que les résidus impliqués dans cette interaction sont relativement bien conservés (Figure 33A). La Phe262 de la protéine STAM2 (= Phe76 - voir page 125) est conservée dans la structure primaire des protéines Sla1 et CIN85 (Figure 33A). Les expériences de titration sur le construit UIM-SH3 en présence d'ubiquitine (voir page 147-149 en présence et en absence de sel), mettent en évidence que ce résidu n'est pas directement impliqué dans l'interaction avec l'ubiquitine ($\Delta\delta < 0,1$ ppm). En effet, seul le résidu Ser260 de l'hélice 3₁₀ présente un $\Delta\delta > 0,1$ ppm. Toutefois la mutation de la F409Y sur le domaine SH3 de Sla1 et CIN85 abolit l'interaction SH3/Ub (90, 91) en induisant un clash stérique. Afin de comprendre le rôle de la Phe262 de STAM2 il serait intéressant de réaliser un mutant de STAM2 sur ce résidu.

A.



B.

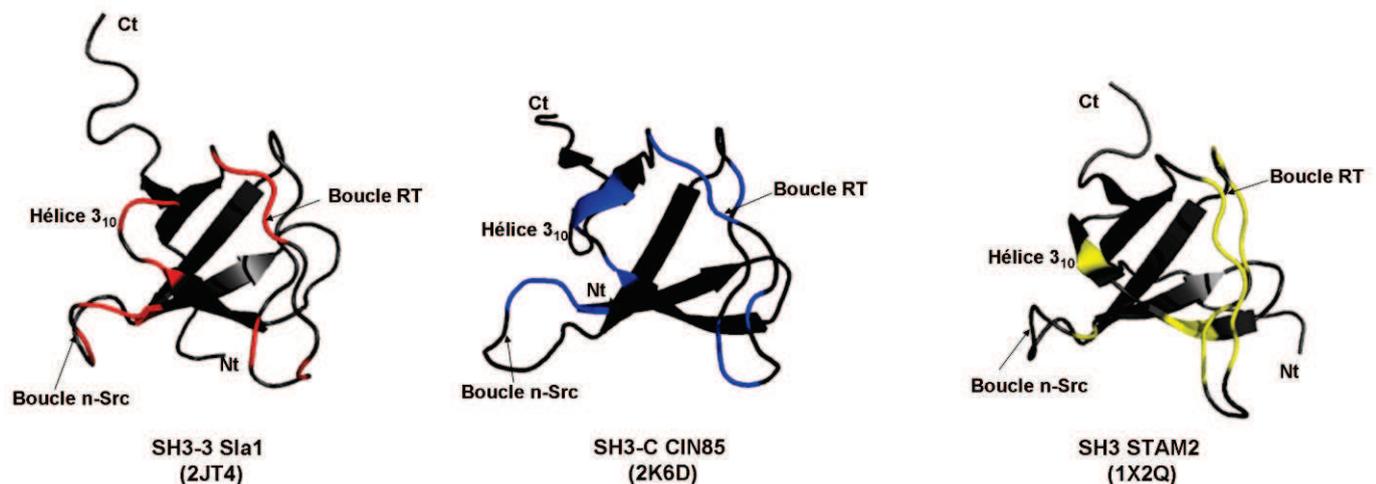


Figure 33 : La surface d'interaction sur le domaine SH3 implique des résidus hydrophobes des boucles RT, n-Src et de l'hélice 3₁₀. **A)** Alignement multiple de séquences des domaines SH3 des protéines STAM2 (humain), CIN85 (souris) et Sla1 (levure). Les cercles bleus, les triangles rouges, et les losanges noirs représentent les résidus du domaine SH3-C de CIN85, SH3-3 de Sla1 et SH3 de STAM2 respectivement impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine (données cristallographiques 2K6D pour CIN85 et 2JT4 pour Sla1, et données CSP pour STAM2). **B)** Représentation des résidus des domaines SH3, de Sla1 (indiqués en rouge)- CIN85 (indiqués en bleu) et STAM2 (colorés en jaune), impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine.

III.2.1.2. Surface d'interaction sur l'ubiquitine.

L'ubiquitine ne possède ni motif riche en proline (P-X-X-P) ni motif atypique tel que R-X-X-K répertorié comme étant des régions d'interaction avec le domaine SH3. Stamenova *et al.* ont identifié le patch hydrophobe (Leu 8, Ile44, Val 70) comme constituant de la surface d'interaction de l'ubiquitine sur le domaine SH3 (Sla1 et CIN85) (79).

La surface d'interaction sur l'ubiquitine est-elle identique ou différente pour les deux UBDs UIM et SH3 ?

La surface d'interaction sur l'ubiquitine est déterminée à partir des expériences de titration sur le complexe ^{15}N -Ub / ^{14}N -UIM-SH3 en présence de 100 mM NaCl. La figure 34A indique la présence d'une seule surface d'interaction composée de 14 résidus : Thr7, Leu8, Gln41, Arg42, Ile44, Phe45, Gly47, Lys48, Gln49, Leu50, leu69, Val70, Leu71, Arg72 (ayant des valeurs de $\Delta\delta > 0,1$ ppm). Ces résidus forment un patch hydrophobe autour des résidus Leu8, Ile44 et Val70 (Figure 34C). Dans la littérature, il a été démontré que de nombreux UBDs tels que VHS, DUIM, et les domaines SH3-C (CIN85) et SH3-3 (Sla1) étaient capables d'interagir avec l'ubiquitine sur cette même surface hydrophobe (76, 82, 91). Nos résultats nous permettent de conclure que l'ubiquitine interagit avec la même surface hydrophobe pour chaque domaine UIM et SH3. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que nous avons un complexe UIM-SH3 / ubiquitine de stoechiométrie 1 : 2. Cette hypothèse sera effectivement vérifiée par des expériences de relaxation exposées dans la suite de ce chapitre.

A partir de cette expérience de titration sur le complexe ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N -UIM-SH3, il est impossible de déterminer la constante de dissociation de chaque ubiquitine sur chacun des domaines UIM et SH3. En effet, une seule surface pour deux sites d'interaction est observée. Ainsi nous avons calculé un K_d macroscopique de $335 \pm 30 \mu\text{M}$, en présence de 100 mM de NaCl, à partir des courbes de titration (Figure 34B).

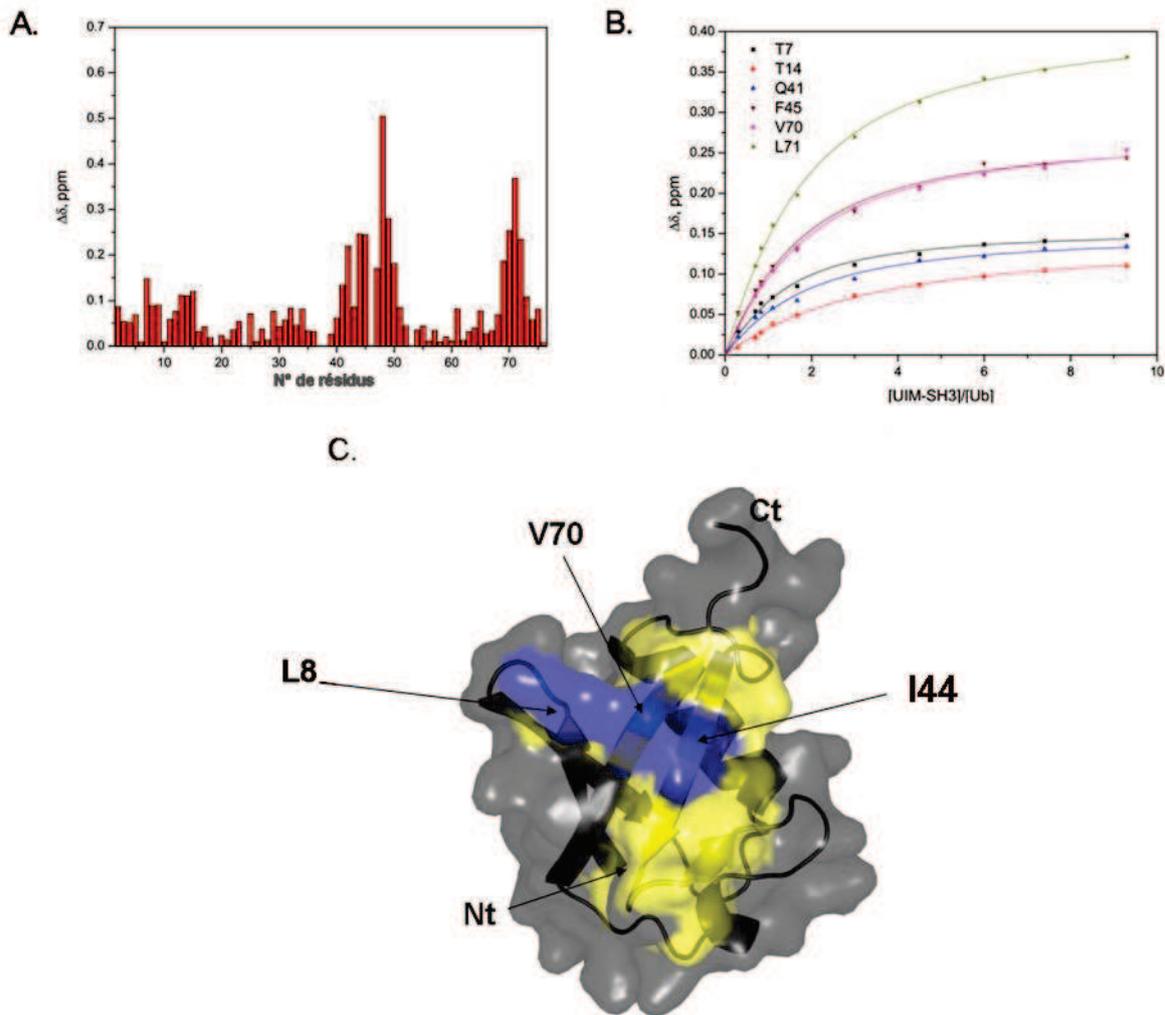


Figure 34: **A)** Analyse des perturbations de déplacement chimique pour le complexe ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N -UIM-SH3 en présence de 100 mM de NaCl. **B)** Courbes de titration de certains résidus impliqués dans l'interaction du complexe ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N -UIM-SH3. **C)** Représentation de la surface d'interaction de l'ubiquitine : les résidus impliqués dans l'interaction sont représentés en jaune. Les trois résidus hydrophobes formant le patch hydrophobe de l'ubiquitine sont représentés en bleu.

De manière à confirmer l'implication des résidus Leu8, et Ile44 dans l'interaction, nous avons enregistré une expérience de perturbation de déplacement chimique sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub mutée ([L8A-I44A]-Ub) en présence de 100mM de NaCl. La figure 35 représente les perturbations de déplacement chimique sur UIM-SH3 en présence de l'ubiquitine mutée. Nous n'observons plus de "disparition" de résidus du domaine UIM qui étaient en échange intermédiaire, ce résultat est une première indication sur l'interaction moins forte de ce mutant d'ubiquitine avec UIM-SH3. De plus nous n'observons aucun $\Delta\delta$ significatif sur le motif UIM ou sur le domaine SH3 (Figure 35). Ce résultat confirme que le patch hydrophobe de l'ubiquitine est essentiel pour l'interaction avec les UBDs, UIM et SH3.

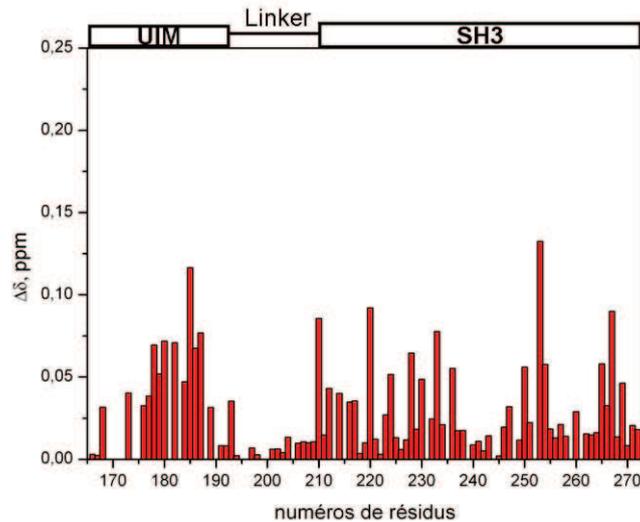


Figure 35 : Analyse des perturbations de déplacement chimique pour le complexe $[^{15}\text{N}]$ -UIM-SH3 / $[^{14}\text{N}]$ - [L8A-I44A]-Ub en présence de 100 mM de NaCl.

Nous avons calculé, à l'aide du logiciel Pymol, les potentiels électrostatiques représentés sous forme de surface pour l'ubiquitine et les domaines UIM et SH3. La structure de UIM utilisée ici est celle que nous avons modélisée par MODELLER (cf section III.1 pages 142). Sur le domaine UIM les résidus hydrophobes (I177, A178, A180, L183, S184, L185, Q186, Q188, Q190) interagissent avec le patch hydrophobe de l'ubiquitine (L8, I44, V70) (Figure 36A-C). Les résidus chargés négativement (E173, D174, D176, E182, E187) peuvent stabiliser le complexe en se plaçant en face de résidus chargés positivement de l'ubiquitine (R42, K48, R72). La surface électrostatique et les données de titration indiquent que le modèle du complexe UIM / Ub pourrait adopter la même conformation que le complexe publié UIM-Vps27 / Ub (code PDB : 1Q0V) (109).

Pour le domaine SH3, les résidus qui interagissent avec l'ubiquitine sont majoritairement hydrophobes sauf le résidu D219 chargé négativement. Ce dernier peut interagir avec des résidus chargés positivement sur l'ubiquitine (Figure 36 B-C).

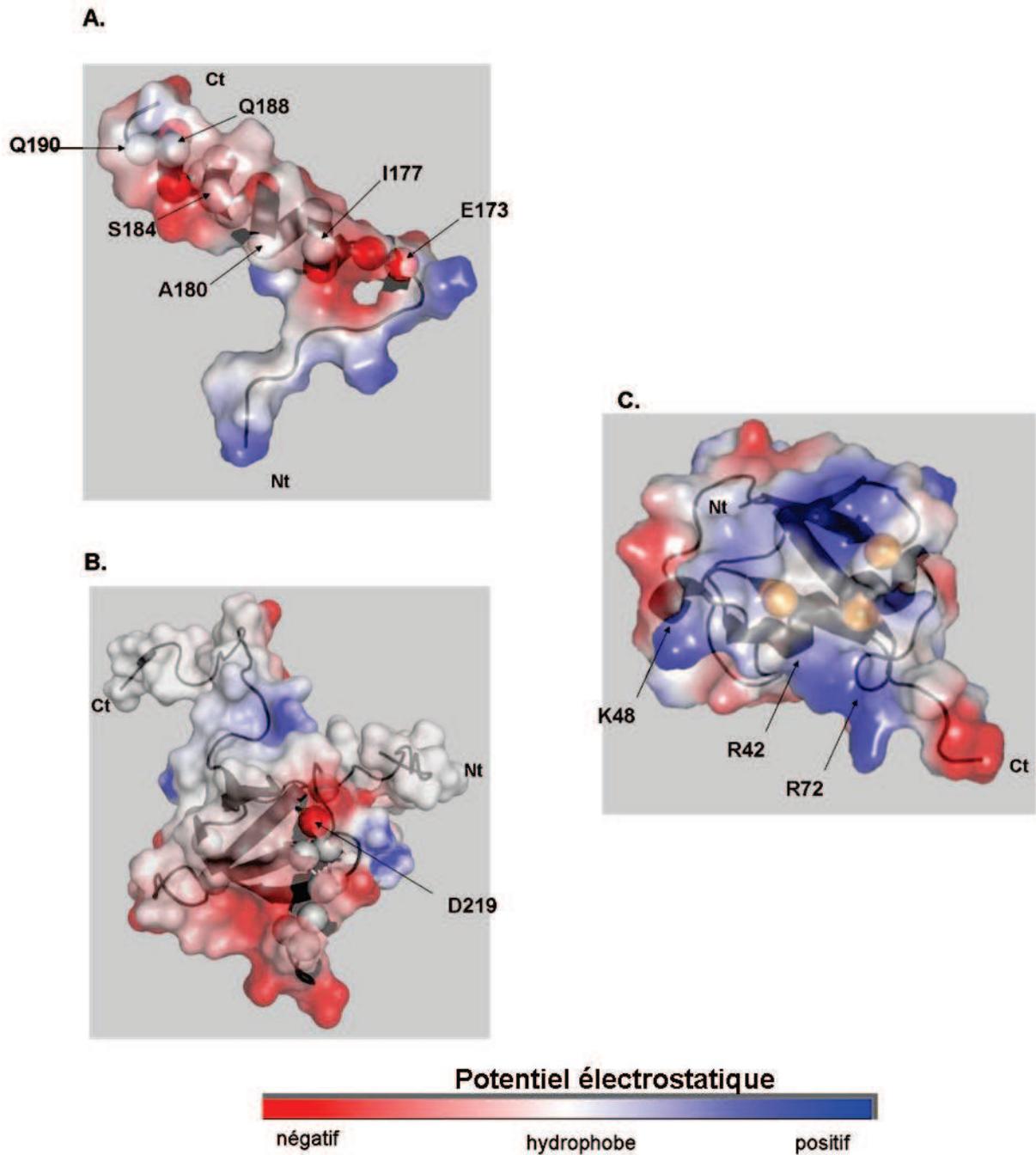


Figure 36 : Représentation de la surface électrostatique des domaines UIM (A) et SH3 (B) de STAM2, à partir du modèle construit par MODELLER. C) Représentation de la surface électrostatique de l'ubiquitine (Code PDB : IUBQ). Les résidus hydrophobes sont représentés par des sphères blanches, et les résidus chargés en rouge. Les résidus du patch hydrophobe de l'ubiquitine (Leu8, Ile44, Val70) sont représentés par des sphères orange.

