



HAL
open science

Interactions et stabilité des protéines étudiées par spectroscopies infrarouge et Raman

Mireille Khalil

► **To cite this version:**

Mireille Khalil. Interactions et stabilité des protéines étudiées par spectroscopies infrarouge et Raman. Autre. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAF011 . tel-01390989

HAL Id: tel-01390989

<https://theses.hal.science/tel-01390989>

Submitted on 2 Nov 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7140, Chimie de la matière complexe

THÈSE présentée par :

Mireille Khalil

Soutenue le : **26 Janvier 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Interactions et stabilité des protéines
étudiées par spectroscopies Infrarouge
et Raman**

THÈSE dirigée par :
Pr. HELLWIG Petra

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. LECOMTE Sophie

Directeur de recherche, Université de Bordeaux

Dr. GRAUBY-HEYWANG Christine

Maître de conférences, Université de Bordeaux

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Pr. Petra Hellwig de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, qui m'a accordé ces différents sujets de recherche et qui m'a témoigné toute sa confiance au cours de cette thèse. Je la remercie pour son aide et ses conseils.

Je tiens également à remercier les membres de jury, le Dr. Sophie Lecomte, directeur de recherche à l'Université de Bordeaux et le Dr. Christine Grauby-Heywang Maître de conférences à l'Université de Bordeaux pour avoir accepté de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Dr. Zahia Boubegtiten pour l'aide précieuse qu'elle m'a accordée mais surtout pour ses conseils, sa patience et son enthousiasme. Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta vie et surtout d'avoir un poste fixe.

Je remercie profondément mon amie Alicia Schirer avec qui j'ai partagé des excellents moments pendant la thèse. Je te remercie pour ton aide ton soutien et surtout pour ton encouragement.

Je remercie également Batoul pour son soutien au quotidien et sa sympathie ainsi que son aide.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire Fred, Natalia, Sinan et Anton ainsi que tous les stagiaires.

Je remercie Soumia pour toutes les tâches administratives et Martine pour son soutien, encouragement et sa sympathie.

Je tiens également à remercier les collaborateurs Pr. Nadja Hellmann de m'avoir fourni les échantillons d'hémocyanines et son aide dans l'interprétation des résultats et Pr. Rita Bernhardt pour les échantillons d'adrénodoxine et adrénodoxine réductase.

Je remercie l'Université de Strasbourg et la fondation recherche médicale pour le financement de ma thèse.

Je rends hommage à mes parents, mon frère et mes sœurs pour leurs encouragements et leur soutien tout le long de mes années d'études. Merci à mes amis Stéphanie, Alicia, Julien, Tony, Anthony..... Enfin merci à David qui n'a pas cessé de m'épauler et de me soutenir au cours de la thèse.

Liste des abréviations

IPP	Interactions protéines-protéines
Adx	Adrénodoxine
AdR	Adrénodoxine réductase
FAD	Flavine adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
CYP	Cytochrome
FeS	Cluster fer-soufre
DHR	Discs large Homology Region
hScrib	Scribble humaine
HPV	Papillomavirus humain
HTLV1 Tax1	Virus T-lymphotrope humain de type1
MAGI	Membrane-associated guanylate Kinase
Hcs	Hémocyanines
kDa	Kilo Dalton
MDa	Méga Dalton
<i>E. californicum</i>	<i>Eurypelma californicum</i>
<i>L. polyphemus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>
<i>A. leptodactylus</i>	<i>Astacus leptodactylus</i>
MWC	Modèle Monod-Wyman-Changeux
Oxy	Oxygéné
Désoxy	Désoxygéné
Réoxy	Réoxygéné
MIR	Moyen infrarouge
FIR