III.2.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe UIM-SH3/ubiquitine.

Afin de déterminer la stœchiométrie du complexe, nous avons enregistré des expériences de relaxation sur les complexes ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub et ^{15}N -Ub / ^{14}N -UIM-SH3 à des concentrations saturantes pour le second partenaire. Dans la figure 37 sont représentées les vitesses de relaxation longitudinale et transversale (respectivement R_1 et R_2), ainsi que les nOes hétéronucléaires ^1H - ^{15}N de chaque résidu de l'ubiquitine et d'UIM-SH3, sous leur forme libre et complexée. Le Tableau 9 résume les valeurs moyennes des vitesses de relaxation et des nOes pour la structure secondaire de l'ubiquitine et des domaines UIM et SH3 sous forme libre et complexée.

		R_1 (s $^{-1}$)	R_2 (s $^{-1}$)	nOe
$^{15}\text{N Ub}$		$2,05 \pm 0,01$	$7,73 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,11$
$^{15}\text{N UIM-SH3}$	UIM (166-185)	$1,65 \pm 0,01$	$6,57 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,01$
	Linker (186-211)	$1,57 \pm 0,004$	$5,39 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01$
	SH3 (212-288)	$1,45 \pm 0,01$	$10,9 \pm 0,1$	$0,75 \pm 0,02$
$^{15}\text{N Ub} + \text{UIM-SH3}$		$0,95 \pm 0,04$	$22,7 \pm 1,4$	$0,79 \pm 0,08$
$^{15}\text{N UIM-SH3} + \text{Ub}$	UIM	$1,06 \pm 0,05$	$13,9 \pm 1,1$	$0,56 \pm 0,03$
	SH3	$0,8 \pm 0,1$	$15,1 \pm 2,6$	$0,50 \pm 0,04$

Tableau 9 : Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 ainsi que les valeurs de nOe sont présentées pour la forme libre et complexée de chaque protéine.

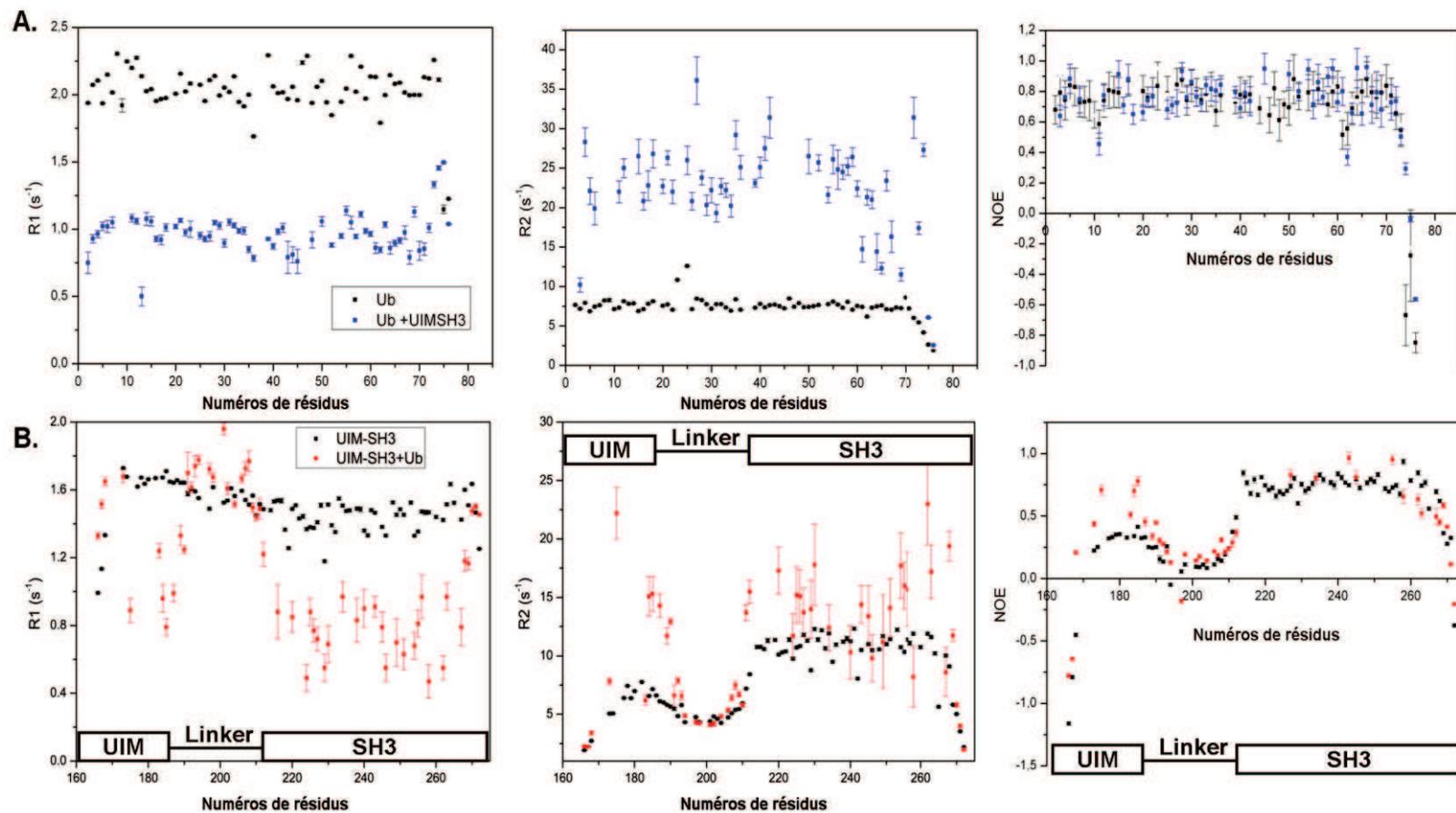


Figure 37 : Données de relaxation R_1 , R_2 et $nOes$ pour **A**) ^{15}N -ubiquitine (en noir), ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N -UIM-SH3 (en bleu) {rapport de concentration $[UIM-SH3]/[Ub]=9,27$ } et pour **B**) ^{15}N -UIM-SH3 (en noir), ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine (en rouge) {rapport de concentration $[Ub]/[UIM-SH3]=12,5$ }. Les données de relaxation sont enregistrées pour les complexes à des concentrations saturantes.

Les données de relaxation sur ^{15}N -UIM-SH3 seule mettent en évidence que le construit est composé de trois régions présentant des dynamiques différentes (Figure 37B). On note que les valeurs de R_1 et R_2 sont distinctes pour les domaines UIM et SH3 (Tableau 9), ce résultat suggère que les domaines UIM et SH3 se réorientent de manière indépendante. Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 varient selon la masse moléculaire du complexe protéique étudié. En effet, pour ^{15}N -Ub, la moyenne des valeurs de R_1 dans la structure secondaire est de $2,05 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ alors que cette valeur diminue à $0,95 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ en complexe avec UIM-SH3. La moyenne des valeurs des R_2 dans la structure secondaire est de $7,73 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ alors que cette valeur augmente à $22,7 \pm 1,4 \text{ s}^{-1}$ en complexe. La moyenne des valeurs de R_1 dans la structure secondaire pour UIM et SH3 sont respectivement de $1,65 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ et de $1,45 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ alors que pour le complexe ces valeurs diminuent à $1,06 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ et $0,80 \pm 0,10 \text{ s}^{-1}$. Les valeurs de R_2 moyennées de la structure secondaire pour UIM et SH3 sont $6,57 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ et $10,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ respectivement alors que pour le complexe ces valeurs augmentent pour atteindre $13,9 \pm 1,1 \text{ s}^{-1}$ et $15,1 \pm 2,6 \text{ s}^{-1}$. Nous pouvons noter que le *linker* n'est pas perturbé par la complexation et présente toujours des valeurs moyennes identiques.

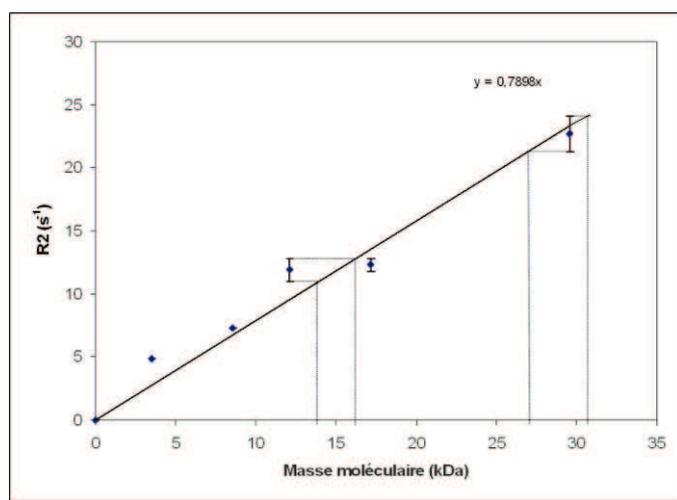
Pour le domaine UIM, nous avons mesuré un nOe moyen de $0,31 \pm 0,01$ et pour le domaine SH3 de $0,74 \pm 0,02$. La valeur particulièrement faible pour UIM suggère que l'hélice α est très dynamique. En complexe, cette valeur augmente à $0,56 \pm 0,03$ indiquant une stabilisation de l'hélice en présence de l'ubiquitine. Dans le cas du domaine SH3 seul, sa valeur moyenne suggère que ce domaine est structurellement rigide. En complexe, l'analyse des nOes n'a pas été concluante pour 2 raisons :

- De nombreux résidus ne sont plus observables en fin de titration.
- De nombreux résidus présentaient des valeurs et des erreurs nOes aberrantes.

Nous pouvons donc simplement émettre l'hypothèse que la complexation ne modifie pas significativement la rigidité du domaine. En ce qui concerne le *linker* (constitué des résidus 194 à 211), les valeurs moyennes de R_1 , R_2 et nOe ne varient pas avec la complexation et sont caractéristiques d'une région très flexible et non structurée qui n'est pas affectée par l'interaction avec l'ubiquitine.

Le temps de corrélation (τ_c) est calculé par le programme ROTDIF à partir des valeurs R_1 , R_2 et nOes. Ce paramètre est indirectement lié à la masse moléculaire du système protéique étudiée. Pour ^{15}N -Ub, le temps de corrélation est de $5,25 \pm 0,06 \text{ ns}$. Cette valeur augmente à $15,7 \pm 0,2 \text{ ns}$ dans le cas où l'ubiquitine interagit avec UIM-SH3. Comme décrit

dans le paragraphe section II.2.3.2 pages 135-138, la vitesse de relaxation R_2 est proportionnelle au temps de corrélation (τ_c) (Figure 26, page 137). Le temps de corrélation est lui-même dépendant du rayon hydrodynamique et donc dépendant du poids moléculaire (98). On peut donc réaliser une courbe d'étalonnage représentant la fonction $R_2 = f(Mw)$ en utilisant les données déterminées expérimentalement pour l'ubiquitine, diubiquitine, UIM, ainsi que le complexe UIM /Ub (110). Dans notre étude, nous avons obtenu l'équation de droite suivante $R_2 = 0,79 \times Mw$ (Figure 38)



Système protéique	Masse moléculaire (kDa)	R_2	Err R_2
Ub	8,564	7,73	0,02
Ub2	17,128	12,3	0,5
UIM	3,514	4,89	0,01
Ub+UIM	12,078	11,9	0,9
Ub+UIM-SH3	?	22,7	1,4
UIM-SH3 (SH3)	?	15,1	2,6

Figure 38 : Représentation linéaire de la vitesse de relaxation transversale R_2 en fonction du poids moléculaire des systèmes protéiques étudiés.

Pour le complexe Ub / UIM-SH3, cette fonction linéaire conduit pour une valeur de R_2 de $22,7 \pm 1,4 \text{ s}^{-1}$ à une masse moléculaire comprise entre 26,9 et 30,5 kDa. Les masses théoriques pour une stœchiométrie 1:1 et 2 :1 (Ub : UIM-SH3) sont de 21,01 kDa et 29,57 kDa. Ces résultats confirment donc une stœchiométrie 2 : 1. De la même manière, la valeur moyenne des R_2 du domaine SH3 pour le complexe UIM-SH3 / Ub est de $15,1 \pm 2,6 \text{ s}^{-1}$. Cette valeur correspond à une masse moléculaire comprise entre 15,8 et 22,4 kDa et donc à un modèle 1 :1 (Ub : SH3) (masse théorique = 17,5 kDa).

Pour conclure, le construit UIM-SH3 possède deux sites d'interaction pour l'ubiquitine : un premier sur le motif UIM et le second sur le domaine SH3. Ces UBDs interagissent avec le patch hydrophobe de l'ubiquitine. Les constantes de dissociation des domaines SH3 et UIM pour l'ubiquitine sont calculées dans deux conditions, en absence et en présence de 100 mM de NaCl. Pour le domaine SH3, on obtient respectivement de $250 \pm 25 \mu\text{M}$ et $706 \pm 47 \mu\text{M}$ et pour UIM nous avons $75 \pm 10 \mu\text{M}$ et $243 \pm 15 \mu\text{M}$ (section III.2.1

pages 147-149). Les affinités obtenues dans ces deux conditions sont du même ordre de grandeur que les UBDs décrits dans la littérature.

III.3. Expériences de compétition entre le dérivé UBPY et l'ubiquitine sur UIM-SH3

Kato *et al.* ont identifié deux dérivés peptidiques de 11 acides aminés (Figure 10 page 112) de la déubiquitinase UBPY, capable d'interagir avec le domaine SH3 de STAM2 (61). Ils ont pu déterminer par fluorescence une constante de dissociation du complexe SH3 / peptide UBPY de 27 μ M. De plus, la structure de ce complexe a été résolue par cristallographie à une résolution de 1,70 Å (PDB : 1UJ0) (43).

La figure 39 présente les résidus engagés dans l'interaction du domaine SH3 de STAM2 avec l'ubiquitine et avec UBPY. Cette figure indique que les boucles RT, n-Src et l'hélice 3₁₀ du domaine SH3 sont principalement impliquées dans l'interaction avec l'ubiquitine ou le peptide UBPY.

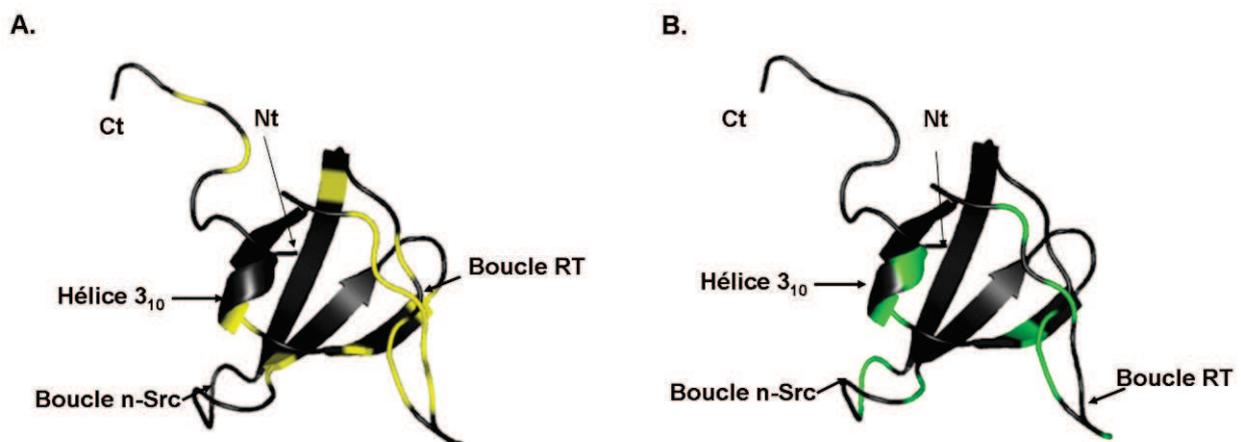


Figure 39 : Représentation des résidus impliqués dans l'interaction du domaine SH3 de STAM2 **A)** avec l'ubiquitine (expériences CSP ; en absence de sel) et **B)** avec le peptide d'UBPY (1UJ0) (43). Les résidus représentés en jaune ont un $\Delta\delta > 0,1$ ppm. Les résidus en vert sont impliqués dans l'interaction selon la structure cristallographique 1UJ0.

En effet, à partir de nos expériences de titration sur ¹⁵N-UIM-SH3 en présence d'ubiquitine, nous observons que la surface d'interaction sur le domaine SH3 fait intervenir des résidus des boucles RT, n-Src et de l'hélice 3₁₀. A partir de la figure 40, qui illustre les

liaisons hydrogènes et hydrophobes dans l'interface SH3 de STAM2 / UBPY, nous pouvons noter que l'interface sur le domaine SH3 est constituée des résidus de la boucle RT (Tyr218, Phe220, Val223, Glu224, Asn226 et Glu227), de l'hélice 3₁₀ (Asn261, Phe262), et de la boucle n-Src (Trp246 et Asn245). Ces résultats suggèrent que l'ubiquitine et le peptide UBPY interagissent sur la même surface d'interaction. Nous pouvons donc envisager une compétition entre ces deux partenaires sur le domaine SH3. La compétition entre un peptide possédant un motif riche en proline (PRS) et l'ubiquitine a déjà été décrit dans la littérature par Stamenova *et al.* pour les domaines SH3 de CIN85 et Sla1 (79).

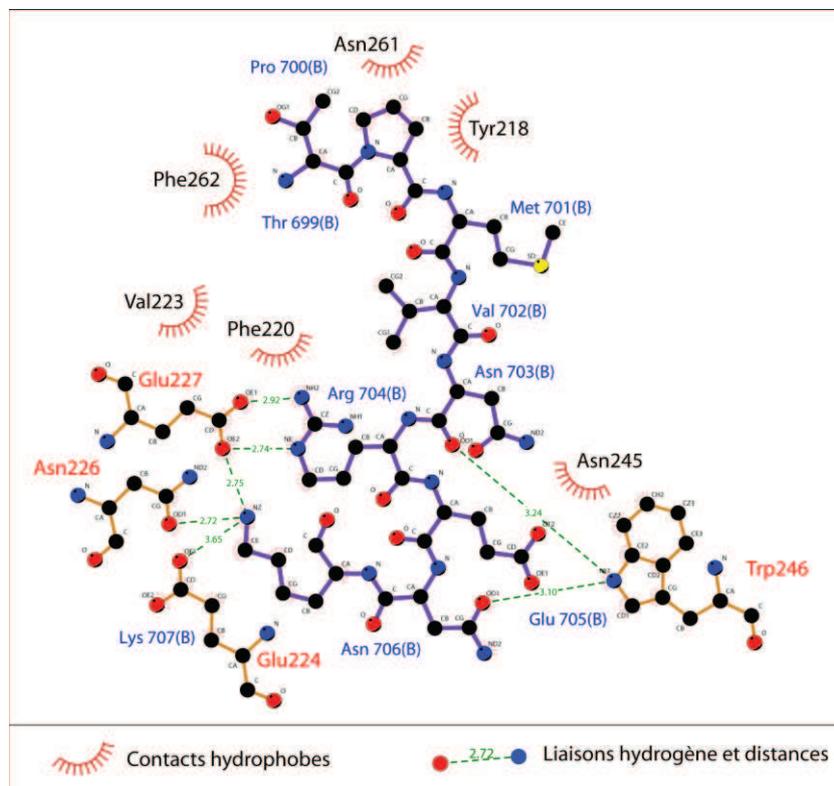


Figure 40 : Représentation schématique des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes impliquées dans la surface d'interaction du domaine SH3-STAM2 / peptide UBPY réalisé avec le logiciel ligplot sur la structure cristallographique 1UJ0. En bâtons violets sont représentés les 11 résidus du peptide UBPY (Thr699- Lys707), et en bâtons orange les résidus du domaine SH3. La numérotation du fichier 1UJ0 a été modifiée pour correspondre à notre numérotation (pour information Glu227 = Glu220 sur 1UJ0). Les liaisons hydrogènes sont en vert et les distances sont en angströms (Å).

III.3.1. Compétition entre le peptide UBPY et l'ubiquitine

Les expériences de compétition entre l'ubiquitine et le peptide UBPY sont nécessaires afin de mieux caractériser le complexe UIM-SH3 / Ub. Le peptide de 11 acides aminés (Figure 10 page 112), sous forme de poudre ($\text{NH}_2\text{-TPMVNRENKPP-COOH}$, $M_w = 1282,5$ Da, pureté = 95%), a été préparé par la société COVALAB (Villeurbanne). La détermination de la concentration est basée sur la pesée et est donc entachée d'une erreur sans doute importante (poudre hydratée). Le peptide dérivé d'UBPY ne possédant aucun acide aminé aromatique (Tyr, Phe, Trp), la vérification de la concentration par spectroscopie UV-visible est impossible. Une solution concentrée du dérivé UBPY (selon la pesée la concentration est de 3,3 mM) a été préparée dans du tampon 20 mM phosphate pH 6,8.

La première expérience de compétition consiste à saturer le domaine SH3 avec le peptide UBPY, puis d'ajouter progressivement un faible volume d'ubiquitine jusqu'à l'obtention du rapport $[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 2,65$. Pour saturer en peptide UBPY sans connaître la concentration exacte, nous avons estimé à partir de quel volume de solution de peptide, la variation de déplacement chimique tendait vers une valeur limite (saturation). Lors de l'ajout du dérivé UBPY sur $^{15}\text{N-UIM-SH3}$, nous observons que seul le domaine SH3 interagit de façon spécifique avec le peptide UBPY, car seuls les résidus de ce domaine sont perturbés (Figure 41A). Les résidus du domaine SH3 impliqués dans la surface d'interaction sont localisés sur les boucles RT (Asp219, Glu221, Val223, Glu224, Asp225, Asn226, Glu227, Leu228), n-Src (Asp241, Ser242, Trp246), et sur l'hélice 3_{10} (Ser260, Phe262) (Figure 41C). Ce résultat indique que la surface d'interaction de UBPY sur le domaine SH3 de STAM2 est superposable aux surfaces déterminées par cristallographie (1UJ0) et, par nos expériences de titration, sur le complexe $^{15}\text{N-UIM-SH3}/^{14}\text{N-Ub}$. Pour représenter la variation des déplacements chimiques lors de l'ajout du second partenaire, l'ubiquitine, nous avons pris comme point de départ le dernier point de titration $^{15}\text{N-UIM-SH3}$ / peptide UBPY. Nous observons alors une nouvelle perturbation de déplacement chimique et la disparition des résidus appartenant uniquement au domaine UIM (Figure 41B). Ce résultat a déjà été observé lors de la titration $^{15}\text{N-UIM-SH3}$ avec $^{14}\text{N-ubiquitine}$ (cf section III.2.1.1 pages 147 et 149), et confirme la forte interaction entre l'ubiquitine et le domaine UIM. Par contre, aucune nouvelle perturbation n'apparaît pour le domaine SH3.

Ce résultat confirme donc que le peptide UBPY est toujours en interaction avec le domaine SH3 et qu'il a une plus grande affinité pour le domaine SH3 que l'ubiquitine ($K_d \sim 27 \mu\text{M}$ pour le peptide UBPY (61) et $K_d \sim 250 \mu\text{M}$ pour Ub).

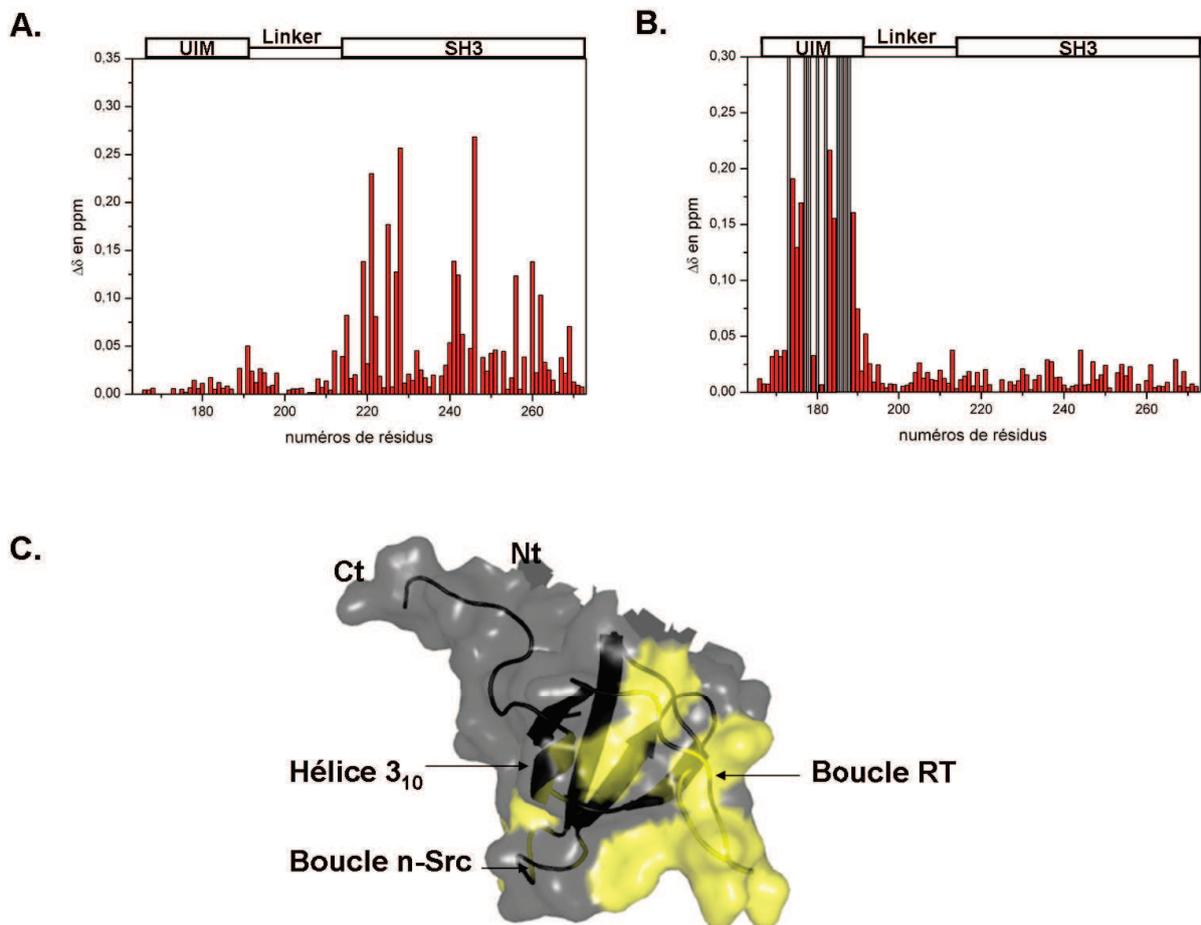


Figure 41 : Données de perturbations de déplacement chimique pour le complexe en absence de sel **A)** ^{15}N -UIM-SH3 / peptide UBPY, **B)** ^{15}N -UIM-SH3 / peptide UBPY en compétition avec l'ubiquitine ($[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 2.65$). **C)** Représentation de la surface d'interaction du peptide UBPY sur le domaine SH3. Les résidus fortement perturbés par la présence du peptide UBPY sont représentés en jaune.

L'analyse CSP a aussi été enregistrée pour le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub jusqu'à ce que le rapport $[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}]$ atteigne la valeur de 6,3 (Figure 42A). Nous observons des perturbations significatives pour le domaine UIM et le domaine SH3. Une petite quantité de peptide concentré a été ajoutée progressivement. La Figure 42B met en évidence les variations de $\Delta\delta$ des résidus du construit UIM-SH3 entre le dernier point de titration en présence d'Ub (UIM-SH3/Ub) et le dernier point de titration réalisé en présence du peptide UBPY (complexe UIM-SH3/Ub/UBPY). Aucune nouvelle perturbation n'est observée sur le domaine UIM comme prévu, alors que de nouvelles perturbations sont

observées sur le domaine SH3 en raison de la compétition entre l'ubiquitine et le peptide UBPY (Figure 42B).

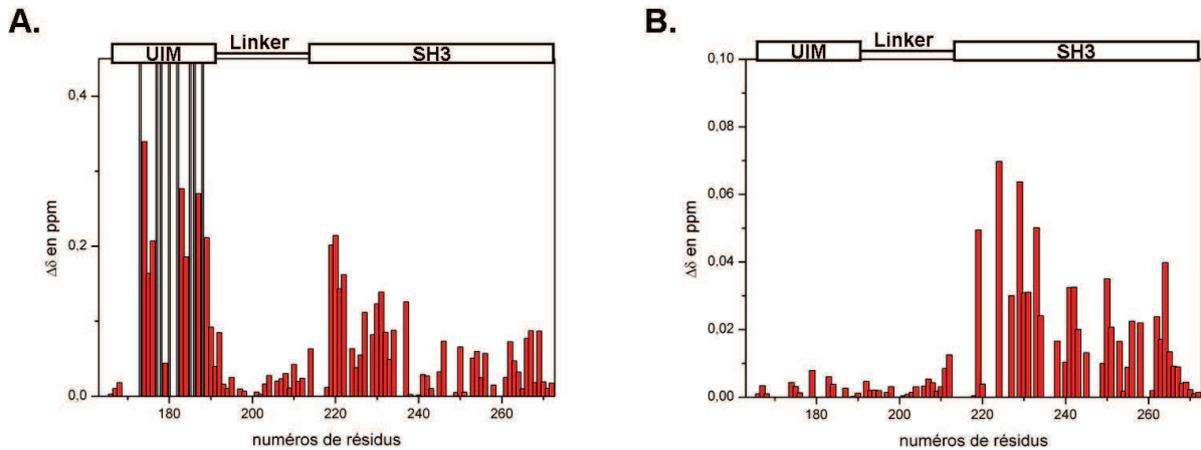


Figure 42 : Analyse qualitative des perturbations de déplacement chimique pour le complexe en absence de sel **A)** $^{15}\text{N-UIM-SH3} / ^{14}\text{N-Ub}$ ($[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 6,3$) et **B)** $^{15}\text{N-UIM-SH3} / ^{14}\text{N-Ub}$ en compétition avec le peptide UBPY.

En effet, le sens de la perturbation du déplacement chimique change en raison de l'ajout d'un nouveau ligand : le peptide UBPY (Figure 43). Ce résultat suggère que le peptide remplace l'ubiquitine en raison de sa plus grande affinité pour le domaine SH3. Nous n'avons pas pu continuer cette compétition par manque de peptide UBPY mais nous pouvons aisément imaginer que la variation de déplacement chimique sera plus nette lorsque le rapport peptide UBPY / UIM-SH3 augmentera.

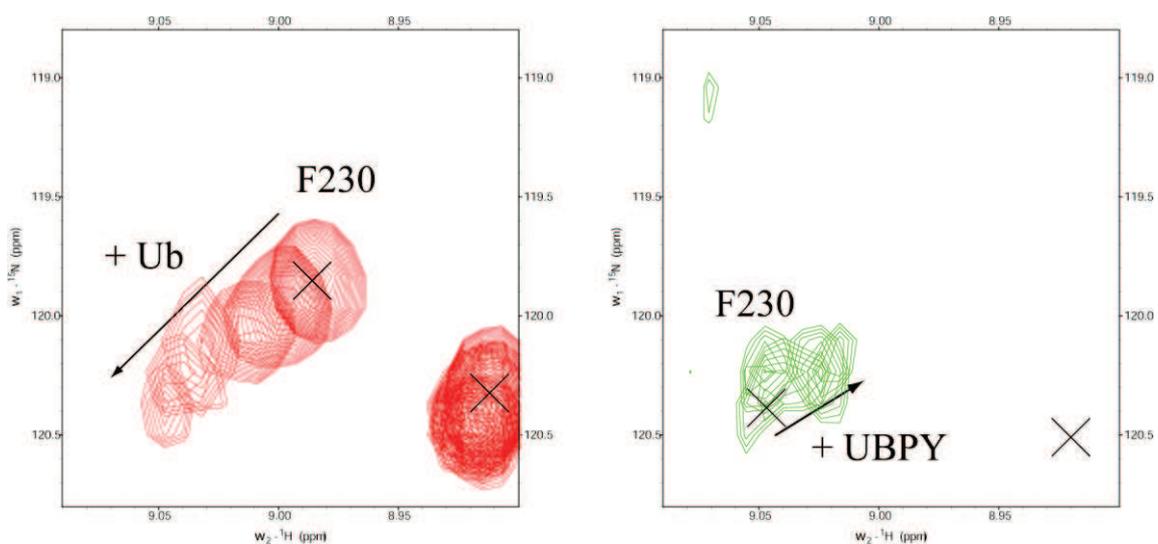


Figure 43 : Perturbation du déplacement chimique du résidu F230 durant les expériences de titration après l'ajout d'ubiquitine (rouge) puis du peptide UBPY (vert).

III.3.2. Expériences de relaxation

Pour confirmer l'interaction du peptide seul sur le domaine SH3, nous avons enregistré des expériences de relaxation R_1 sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / peptide UBPY / ^{14}N -ubiquitine à des conditions saturantes (Figure 44).

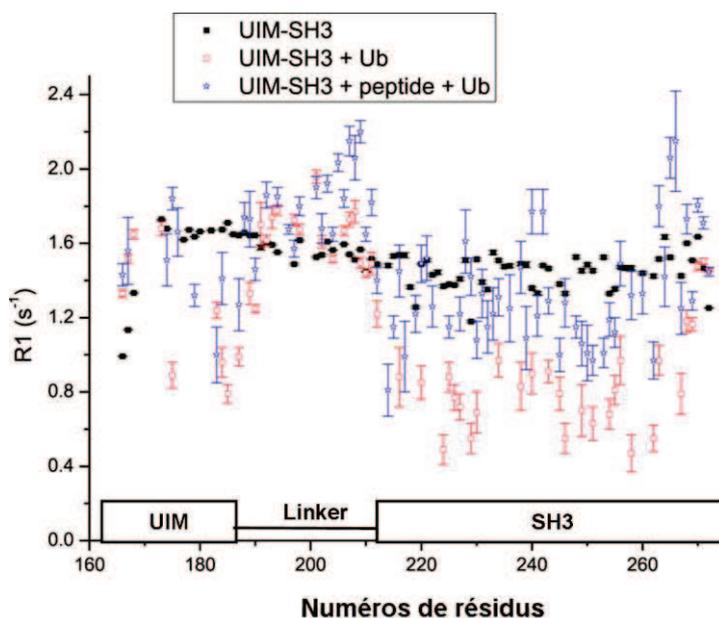


Figure 44 : Vitesses de relaxation R_1 pour ^{15}N -UIMSH3 en noir, ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ubiquitine en rouge, ($[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 12.13$), ^{15}N -UIM-SH3 / peptide UBPY / ^{14}N -Ubiquitine en bleu (conditions saturantes en UBPY et $[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 2.65$).

La figure 44 montre les valeurs de vitesses R_1 pour ^{15}N -UIM-SH3, le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub ($[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 12.1$), et le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / peptide UBPY / ^{14}N -Ub (conditions saturantes en peptide UBPY et $[\text{Ub}] / [\text{UIM-SH3}] = 2.65$). Pour le domaine UIM, les valeurs de R_1 sont relativement similaires pour les deux complexes, ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub et ^{15}N -UIM-SH3 / peptide UBPY / ^{14}N -Ub. Ce résultat confirme que le domaine UIM n'est pas affecté par la présence du peptide et que le complexe UIM / Ub est stable. En ce qui concerne le domaine SH3, nous pouvons remarquer que les valeurs R_1 du complexe UIM-SH3 / peptide / Ub sont significativement plus élevées que les valeurs R_1 du complexe UIM-SH3 / Ub. Ce résultat indique que le domaine SH3 interagit avec le peptide UBPY de masse moléculaire plus faible et non plus avec l'ubiquitine. Nos résultats sont donc en accord avec ceux présentés précédemment : la compétition ubiquitine / peptide UBPY dans le cas de l'interaction avec SH3 est favorable au peptide UBPY.

L'ensemble de ces expériences sur le complexe UIM-SH3 / peptide UBPY / Ub indique que le domaine SH3 est plus affine pour le motif P-X-(V/I)-(D/N)-R-X-X-K-P d'UBPY ($K_d = 27 \mu\text{M}$ (43)) que pour le patch hydrophobe de l'ubiquitine ($K_d = 250 \pm 10 \mu\text{M}$, notre étude en absence de sel). Une question peut alors se poser : *Existe-t-il une compétition in vivo entre UBPY et l'ubiquitine des protéines cargos sur le domaine SH3 de STAM2 ? Quel pourrait être le rôle de cette compétition ?*

Pour observer une compétition *in vivo* entre UBPY et les protéines cargos (protéine ubiquitinée), il faut que ces protéines soient localisées à la membrane endosomale. Des expériences de double hybride de levure ont mis en évidence qu'UBPY est impliquée dans la voie d'endocytose grâce à son interaction avec plusieurs membres de la machinerie ESCRT : STAM, CHMP, et Vps4A (111). La fonction et la localisation subcellulaire de la protéine UBPY sont régulées par la concentration en effecteur : EGF, à la surface cellulaire. En effet, à de faibles concentrations d'EGF (Figure 45A), UBPY est localisée uniformément dans le cytoplasme et sur la membrane plasmique (64). UBPY est capable de protéger EGFR (récepteur membranaire = protéine cargo) de la dégradation lysosomale en débubiquitinant le récepteur activé directement à la membrane plasmique (69, 70, 112) et ainsi permet de prolonger la cascade de transduction du signal (Figure 45A- flèche 1). Dans ce cas, il n'y a pas de compétition entre UBPY et les protéines cargos sur le domaine SH3 de STAM2. Les protéines cargos qui n'ont pas été totalement débubiquitinées sont dirigées vers l'endosome précoce où elles seront triées et prises en charge par les UBDs du complexe ESCRT-0 : Hrs et STAM2. Puis deux possibilités se présentent:

- soit le domaine SH3 de STAM2 recrute et active la DUB : AMSH ($K_d = 6 \mu\text{M}$, mesuré par ITC) (113). La localisation subcellulaire d'AMSH sur la membrane de l'endosome précoce est induite par l'interaction via son domaine CBD (clathrin binding domain) avec la clathrine. On peut ainsi observer une compétition entre l'ubiquitine des protéines cargos et cette enzyme de débubiquitination. Les protéines cargos seront alors débubiquitinées et conduites vers la voie de recyclage (Figure 45A- flèche 2).

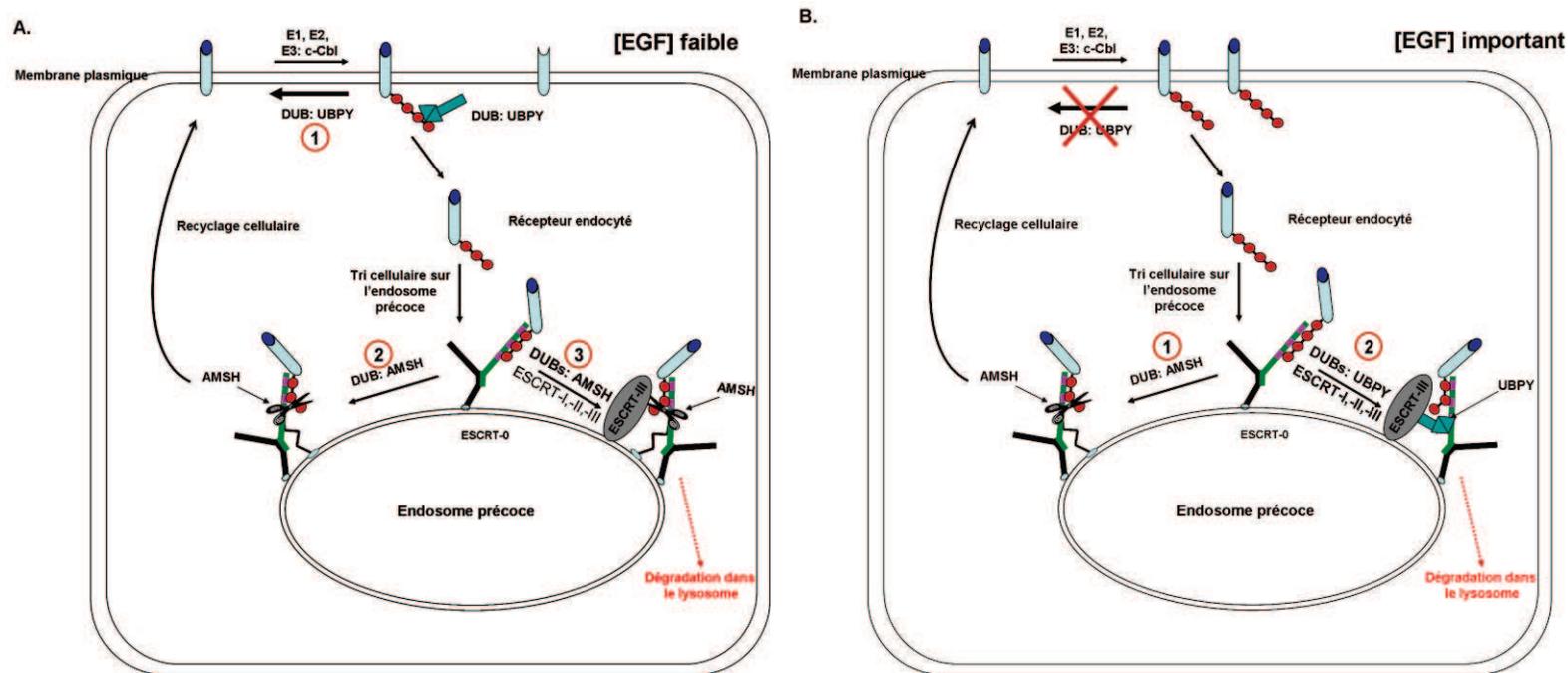
- soit les protéines cargos sont prises en charge par les complexes ESCRT-I, II, et III et conduites vers la voie de dégradation lysosomale. Les protéines destinées à la dégradation sont débubiquitinées par AMSH puis internalisées dans les ILVs des corps multi-vesiculaires (Figure 45A- flèche 3). Il existe probablement une fraction de protéine UBPY à la surface de la membrane de l'endosome précoce, qui serait responsable du sauvetage de STAM2 (modification chaîne de poly-ubiquitine K48) contre sa dégradation protéosomale (12).

A des concentrations élevées d'EGF (Figure 45B), les protéines ubiquitinées à la surface plasmique augmentent. On peut noter également que la protéine UBPY est également ubiquitinée et rendue inactive (69). Ainsi les protéines transmembranaires activées ne sont plus déubiquitinées et sont conduites vers l'endosome précoce. Mizuno *et al.* suggèrent qu'UBPY, dans ces conditions, est redistribuée vers la membrane endosomale contenant le récepteur EGFR (69). Cette localisation dépend de l'interaction entre le domaine MIT d'UBPY et la protéine CHMP du complexe ESCRT-III (63).

Sur l'endosome précoce, deux voies se présentent:

- soit AMSH induit le recyclage des protéines cargos (Figure 45B- flèche 1).
- soit les protéines cargos sont dirigées vers la voie de dégradation via l'interaction avec les ESCRT (Figure 45B- flèche 2). Dans ce cas, l'internalisation dans les MVBs résulte de l'action de la DUB-UBPY. Des expériences d'inactivation d'UBPY, par mutagenèse dirigée, indique qu'en présence de ce mutant il y a accumulation des protéines cargos à la membrane de l'endosome précoce (12).

Pour pouvoir dégrader les protéines cargos il est important de pouvoir les déubiquitiner soit par AMSH soit par UBPY. L'interaction des DUBs avec le domaine SH3 est essentielle pour leurs activités. En effet la délétion du motif d'interaction avec SH3 pour UBPY (63) et AMSH (51) induit une accumulation de protéines cargos ubiquitinées. Ainsi il est important que les protéines UBPY et AMSH soient plus affines pour le domaine SH3 que l'ubiquitine des protéines cargos. La régulation de la voie de dégradation lysosomale dépend ainsi de la concentration de facteur EGF et des DUBs qui sont elles même régulées de façon fine par l'ubiquitination via une protéine ligase (E3) en interaction avec UBPY, qui induit la désactivation de la DUB : AMSH (55)



Légende :

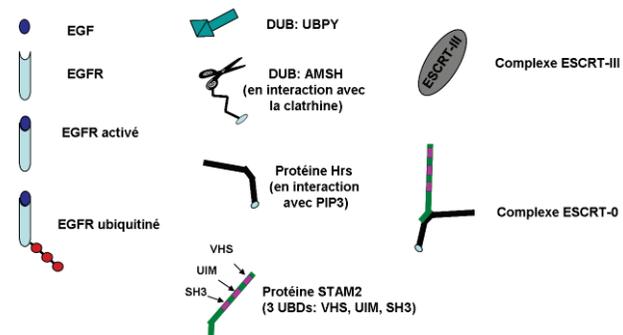


Figure 45 : Régulation de la voie de dégradation lysosomale par la concentration en effecteur (EGF) et en déubiquitinases : AMSH et UBPY. **A)** A de faibles concentrations d'EGF, et **B)** à de fortes concentrations d'EGF. Les flèches sont explicitées dans le texte.

III.4. Construction d'un modèle structural du complexe UIM-SH3/Ub (Résultats préliminaires)

A partir des résultats de titration et de relaxation du complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ub nous avons mis en évidence que les domaines UIM et SH3 interagissent chacun avec une ubiquitine avec des affinités différentes. Dans le but de construire un modèle structural du complexe UIM-SH3/Ub, nous avons réalisé des expériences de perturbation de relaxation par paramagnétisme (PRE : Paramagnetic Relaxation Enhancement) en utilisant deux mutants d'ubiquitine : l'une en position K48C et l'autre en T12C (le principe de cette expérience est décrit section II.2.3.3. pages 138-140). Les mutations permettent la fixation d'une sonde paramagnétique spécifique aux résidus cystéines : 1-oxyl-2,2,5,5,-tétra-méthyl-3-pyrroline-3-méthyl-méthanesulfonate (MTSL).

En présence de l'ubiquitine-K48C-MTSL, nous remarquons que les domaines UIM et SH3 sont tous deux perturbés. Sur le domaine UIM, très peu d'informations sont obtenues car les signaux de nombreux résidus ne sont plus observables au premier point de titration (cf section III.2.1.1 page 148). Sur le domaine SH3, nous observons deux surfaces perturbées, par la présence de la sonde paramagnétique (MTSL) impliquant (Figure 46C):

- En rouge, les résidus de la boucle RT (Tyr218-Ala222 et Thr229-Glu234), et l'hélice 3_{10} (Asn261-Phe262). La Figure 46A représente le rapport d'intensité en présence de la sonde paramagnétique MTSL (en position K48C sur l'ubiquitine) réduite et oxydée pour chacun des résidus du domaine UIM-SH3. Les résidus Asn247 (boucle n-Src) et Asp261 (hélice 3_{10}) ne sont plus observés en présence d'ubiquitine-K48C-MTSL, indiquant que la sonde paramagnétique est proche de ces résidus (Figure 46A). Ces résultats sont en accord avec les expériences de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine (Figure 46B), qui indiquent que les résidus des boucles RT, n-Src et de l'hélice 3_{10} sont fortement perturbés en déplacement chimique.

- En vert, les résidus Glu250-Ile255, et les résidus Asn266-Glu272 de l'extrémité C-terminale (Figure 46A). Les résidus Ile235 et Val237 disparaissent également en présence de MTSL sous forme oxydée (indiquant une proximité de MTSL).

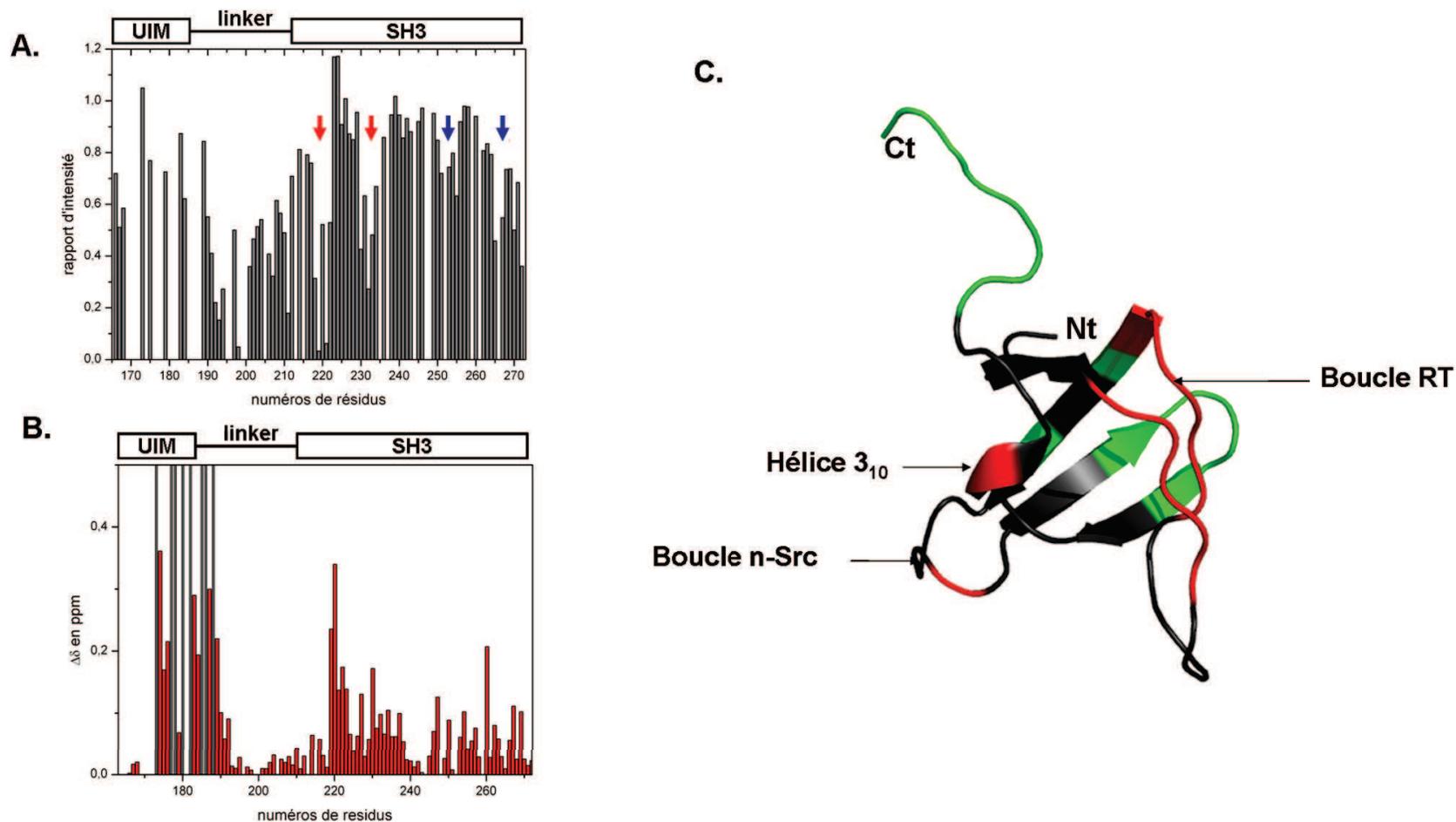


Figure 46 : A) Profil des perturbations paramagnétiques sur la protéine UIM-SH3 en présence d'ubiquitine-K48C-MTSL, (rapport (3 : 1) = ubiquitine : UIM-SH3), les flèches en rouge et en bleu représentent respectivement les régions fortement et modérément perturbées par la présence de MTSL. B) Profil des variations de déplacement chimique sur UIM-SH3 sans sel. C) Représentation des deux surfaces perturbées par la présence de la sonde paramagnétique MTSL fixé sur l'ubiquitine-K48C. Les résidus en rouge sont des boucles RT, n-Src, et de l'hélice 3₁₀ Et les résidus en vert qui sont à l'opposé de la surface obtenue avec des expériences de titration.

En présence d'ubiquitine-T12C-MTSL, nous observons également deux surfaces perturbées sur le domaine SH3 (Figure 47B) et une perte d'information importante sur le domaine UIM (comme en présence d'ubiquitine-K48C-MTSL). Les surfaces d'interactions impliquent:

- En rouge, la surface en accord avec les données de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine, est constituée des acides aminés des boucles RT (Asp219-Glu221), n-Src (Trp247, et Trp248) et de l'hélice 310 (Pro259, et Asp261) (colorés en rouge Figure 47B). En effet, sur la Figure 47A, nous pouvons noter que les résidus Asp219 à Glu221 sont modérément affectés par la présence de MTSL. Les résidus Trp247, Trp248, Pro259, et Asp261 ne sont plus observés en présence d'ubiquitine-T12C-MTSL, indiquant une forte perturbation et donc que ces résidus sont proches de MTSL.
- En vert, les résidus exposés à l'effet de MTSL sont les suivants : Ile235-Leu239, Thr265-Asn269, His252, et Ile237. Ces résidus sont localisés à l'opposé de la surface en rouge. En effet, sur la Figure 47A, nous pouvons noter que les résidus : Ile235-Leu239, Thr265-Asn269 sont fortement perturbés et que les résidus Ile237, et His252 ne sont plus observés en présence d'ubiquitine-T12C-MTSL.

L'ensemble de ces résultats confirme les données de titration sur le complexe UIM-SH3, qui indique que le domaine SH3 interagit avec l'ubiquitine par le biais des résidus des boucles RT, n-Src et l'hélice 3₁₀. Nous avons observé sur le domaine SH3 une seconde surface perturbée par MTSL, nous suggérons que cette perturbation est induite par l'ubiquitine qui interagit avec le domaine UIM. Il sera nécessaire par la suite, d'enregistrer des expériences de nOe filtrés sur le complexe UIM-SH3/ubiquitine afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'une ubiquitine suffisamment proche du domaine SH3 pour induire une perturbation paramagnétique à l'opposé de la surface définie par les expériences de titration. Nous observons également que le *linker* est également affecté par la présence de MTSL sur l'ubiquitine.

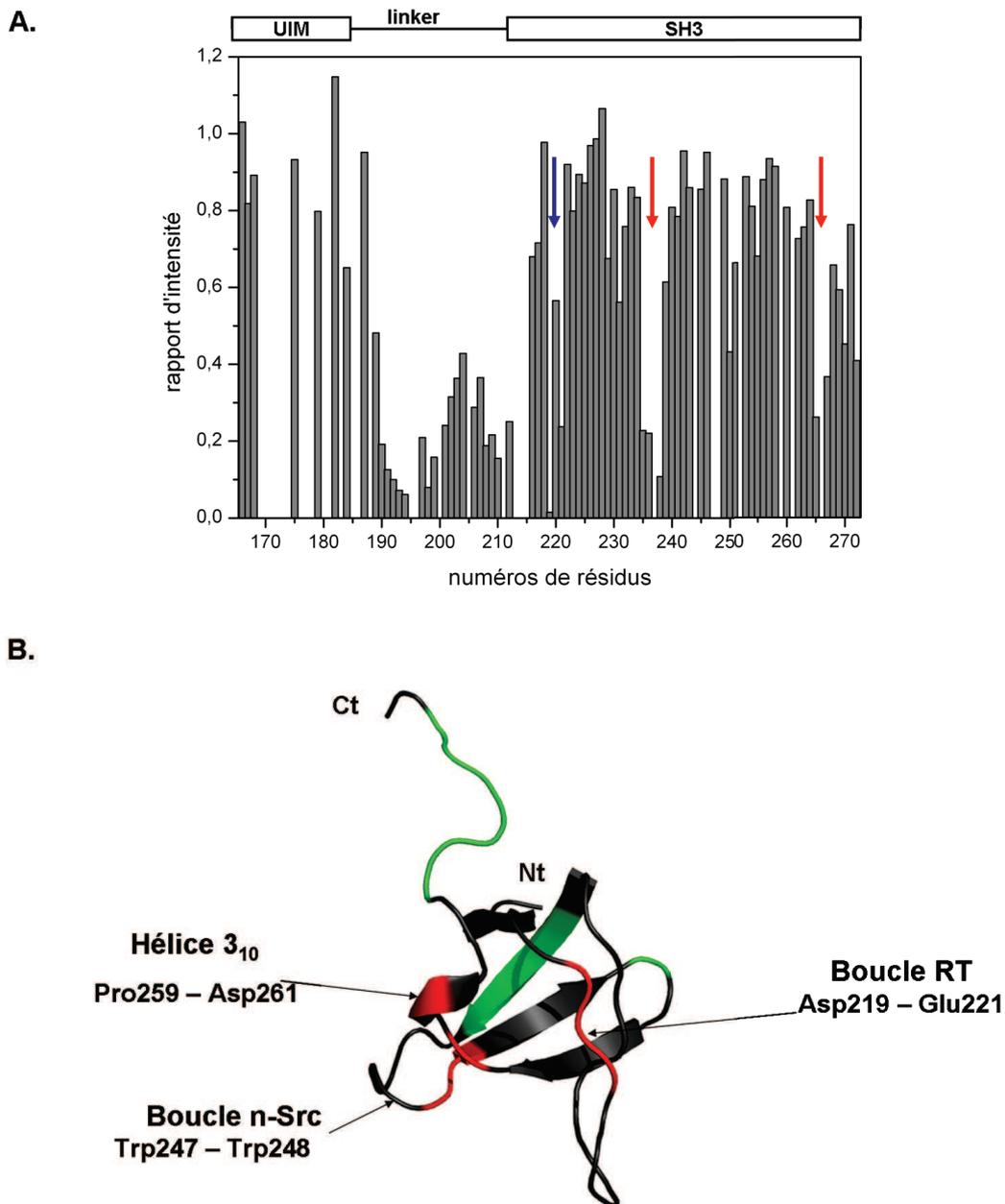


Figure 47 : Perturbations paramagnétiques sur la protéine UIM-SH3 en présence d'ubiquitine-T12C-MTSL, (rapport (3 :1) = ubiquitine : UIM-SH3), **A**) rapport d'intensité en présence de MTSL a l'état réduit et oxydé pour chacun des résidus du domaine UIM-SH3. Les flèches en rouge et en bleu représentent respectivement les régions fortement et modérément perturbées par la présence de MTSL. **B**) Représentation des deux surfaces perturbées par la présence de la sonde paramagnétique MTSL fixé sur l'ubiquitine-T12C. Les résidus en rouge sont des boucles RT, n-Src, et de l'hélice 3₁₀ Et les résidus en vert qui sont à l'opposé de la surface obtenue avec des expériences de titration.

Les données d'atténuations d'intensité, en présence d'ubiquitine- K48C-MTSL et - T12C-MTSL, sur les résidus du domaine SH3 sont utilisées pour reconstruire la position de l'électron libre de MTSL. Pour cela, nous avons utilisé un modèle prenant en compte un ou deux centres paramagnétiques (selon la publication (114)). Le meilleur modèle est celui qui

considère que le domaine SH3 est perturbé par 2 sondes paramagnétiques (car χ^2 faible). La figure 48 présente les positions des sondes paramagnétiques (K48C et T12C) sur le domaine SH3, calculé à partir d'un modèle prenant en compte 2 centres paramagnétiques. Les données du domaine UIM ne sont pas prises en compte, car trop peu nombreuses, pour la détermination de la position des centres paramagnétiques.

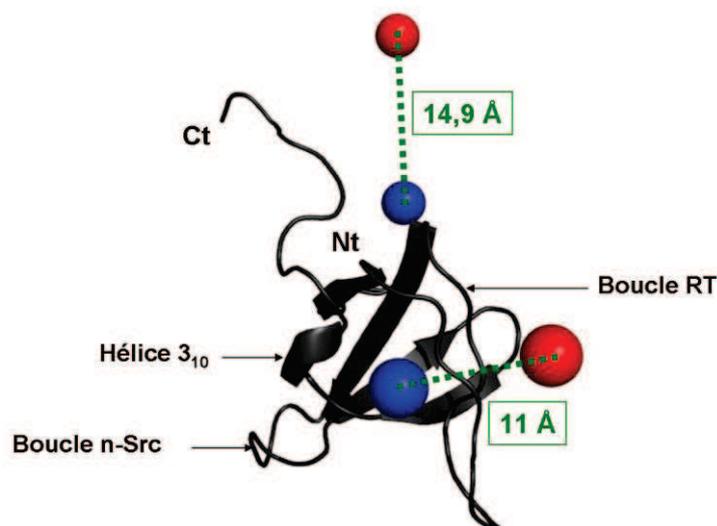


Figure 48 : Re-calcul des positions de l'électron libre de MTSL en considérant un modèle à 2 centres paramagnétique (114). L'électron libre de MTSL fixé sur l'ubiquitine en position T12C est représenté avec une sphère bleue. L'électron libre de MTSL fixé sur l'ubiquitine en position K48C est représenté avec une sphère rouge. Le domaine SH3 est représenté en ruban noir. Les distances en Å sont mesurées à partir de Pymol.

Les distances mesurées entre les sondes MTSL en position C12 et K48 de l'ubiquitine en interaction avec le domaine SH3, et le domaine UIM sont de $11 \pm 5 \text{ \AA}$ et $14,9 \pm 5 \text{ \AA}$ respectivement. Or la distance entre les C_{α} des résidus K48 et T12 de l'ubiquitine est de $18,6 \text{ \AA}$, ce qui est dans l'ordre grandeur des distances inter-centres paramagnétiques calculées. Les positions des sondes paramagnétiques sont calculées avec une marge d'erreur de 5 \AA . Cette erreur est due à la flexibilité de la sonde paramagnétique (cf section II.2.3.3. pages 137-140). Du fait de cette erreur, les contraintes géométriques issues de ces résultats préliminaires ne permettent pas hélas la convergence vers un modèle unique du complexe UIM-SH3/ubiquitine. Il serait nécessaire d'avoir un troisième jeu de contrainte de distance, afin d'affiner le positionnement des sondes paramagnétiques sur le domaine SH3 de STAM2. L'obtention de ce modèle fait l'objet d'une thèse dans notre Laboratoire, initiée en octobre 2011.

IV. Conclusion et perspectives:

La protéine STAM2 joue un rôle crucial dans le tri des protéines cargos à la surface de la membrane endosomale car :

- Elle permet la reconnaissance des protéines cargos par ces UBDs ; dans la littérature on en dénombre deux : VHS et UIM.
- Elle permet la régulation de la voie de dégradation lysosomale grâce à son domaine SH3 qui est capable d'interagir avec deux DUBs : AMSH et UBPY. Ces DUBs permettent selon le stimulus extérieur, principalement la concentration en effecteur de croissance (tels qu'EGF), de favoriser la dégradation ou le recyclage des protéines ubiquitinées vers la surface cellulaire, tout en maintenant un équilibre entre ces deux événements, le but étant de garder constant à la surface cellulaire un nombre de récepteurs capables d'induire un signal intracellulaire.

De façon préalable à ce travail, notre équipe avait mis en évidence, par des expériences RMN de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -Ubiquitine, que le domaine SH3 de STAM2 était un domaine d'interaction à l'ubiquitine (95). L'objectif de cette étude a été de caractériser ce nouveau UBD dans le complexe UIM-SH3 / ubiquitine. Les expériences de relaxation sur les complexes ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine et ^{15}N -ubiquitine / ^{14}N - UIM-SH3 ont permis de déterminer que les domaines UIM et SH3 sont capables d'interagir chacun avec une seule molécule d'ubiquitine. L'affinité de ces deux UBDs pour l'ubiquitine est différente. En effet à partir des expériences de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine, nous avons déterminé un K_d de $243 \pm 15 \mu\text{M}$ pour le domaine UIM et de $706 \pm 47 \mu\text{M}$ pour le domaine SH3 (en présence de 100 mM de NaCl). L'obtention de la constante de dissociation pour chaque ubiquitine en interaction avec UIM-SH3 est impossible, toutefois un K_d macroscopique de $335 \pm 30 \mu\text{M}$ a été calculé à partir des expériences de titration sur le complexe ^{15}N - ubiquitine / ^{14}N - UIM-SH3, en présence de 100 mM de NaCl. L'interface UIM-SH3 / ubiquitine implique des résidus hydrophobes sur les deux protéines. La surface d'interaction sur l'ubiquitine est identique pour les deux UBD, il s'agit du *patch* hydrophobe constitué des résidus Leu8, Ile44, et Val70. La surface d'interaction sur le domaine SH3 fait intervenir des résidus conservés sur l'hélice 3₁₀ et les boucles n-*Src* et RT. Le domaine UIM implique les résidus hydrophobes localisés sur une surface de l'hélice α . Nous avons mis en évidence des contributions électrostatiques grâce aux variations de K_d mesurées à des forces ioniques différentes soit en absence, soit en

présence de 100 mM de NaCl. Ces contributions ioniques seraient impliquées dans le positionnement correct de l'ubiquitine sur les UBDs. Le domaine SH3, comme tous les UBDs, possède une affinité de l'ordre du μM pour l'ubiquitine. Afin d'améliorer notre compréhension de l'interaction entre le domaine UIM-SH3 et l'ubiquitine, il serait intéressant de construire un modèle du complexe UIM-SH3 / ubiquitine. Des expériences préliminaires de relaxation paramagnétique (PRE) sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine-K48C-MTSL ont été réalisées au cours de notre étude. Les résultats obtenus sont analogues aux expériences de titration sur le complexe ^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine, et confirment ainsi la surface d'interaction sur UIM-SH3. Ces expériences préliminaires ne sont hélas pas suffisantes pour construire un modèle. Pour cela il faudrait enregistrer des expériences supplémentaires de paramagnétisme à partir d'autres mutants cystéine d'ubiquitine pour effectuer une triangulation. Afin d'optimiser le modèle obtenu du complexe UIM-SH3 / ubiquitine, des expériences nOe filtrés et des mesures de couplages dipolaires résiduels (RDC) sont envisagées afin d'obtenir respectivement des contraintes de distance de l'ordre de 5 Å et des contraintes d'orientation spatiales.

Récemment notre équipe (114) a démontré que les domaines VHS et UIM sont coopératifs lors de la fixation de chaînes de poly-ubiquitines. Il serait intéressant d'explorer cette question et de déterminer s'il existe une coopérativité entre les domaines UIM et SH3 et s'il existe une spécificité entre les chaînes de poly-ubiquitines K48 et K63 (distinction des domaines distaux et proximaux). Il pourrait aussi être envisagé d'obtenir par microscopie électronique un modèle structural du complexe VHS-UIM-SH3/ubiquitine ou VHS-UIM-SH3/ubiquitine/UBPY.

Dans une seconde partie, la capacité du domaine SH3 à interagir avec un peptide dérivé d'UBPY a été utilisée pour étudier la compétition entre ce composé et l'ubiquitine. Ceci nous a permis de caractériser le complexe UIM-SH3/Ub et d'améliorer nos connaissances sur le mécanisme du tri des cargos sur la membrane de l'endosome précoce. Nos expériences de compétition peptide UBPY /ubiquitine en présence de la protéine UIM-SH3 indiquent que le peptide UBPY a une affinité plus importante pour le domaine SH3 que l'ubiquitine. Ce résultat est logique car si les protéines cargos avaient une affinité plus importante pour SH3, celles-ci ne seraient ni dégradées dans le lysosome, ni recyclées à la surface cellulaire. L'accumulation des protéines non dégradées provoquerait dans un premier temps une morphologie non viable des endosomes précoces et dans un second temps une augmentation de la taille de la cellule jusqu'à ce qu'elle atteigne une masse critique. Afin de mieux

comprendre la régulation de cette voie, il faudrait dans un premier temps confirmer qu'il y a compétition *in vitro* entre UBPY et les chaînes de polyubiquitines K48 et K63, et de définir ainsi si UBPY a une préférence pour les chaînes K63 ou K48. Des expériences identiques pour AMSH sont à envisager. Afin de comprendre la régulation des DUBs, des expériences de compétition entre AMSH/UBPY, AMSH-Ub/UBPY, et AMSH/UBPY-Ub pourraient être réalisées. Il serait intéressant de comprendre comment UBPY est recrutée à la membrane de l'endosome précoce à de fortes concentrations en EGF.

Bibliographie:

1. Tyers, M., and Jorgensen, P. (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy, *Curr Opin Genet Dev* 10, 54-64.
2. Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J. M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade, *Nature* 373, 81-83.
3. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5249.
4. Hoeller, D., Hecker, C. M., Wagner, S., Rogov, V., Dotsch, V., and Dikic, I. (2007) E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins, *Mol Cell* 26, 891-898.
5. Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S. P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination, *Nat Biotechnol* 21, 921-926.
6. Pickart, C. M., and Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals, *Curr Opin Chem Biol* 8, 610-616.
7. Hurley, J. H. (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies, *Curr Opin Cell Biol* 20, 4-11.
8. Hurley, J. H. (2010) The ESCRT complexes, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 463-487.
9. Hurley, J. H., and Hanson, P. I. (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck, *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 556-566.
10. Wilkinson, K. D. (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes, *FASEB J* 11, 1245-1256.
11. Millard, S. M., and Wood, S. A. (2006) Riding the DUBway: regulation of protein trafficking by deubiquitylating enzymes, *J Cell Biol* 173, 463-468.
12. Clague, M. J., and Urbe, S. (2006) Endocytosis: the DUB version, *Trends Cell Biol* 16, 551-559.
13. Hurley, J. H., Lee, S., and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains, *Biochem J* 399, 361-372.
14. Hicke, L., Schubert, H. L., and Hill, C. P. (2005) Ubiquitin-binding domains, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610-621.
15. Barriere, H., Nemes, C., Lechardeur, D., Khan-Mohammad, M., Fruh, K., and Lukacs, G. L. (2006) Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells, *Traffic* 7, 282-297.
16. Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling, *Science* 315, 201-205.
17. Hicke, L., and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis, *Cell* 84, 277-287.
18. Dupre, S., Urban-Grimal, D., and Haguenaer-Tsapis, R. (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells, *Biochim Biophys Acta* 1695, 89-111.
19. Staub, O., and Rotin, D. (2006) Role of ubiquitylation in cellular membrane transport, *Physiol Rev* 86, 669-707.
20. Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1997) Endocytosis, *Physiol Rev* 77, 759-803.
21. Seto, E. S., Bellen, H. J., and Lloyd, T. E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways, *Genes Dev* 16, 1314-1336.
22. Pelkmans, L., and Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae, *Traffic* 3, 311-320.

23. Anderson, R. G. (1998) The caveolae membrane system, *Annu Rev Biochem* 67, 199-225.
24. Lafont, F., and Simons, K. (2001) Raft-partitioning of the ubiquitin ligases Cbl and Nedd4 upon IgE-triggered cell signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3180-3184.
25. Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway, *Mol Cell* 7, 661-671.
26. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation, *Nat Cell Biol* 5, 461-466.
27. Huang, F., Goh, L. K., and Sorkin, A. (2007) EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16904-16909.
28. Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation, *Dev Cell* 15, 209-219.
29. Duan, L., Miura, Y., Dimri, M., Majumder, B., Dodge, I. L., Reddi, A. L., Ghosh, A., Fernandes, N., Zhou, P., Mullane-Robinson, K., Rao, N., Donoghue, S., Rogers, R. A., Bowtell, D., Naramura, M., Gu, H., Band, V., and Band, H. (2003) Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis, *J Biol Chem* 278, 28950-28960.
30. Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., and Sorkin, A. (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain, *Mol Cell* 21, 737-748.
31. Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009) Ubiquitin in trafficking: the network at work, *Exp Cell Res* 315, 1610-1618.
32. Hicke, L., and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-172.
33. Piper, R. C., and Luzio, J. P. (2007) Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes, *Curr Opin Cell Biol* 19, 459-465.
34. Piper, R. C., and Katzmann, D. J. (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies, *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 519-547.
35. Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I, *Cell* 106, 145-155.
36. Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body, *Dev Cell* 3, 283-289.
37. Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., and Emr, S. D. (2002) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting, *Dev Cell* 3, 271-282.
38. Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., and Stenmark, H. (2002) Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes, *Nat Cell Biol* 4, 394-398.
39. Hirano, S., Kawasaki, M., Ura, H., Kato, R., Raiborg, C., Stenmark, H., and Wakatsuki, S. (2006) Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIIM in endosomal protein sorting, *Nat Struct Mol Biol* 13, 272-277.
40. Prag, G., Watson, H., Kim, Y. C., Beach, B. M., Ghirlando, R., Hummer, G., Bonifacino, J. S., and Hurley, J. H. (2007) The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting, *Dev Cell* 12, 973-986.

41. Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N., and Komada, M. (2003) STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif, *Mol Biol Cell* 14, 3675-3689.
42. McCullough, J., Row, P. E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M. J., and Urbe, S. (2006) Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery, *Curr Biol* 16, 160-165.
43. Kaneko, T., Kumasaka, T., Ganbe, T., Sato, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., and Tanaka, N. (2003) Structural insight into modest binding of a non-PXXP ligand to the signal transducing adaptor molecule-2 Src homology 3 domain, *J Biol Chem* 278, 48162-48168.
44. Nickerson, D. P., Russell, M. R., and Odorizzi, G. (2007) A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting, *EMBO Rep* 8, 644-650.
45. Teo, H., Gill, D. J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Vallis, Y., Emr, S. D., and Williams, R. L. (2006) ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes, *Cell* 125, 99-111.
46. Mayers, J. R., Fyfe, I., Schuh, A. L., Chapman, E. R., Edwardson, J. M., and Audhya, A. (2011) ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitylated cargoes simultaneously, *J Biol Chem* 286, 9636-9645.
47. Wollert, T., and Hurley, J. H. (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes, *Nature* 464, 864-869.
48. Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes, *Cell* 123, 773-786.
49. Wiborg, O., Pedersen, M. S., Wind, A., Berglund, L. E., Marcker, K. A., and Vuust, J. (1985) The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences, *EMBO J* 4, 755-759.
50. Pickart, C. M., and Rose, I. A. (1985) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides, *J Biol Chem* 260, 7903-7910.
51. McCullough, J., Clague, M. J., and Urbe, S. (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase, *J Cell Biol* 166, 487-492.
52. Sierra, M. I., Wright, M. H., and Nash, P. D. (2010) AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4, *J Biol Chem* 285, 13990-14004.
53. Tsang, H. T., Connell, J. W., Brown, S. E., Thompson, A., Reid, E., and Sanderson, C. M. (2006) A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex, *Genomics* 88, 333-346.
54. Nakamura, M., Tanaka, N., Kitamura, N., and Komada, M. (2006) Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes, *Genes Cells* 11, 593-606.
55. Komander, D., Clague, M. J., and Urbe, S. (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550-563.
56. Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. (2008) Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains, *Nature* 455, 358-362.
57. Mizuno, E., Kitamura, N., and Komada, M. (2007) 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase, *Exp Cell Res* 313, 3624-3634.
58. Gnesutta, N., Ceriani, M., Innocenti, M., Mauri, I., Zippel, R., Sturani, E., Borgonovo, B., Berruti, G., and Martegani, E. (2001) Cloning and characterization of mouse

- UBPY, a deubiquitinating enzyme that interacts with the ras guanine nucleotide exchange factor CDC25(Mm)/Ras-GRF1, *J Biol Chem* 276, 39448-39454.
59. Anandasabapathy, N., Ford, G. S., Bloom, D., Holness, C., Paragas, V., Seroogy, C., Skrenta, H., Hollenhorst, M., Fathman, C. G., and Soares, L. (2003) GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells, *Immunity* 18, 535-547.
 60. Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C., and Carraway, K. L., 3rd. (2004) Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8, *Mol Cell Biol* 24, 7748-7757.
 61. Kato, M., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP, *J Biol Chem* 275, 37481-37487.
 62. Wright, M. H., Berlin, I., and Nash, P. D. (2011) Regulation of Endocytic Sorting by ESCRT-DUB-Mediated Deubiquitination, *Cell Biochem Biophys* 60, 39-46.
 63. Row, P. E., Liu, H., Hayes, S., Welchman, R., Charalabous, P., Hofmann, K., Clague, M. J., Sanderson, C. M., and Urbe, S. (2007) The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation, *J Biol Chem* 282, 30929-30937.
 64. Row, P. E., Prior, I. A., McCullough, J., Clague, M. J., and Urbe, S. (2006) The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation, *J Biol Chem* 281, 12618-12624.
 65. Di Fiore, P. P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003) When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 491-497.
 66. Haglund, K., and Stenmark, H. (2006) Working out coupled monoubiquitination, *Nat Cell Biol* 8, 1218-1219.
 67. Woelk, T., Oldrini, B., Maspero, E., Confalonieri, S., Cavallaro, E., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2006) Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination, *Nat Cell Biol* 8, 1246-1254.
 68. Fallon, L., Belanger, C. M., Corera, A. T., Kontogiannea, M., Regan-Klapisz, E., Moreau, F., Voortman, J., Haber, M., Rouleau, G., Thorarinsdottir, T., Brice, A., van Bergen En Henegouwen, P. M., and Fon, E. A. (2006) A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling, *Nat Cell Biol* 8, 834-842.
 69. Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N., and Komada, M. (2005) Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes, *Mol Biol Cell* 16, 5163-5174.
 70. Alwan, H. A., and van Leeuwen, J. E. (2007) UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation, *J Biol Chem* 282, 1658-1669.
 71. Takeshita, T., Arita, T., Asao, H., Tanaka, N., Higuchi, M., Kuroda, H., Kaneko, K., Munakata, H., Endo, Y., Fujita, T., and Sugamura, K. (1996) Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM, *Biochem Biophys Res Commun* 225, 1035-1039.
 72. Endo, K., Takeshita, T., Kasai, H., Sasaki, Y., Tanaka, N., Asao, H., Kikuchi, K., Yamada, M., Chenb, M., O'Shea, J. J., and Sugamura, K. (2000) STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases, *FEBS Lett* 477, 55-61.
 73. Kanazawa, C., Morita, E., Yamada, M., Ishii, N., Miura, S., Asao, H., Yoshimori, T., and Sugamura, K. (2003) Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation, *Biochem Biophys Res Commun* 309, 848-856.

74. Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., and Rechsteiner, M. (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates, *J Biol Chem* 269, 7059-7061.
75. Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., and Rechsteiner, M. (1998) Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a, *J Biol Chem* 273, 5461-5467.
76. Fisher, R. D., Wang, B., Alam, S. L., Higginson, D. S., Robinson, H., Sundquist, W. I., and Hill, C. P. (2003) Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif, *J Biol Chem* 278, 28976-28984.
77. Miller, S. L., Malotky, E., and O'Bryan, J. P. (2004) Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation, *J Biol Chem* 279, 33528-33537.
78. Lim, J., Son, W. S., Park, J. K., Kim, E. E., Lee, B. J., and Ahn, H. C. (2011) Solution structure of UIM and interaction of tandem ubiquitin binding domains in STAM1 with ubiquitin, *Biochem Biophys Res Commun* 405, 24-30.
79. Stamenova, S. D., French, M. E., He, Y., Francis, S. A., Kramer, Z. B., and Hicke, L. (2007) Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains, *Mol Cell* 25, 273-284.
80. Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site, *Science* 259, 1157-1161.
81. Mongiovi, A. M., Romano, P. R., Panni, S., Mendoza, M., Wong, W. T., Musacchio, A., Cesareni, G., and Di Fiore, P. P. (1999) A novel peptide-SH3 interaction, *EMBO J* 18, 5300-5309.
82. Dikic, I., Szymkiewicz, I., and Soubeyran, P. (2003) Cbl signaling networks in the regulation of cell function, *Cell Mol Life Sci* 60, 1805-1827.
83. Jozic, D., Cardenes, N., Deribe, Y. L., Moncalian, G., Hoeller, D., Groemping, Y., Dikic, I., Rittinger, K., and Bravo, J. (2005) Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins, *Nat Struct Mol Biol* 12, 972-979.
84. Warren, D. T., Andrews, P. D., Gourlay, C. W., and Ayscough, K. R. (2002) Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics, *J Cell Sci* 115, 1703-1715.
85. Gourlay, C. W., Dewar, H., Warren, D. T., Costa, R., Satish, N., and Ayscough, K. R. (2003) An interaction between Sla1p and Sla2p plays a role in regulating actin dynamics and endocytosis in budding yeast, *J Cell Sci* 116, 2551-2564.
86. Stamenova, S. D., Dunn, R., Adler, A. S., and Hicke, L. (2004) The Rsp5 ubiquitin ligase binds to and ubiquitinates members of the yeast CIN85-endophilin complex, Sla1-Rvs167, *J Biol Chem* 279, 16017-16025.
87. Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002) The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met, *Nature* 416, 187-190.
88. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors, *Nature* 416, 183-187.
89. Kowanetz, K., Husnjak, K., Holler, D., Kowanetz, M., Soubeyran, P., Hirsch, D., Schmidt, M. H., Pavelic, K., De Camilli, P., Randazzo, P. A., and Dikic, I. (2004) CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors, *Mol Biol Cell* 15, 3155-3166.
90. He, Y., Hicke, L., and Radhakrishnan, I. (2007) Structural basis for ubiquitin recognition by SH3 domains, *J Mol Biol* 373, 190-196.

91. Bezsonova, I., Bruce, M. C., Wiesner, S., Lin, H., Rotin, D., and Forman-Kay, J. D. (2008) Interactions between the three CIN85 SH3 domains and ubiquitin: implications for CIN85 ubiquitination, *Biochemistry* 47, 8937-8949.
92. Raiborg, C., and Stenmark, H. (2002) Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins, *Cell Struct Funct* 27, 403-408.
93. Kong, C., Su, X., Chen, P. I., and Stahl, P. D. (2007) Rin1 interacts with signal-transducing adaptor molecule (STAM) and mediates epidermal growth factor receptor trafficking and degradation, *J Biol Chem* 282, 15294-15301.
94. Han, L., Wong, D., Dhaka, A., Afar, D., White, M., Xie, W., Herschman, H., Witte, O., and Colicelli, J. (1997) Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4954-4959.
95. Lange, A. (2010) Structural characterization of the interaction of STAM2's ubiquitin binding domains with ubiquitin chains by NMR. Cooperativity or not, that is the question!, Université Claude Bernard -Lyon1, Lyon.
96. Mulder, F. A. A., van Tilborg, P. J. A., Kaptein, R., and Boelens, R. (1999) Microsecond time scale dynamics in the RXR DNA-binding domain from a combination of spin-echo and off-resonance rotating frame relaxation measurements, *Journal of Biomolecular Nmr* 13, 275-288.
97. Van de Ven, F. J. M. (1995) *Multidimensional NMR in liquids : basic principles and experimental methods*, New-York.
98. Cavanagh, J. F., W.J.; Palmer A.G., Rance M.; Skelton, N.J. (2007) *Spectroscopie RMN des protéines: Principes et pratique*.
99. Jain, N. U., Venot, A., Umemoto, K., Leffler, H., and Prestegard, J. H. (2001) Distance mapping of protein-binding sites using spin-labeled oligosaccharide ligands, *Protein Sci* 10, 2393-2400.
100. Kosen, P. A. (1989) Spin labeling of proteins, *Methods Enzymol* 177, 86-121.
101. Berliner, L. J., Grunwald, J., Hankovszky, H. O., and Hideg, K. (1982) A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition, *Anal Biochem* 119, 450-455.
102. Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., and Sali, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 291-325.
103. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-y., Pieper, U., and Sali, A. (2006) Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller, *Current Protocols in Bioinformatics Supplement* 15, 5.6.1 - 5.6.30.
104. Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints, *Journal of Molecular Biology* 234, 779-815.
105. Fiser, A., Do, R. K. G., and Šali, A. (2000) Modeling of loops in protein structures, *Protein Science* 9, 1753-1773.
106. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) The ¹³C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data, *Journal of Biomolecular NMR* 4, 171-180.
107. Lange, A., Hoeller, D., Wienk, H., Marcillat, O., Lancelin, J. M., and Walker, O. (2010) NMR Reveals a Different Mode of Binding of the Stam2 VHS Domain to Ubiquitin and Diubiquitin, *Biochemistry*.
108. Palmer, A. G., 3rd, Kroenke, C. D., and Loria, J. P. (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules, *Methods Enzymol* 339, 204-238.

109. Swanson, K. A., Kang, R. S., Stamenova, S. D., Hicke, L., and Radhakrishnan, I. (2003) Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation, *EMBO J* 22, 4597-4606.
110. Su, X. C., Jergic, S., Ozawa, K., Burns, N. D., Dixon, N. E., and Otting, G. (2007) Measurement of dissociation constants of high-molecular weight protein-protein complexes by transferred 15N-relaxation, *J Biomol NMR* 38, 65-72.
111. Daviet, L., and Colland, F. (2008) Targeting ubiquitin specific proteases for drug discovery, *Biochimie* 90, 270-283.
112. Berlin, I., Schwartz, H., and Nash, P. D. (2010) Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8.STAM complex, *J Biol Chem* 285, 34909-34921.
113. Kim, M. S., Kim, J. A., Song, H. K., and Jeon, H. (2006) STAM-AMSH interaction facilitates the deubiquitination activity in the C-terminal AMSH, *Biochem Biophys Res Commun* 351, 612-618.
114. Lange, A., Hoeller, D., Wienk, H., Marcillat, O., Lancelin, J.-M., and Walker, O. (2011) NMR Reveals a Different Mode of Binding of the Stam2 VHS Domain to Ubiquitin and Diubiquitin, *Biochemistry* 50, 48-62.

Conclusion générale

Les objectifs initiaux de ce travail étaient d'une part d'appliquer la RMN à la compréhension du mécanisme fonctionnel de la créatine kinase musculaire (CK-MM), une enzyme homo-dimérique, en étudiant sa forme libre puis en présence des substrats et cofacteurs (ATP/ADP) jusqu'au complexe abortif TSAC : MgADP - créatine - ion nitrate, qui représente une forme inhibée de l'enzyme. D'autre part, nous nous étions fixé l'objectif de caractériser les interactions du domaine SH3 de la protéine STAM2 avec l'ubiquitine. La technique RMN, utilisée au cours de cette thèse, est particulièrement sensible à la dynamique des systèmes interactifs ainsi qu'à leurs structures, avec une résolution atomique.

A partir d'expériences de perturbation de déplacement chimique et de relaxation nous avons pu conforter le modèle d'indépendance des sous unités de la CK-MM en présence de MgADP -créatine - ion nitrate, proposé par l'équipe d'Olivier Marcillat (1). Nous avons également mis en évidence que la boucle 320s dans la forme TSAC est fortement affectée par son interaction avec MgADP. Cette boucle joue un rôle important dans la catalyse enzymatique grâce à l'interaction ionique entre les résidus Asp325 de la boucle 320s et His66 de la boucle 60s. Comme démontré dans les structures cristallines, cette interaction permet la fermeture du site actif et l'alignement optimal des substrats dans le site actif.

En ce qui concerne la caractérisation du domaine SH3 de STAM2, des expériences de titration et de relaxation ont été enregistrées sur le construit UIM-SH3 de STAM2 en présence et en absence d'ubiquitine. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que ce domaine était capable d'interagir avec l'ubiquitine avec une affinité de $251 \pm 25 \mu\text{M}$ (20 mM phosphate, sans NaCl). Les résidus du domaine SH3 impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine sont localisés sur les boucles RT, n-Src et l'hélice 3₁₀. Ces résidus sont relativement conservés dans l'évolution et sont de nature hydrophobe et chargée. Du côté de l'ubiquitine, les résidus impliqués dans l'interaction avec le domaine SH3 sont localisés sur le patch hydrophobe constitué des résidus Leu8, Ile44, et Val70. Le domaine SH3 de STAM2 peut également interagir avec un peptide dérivé d'une dé-ubiquitinase UBPY (2), avec un K_d estimé par fluorescence à $27 \mu\text{M}$ (3). La surface d'interaction sur le domaine SH3 de STAM2 pour le peptide - UBPY fait également intervenir des résidus localisés sur les boucles RT, n-Src et hélice 3₁₀. A partir d'expériences de compétition *in vitro* sur le domaine SH3 de

STAM2 entre le peptide – UBPY et l'ubiquitine nous avons mis en évidence qu'UBPY est plus affine pour le domaine SH3 que l'ubiquitine. Ce résultat nous a permis de suggérer que, *in vivo*, la forte affinité des DUBs (dé-ubiquitinase) pour le domaine SH3 était importante pour la voie de sauvetage des récepteurs à la surface cellulaire et pour l'internalisation des récepteurs à dégradés dans les corps multi-vésiculaires (MVBs).

Le point commun aux deux sujets développés au cours de ma thèse est la possible coopérativité au sein des systèmes interactifs étudiés :

- Entre les deux monomères de la CK-MM en présence de ses substrats fonctionnels de l'enzyme.

- Et entre les domaines UIM et SH3 de la protéine STAM2 en présence de chaîne de poly-ubiquitine.

La notion de coopérativité est souvent confondue avec la notion d'allostérie. Une enzyme dite allostérique possède un site actif et un site modulateur sur lequel vient se fixer l'effecteur allostérique. Lors de la fixation du substrat dans son site actif, il y a modification du site modulateur permettant la fixation de l'effecteur allostérique. Les sous-unités d'une enzyme ou les domaines d'une protéine sont dits coopératives lorsque la fixation d'un ligand (ou protéine) sur un site d'interaction modifie l'affinité du second site pour la fixation d'un même ligand. Si l'affinité du second site augmente, on parle de coopérativité positive. Si l'affinité du second site diminue, on parle de coopérativité négative. Dans le cas des enzymes, la coopérativité entre sous-unités est souvent liée à un changement conformationnel.

La CK-MM est une enzyme qui catalyse le transfert réversible d'un groupement phosphate de MgATP vers la créatine pour former de la phosphocréatine, du MgADP et un proton. Des études de cinétiques enzymatiques couplés à la mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence que les sous-unités de la CK-MM sont coopératives dans le sens de la formation de MgADP et indépendantes dans le sens de la formation de MgATP (4). Aucune structure de la CK-MM en présence de ces substrats fonctionnels n'a été résolue, ainsi nous n'avons aucune information sur le comportement des sous-unités et sur les changements conformationnels en présence de ces substrats. La RMN permettrait d'obtenir des informations sur les changements de dynamique et de l'environnement chimique de la boucle 320s en présence des substrats fonctionnels de la CK-MM. A l'aide de la RMN nous pourrions également observer les fluctuations de la structure et nous informer ainsi sur le comportement des deux sous-unités de l'enzyme.

La possible coopérativité des domaines UIM et SH3 de la protéine STAM2 en présence d'une di-ubiquitine, peut être mise en évidence par la comparaison des K_d de ces domaines en interaction avec l'ubiquitine seule (notre étude : CSP) et en présence de di-ubiquitine. Il existe différentes méthodes de détermination de constante d'affinité telles que :

- L'ITC (calorimétrie de titrage isotherme) permet de déterminer des constantes d'association comprises entre 10^2 à 10^9 M^{-1} . Lors d'une expérience d'ITC, le "ligand" est titré dans une solution de la "macromolécule", contenue dans une cellule (ou *vice versa*). L'expérience est réalisée à température constante. Après chaque ajout d'une petite quantité de ligand, la chaleur libérée ou absorbée est mesurée par rapport à une cellule de référence remplie de solution tampon. La différence de chaleur est exprimée comme la puissance électrique requise pour maintenir une température constante entre la cellule contenant l'échantillon et la cellule de référence.

- La fluorescence : Les propriétés optiques d'une protéine changent très souvent en fonction de la fixation d'un ligand ce qui entraîne des changements des spectres d'absorption ou d'émission des résidus aromatiques (Tyr, Trp essentiellement). Le domaine SH3 possède deux résidus tryptophane qui sont impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine. Il sera donc facile de déterminer l'affinité pour ce domaine. Par contre le domaine UIM de STAM2 ne possède aucun résidu aromatique, l'utilisation de cette méthode nécessitera une modification du domaine UIM par la fixation d'une sonde de fluorescence. Cette sonde ne devra pas modifier la structure du construit UIM- SH3 et ne pas modifier la surface d'interaction avec l'ubiquitine.

- La résonance plasmonique de surface (SPR) est une méthode de caractérisation de la liaison d'un "ligand" sur un "récepteur" adsorbé à la surface d'une couche métallique. Le système détecte la faible variation de l'indice de réfraction de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs. Le signal mesuré est le changement de l'angle de résonance. Les constantes de dissociation typiques pour ces expériences sont comprises entre $K_d = 10 \text{ mM}$ et $K_d = 1 \text{ pM}$.

- La RMN permet, entre autre, la mesure de constante d'affinité en traçant les variations de déplacement chimique en fonction du rapport de concentration entre les partenaires. Au laboratoire, il a été mis en évidence récemment par cette technique que les domaines VHS et UIM de la protéine STAM2 sont coopératifs en présence de chaîne de di-ubiquitine (5).

La RMN est un outil puissant qui permet la caractérisation détaillée de l'interaction entre une protéine et son partenaire grâce à des expériences de relaxation et/ou de perturbation de

déplacement chimique. A partir de cet outil nous pouvons également obtenir la structure 3D du complexe étudié. La RMN est une méthode non destructrice et permet l'étude d'édifice macromoléculaire dans un milieu liquide.

Bibliographie :

1. Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., and Vial, C. (2003) Changes in MM-CK conformational mobility upon formation of the ADP-Mg(2+)-NO(3)(-)-creatine transition state analogue complex as detected by hydrogen/deuterium exchange, *Biochemistry* 42, 13596-13604.
2. Kaneko, T., Kumasaka, T., Ganbe, T., Sato, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., and Tanaka, N. (2003) Structural insight into modest binding of a non-PXXP ligand to the signal transducing adaptor molecule-2 Src homology 3 domain, *J Biol Chem* 278, 48162-48168.
3. Kato, M., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP, *J Biol Chem* 275, 37481-37487.
4. Hornemann, T., Rutishauser, D., and Wallimann, T. (2000) Why is creatine kinase a dimer? Evidence for cooperativity between the two subunits, *Biochim Biophys Acta* 1480, 365-373.
5. Lange, A., Hoeller, D., Wienk, H., Marcillat, O., Lancelin, J. M., and Walker, O. (2010) NMR Reveals a Different Mode of Binding of the Stam2 VHS Domain to Ubiquitin and Diubiquitin, *Biochemistry*.

Liste des abréviations

Introduction:

ADN: Adénosine Desoxyribose Nucléique
CPMG: Carr Purcell Meiboom Gill
CSP: Chemical Shift Perturbation ou perturbation de déplacement chimique
ITC: Isothermal Titration Calorimetry
nOe: Nuclear Overhauser Effect
PDZ: Post synaptic Density Protein
RDC: Residual dipolar coupling ou couplage dipolaire résiduel
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
SH2: Src Homology 2
SH3: Src Homology 3
SPR: Surface Plasmon Resonance

Chapitre 1:

AK: Arginine Kinase
ANT: Adenine Nucleotide Translocase
ATP: adénosine triphosphate
BMD: myopathie de Becker
CK: Créatine Kinase
CK-MgADP: sous-unité de la CK en interaction avec MgADP
CK-MM: Créatine Kinase Musculaire
CKmt: Créatine Kinase mitochondriale
CK-TSAC: sous-unité de la CK en interaction avec le TSAC
Cr: créatine
CSA: Chemical Shift Anisotropy
CTD: C-Terminal Domain
DMD: myopathie de Duchenne
DTT: dithiothréitol
EDTA: Ethylène Diamine Tetracetic Acid
EXSY: Exchange Spectroscopy
FRET: Förster Resonance Energy Transfer
GdnK: Guanidino-phosphagènes Kinase
HM-CK: Créatine Kinase Musculaire Humaine
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation
IPTG: IsoPropyl- β -D-ThioGalactopyranoside
IRS: Interface Residues Segments
LK: Lombricine Kinase
Motif PGHP: motif Proline-Glycine-Histidine-Proline
Mw: poids moléculaire
NTD: N_Terminal Domain
PCr: Phosphocréatine
Pgdn: phosphagène
pI: point isoélectrique
PRE: Paramagnetic Relaxation Enhancement
rm-CK: Créatine kinase musculaire de lapin

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
sCKmt: Créatine Kinase mitochondriale Sarcomérique
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS- PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED: NNN'N'-Tetraméthyl-éthylène diamine
Tc-CK: Créatine Kinase de *torpedo californica*
TROSY: Transverse Relaxation Optimised Spectroscopy
TSAC: Transition State Analogue Complex
uCKmt: Créatine Kinase mitochondriale Ubiquitaire
VDAC: Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein

Chapitre 2:

AMSH: associated molecule of SH3 domaine of STAM
CIN85: Cbl-interacting protein of 85 kDa
DUB: Déubiquitinase ou enzyme de déubiquitination
EGF: Epathocyte grow factor
EGFR: Récepteur de EGF
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Hrs: Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate
IL-2R : Récepteur d'interleukine 2
ILV: Intraluminal vesicule
MIT (domaine) : Microtubule Interacting and Transport (domain)
MTSL: 1-oxyl-2,2,5,5,-tetra-methyl-3-pyrroline-3-methyl)methanesulfonate
MVB: Multivesicular body : corps multi vésiculaire
PPII: poly-proline de type 2
PRUb: protéines de reconnaissance à l'ubiquitine
STAM: Signal Transducing Adaptator Molecular
STAM2: Signal Transducing Adaptator Molecular 2
Ub: Ubiquitine
UBDs: Ubiquitin Binding Domain
UBPY: Ubiquitin specific protease Y
UIM: motif d'interaction à l'ubiquitine
VHS: Vps27, Hrs/STAM

Abréviation des 20 acides aminés :

Nom	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Nom	Code 3 lettres	Code 1 lettre
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
Aspartate	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Cystéine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamate	Glu	E	Serine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

Annexes

A-1 Tableau des déplacements chimiques en ^1H , ^{15}N et ^{13}C pour UIM-SH3

numéros de résidus	acide aminé	valeurs de déplacement chimique (en ppm)			
		N	HN	CA	CO
163	Gly	--	--	--	--
164	Ala	--	--	--	--
165	Ala	--	--	52,74	177,89
166	Met	119,95	8,62	55,72	176,83
167	Gly	110,34	8,53	45,41	174,19
168	Met	120,21	8,32	55,64	176,23
169	Asn	119,83	8,58	53,59	--
170	Lys	122,07	8,40	56,65	176,23
171	Asn	119,83	8,58	53,59	--
172	Lys	122,18	8,38	57,40	176,99
173	Glu	120,97	8,55	57,81	177,16
174	Asp	120,21	8,32	55,51	--
175	Glu	121,70	8,29	57,84	--
176	Asp	121,38	8,44	55,70	177,86
177	Ile	122,43	8,06	62,99	177,05
178	Ala	124,66	8,15	54,12	179,39
179	Lys	119,71	8,14	57,55	177,38
180	Ala	123,76	8,03	53,98	--
181	Ile	120,54	8,14	63,07	177,51
182	Glu	123,17	8,22	58,15	--
183	Leu	121,77	8,28	56,66	178,60
184	Ser	116,27	8,25	59,93	175,75
185	Leu	122,89	8,16	56,69	178,68
186	Gln	119,30	8,12	57,35	177,28
187	Glu	120,74	8,23	57,74	--
188	Gln	120,27	8,27	56,88	176,82
189	Lys	121,26	8,18	57,14	177,15
190	Gln	120,32	8,25	56,26	175,87
191	Gln	120,44	8,45	56,22	176,18
192	His	120,77	8,33	56,20	175,27
193	Thr	116,23	8,19	62,15	174,38
194	Glu	123,80	8,63	56,69	--
195	Thr	116,68	8,35	62,27	--
196	Lys	124,38	8,43	56,47	176,44
197	Ser	117,26	8,37	58,18	174,23
198	Leu	124,21	8,26	55,37	--
199	Tyr	120,54	8,14	55,57	177,04
200	Pro	--	--	63,25	--
201	Ser	116,46	8,51	58,51	174,88
202	Ser	117,77	8,45	58,52	174,54
203	Glu	122,60	8,44	56,88	176,55
204	Ile	121,90	8,11	61,51	--
205	Gln	124,46	8,45	55,82	175,95

valeurs de déplacement chimique (en ppm)					
numéros de résidus	acide aminé	N	HN	CA	CO
206	Leu	123,68	8,36	55,49	177,18
207	Asn	118,83	8,46	53,43	174,88
208	Asn	118,97	8,33	53,44	175,04
209	Lys	121,54	8,24	56,54	176,38
210	Val	121,45	8,13	62,06	175,54
211	Ala	128,69	8,34	52,42	176,81
212	Arg	121,62	8,34	55,62	--
213	Lys	122,22	8,38	55,76	175,68
214	Val	113,29	8,89	59,00	172,83
216	Ala	127,25	8,88	52,78	179,16
217	Leu	126,33	9,54	55,97	175,74
218	Tyr	113,51	7,00	53,90	173,46
219	Asp	118,19	8,60	54,82	175,45
220	Phe	121,86	8,44	58,03	172,29
221	Glu	127,78	7,70	53,95	173,77
222	Ala	127,06	7,75	53,31	177,89
223	Val	121,48	8,77	63,43	176,82
224	Glu	119,15	7,75	54,22	177,94
225	Asp	120,34	8,94	56,51	176,20
226	Asn	113,80	7,95	52,32	175,99
227	Glu	119,91	7,48	55,78	175,27
228	Leu	126,04	8,95	53,59	173,01
229	Thr	118,75	7,57	61,93	174,84
230	Phe	119,78	9,00	55,87	173,93
231	Lys	118,70	8,17	52,90	175,89
232	His	118,23	9,63	57,45	174,04
233	Gly	112,24	8,76	45,28	174,33
234	Glu	119,52	7,86	56,78	175,28
235	Ile	119,68	8,37	58,51	176,83
236	Ile	129,70	8,91	60,56	--
237	Ile	125,94	8,47	60,20	175,95
238	Val	127,80	9,18	64,36	175,10
239	Leu	127,92	9,28	55,15	177,48
240	Asp	116,09	7,65	55,12	174,52
241	Asp	128,47	8,17	52,19	175,43
242	Ser	115,02	8,23	61,68	175,42
243	Asp	124,99	8,69	53,83	--
244	Ala	122,34	8,37	54,81	179,45
245	Asn	113,31	8,48	54,81	174,96
246	Trp	123,69	8,81	56,20	--
247	Trp	126,05	8,48	52,83	172,95
248	Lys	119,54	8,74	55,01	176,96
249	Gly	116,20	9,81	45,78	169,43
250	Glu	118,67	9,15	54,61	175,12
251	Asn	122,86	9,14	52,30	--
252	His	--	--	58,73	175,96
253	Arg	118,85	8,10	56,62	176,63
254	Gly	107,88	7,77	45,28	169,51
255	Ile	117,97	8,04	59,26	177,17
256	Gly	112,33	9,06	45,82	171,24

Valeurs de déplacement chimique (en ppm)					
numéros de résidus	acide aminé	N	HN	CA	CO
257	Leu	120,55	9,35	54,33	177,65
258	Phe	116,11	9,24	55,46	--
260	Ser	121,86	7,76	60,21	--
261	Asp	116,85	8,33	54,13	176,44
262	Phe	119,39	8,03	57,98	175,06
263	Val	108,87	7,29	58,54	173,34
264	Thr	112,59	8,82	58,18	172,87
265	Thr	116,41	8,38	62,68	--
267	Leu	124,49	8,61	55,94	177,27
268	Asn	117,65	8,20	53,53	174,71
269	Ile	120,82	8,00	61,44	175,95
270	Glu	124,84	8,57	56,69	176,54
271	Thr	115,02	8,23	61,68	173,69
272	Glu	128,13	8,08	58,19	--

A-2 Prédiction de structure secondaire par le logiciel CSI à partir des déplacements chimiques ^1H , $^{13}\text{C}\alpha$ et ^{13}CO .

H	C_α	CO	Consensus
NA	C 2 – 8	C 2 – 9	NA
NA	H 9 – 24	H 10 – 26	NA
NA	C 25 – 49	C 27 – 49	NA
NA	B 50 -52	B 50 -52	NA
NA	C 53- 62	C 53- 53	NA
NA	B 63 – 68	B 54 – 58	NA
NA	C 69 – 71	C 59 – 63	NA
NA	B 72 – 74	B 64 – 69	NA
NA	C 75 -82	C 70 -70	NA
NA	B 83 – 85	B 71 – 78	NA
NA	C 86 -109	C 79 -82	NA
NA		B 83 – 88	NA
NA		C 89 – 97	NA
NA		B 98 - 101	NA
NA		C 102 - 109	NA

H: helice alpha; B: Brin bêta; C: coiled coil; NA: Non accessible.

A-3 Expériences de titration sur le complexe UIM-SH3/ubiquitine

- *Expérience de titration ^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine en présence de sel*

La concentration initiale en UIM-SH3 est de 220 μM , on ajoute après chaque HSQC un volume d'ubiquitine concentrée à 20 mM.

Volume total en μL	[Ubiquitine] en μM	[UIM-SH3] en μM	Rapport [Ub]/[UIM-SH3]
250	0	220	0
251	80,5	219	0,4
252	160	218	0,7
253	240	217	1,1
254	318	217	1,5
256	473	215	2,2
260	777	212	3,7
264	107	208	5,1
268	136	205	6,6
272	163	202	8,1
278	203	198	10,3
284	242	194	12,5

- *Expérience de titration ^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine en absence de sel.*

La concentration initiale en UIM-SH3 est de 250 μM , on ajoute après chaque HSQC un volume d'ubiquitine concentrée à 4,97 mM.

Volume total en μL	[Ubiquitine] en μM	[UIM-SH3] en μM	Rapport [Ub]/[UIM-SH3]
200	0	250	0
204	97,5	245	0,40
208	191	240	0,80
212	281	236	1,20
222	493	225	2,18
242	863	207	4,17
262	1180	191	6,16
292	1570	171	9,14
322	1880	155	12,12

- *Expérience de titration ^{15}N -ubiquitine/ ^{14}N -UIM-SH3.*

La concentration initiale en ubiquitine est de 180 μM , on ajoute après chaque HSQC un volume d'UIM-SH3 concentrée à 1,5 mM.

[Ubiquitine] en μM	[UIM-SH3] en μM	Rapport [UIM-SH3]/[Ub]
180	0	0
180	53	0,29
180	122,1	0,67
180	150,52	0,83
180	198,43	1,10
180	302	1,67
180	534	3
180	809	4,49
180	1073	5,96
180	1323	7,35
180	1670	9,27

- *Expérience de titration ^{15}N -UIM-SH3/ ^{14}N -ubiquitine [L8AI44A] en présence de sel.*

La concentration initiale en UIM-SH3 est de 220 μM , on ajoute après chaque HSQC un volume d'ubiquitine mutée concentrée à 20 mM.

Volume total en μL	[Ubiquitine muté] en μM	[UIM-SH3] en μM	Rapport [Ub muté]/[UIM-SH3]
250	0	220	0
253	240	217	1,1
256	473	215	2,2
259	702	212	3,31
264	1070	208	5,14
269	1430	204	6,98
274	1770	201	8,81
279	2100	197	10,65
284	2420	194	12,49
294	3020	187	16,16
304	3590	181	19,83
314	4120	175	23,51
324	4610	170	27,18

A-4 Expériences de compétition du peptide UBPY et ubiquitine sur UIM-SH3.

- *Expérience de titration ^{15}N -UIM-SH3/peptide UBPY/ ^{14}N -ubiquitine en absence de sel.*

La concentration initiale en UIM-SH3 est de 250 μM , on ajoute après chaque HSQC un volume de peptide UBPY jusqu'à saturation du domaine SH3 d'UIM-SH3. Une fois la saturation atteinte, nous ajoutons un volume faible d'ubiquitine à 4,97 mM.

Volume total en μL	[Ub] en μM	[UIM-SH3] en μM	Rapport [Ub]/[UIM-SH3]
454	131	99,1	1,33
478	250	94,1	2,65

- *Expérience de titration ^{15}N -UIM-SH3 / ^{14}N -ubiquitine/peptide UBPY en absence de sel.*

La concentration initiale en UIM-SH3 est de 220 μM , on ajoute après chaque HSQC un volume d'ubiquitine non marquée concentrée à 4,97 mM.

Volume total en μL	[Ub] en μM	[UIM-SH3] en μM	Rapport [Ub]/[UIM-SH3]
180	0	220	0
184	108	215	0,5
188	211	211	1
192	311	206	1,51
202	541	196	2,76
230	1080	172	6,28

Au rapport [ubiquitine]/[UIM-SH3] égale à 6,28, on ajoute un volume faible de peptide UBPY.

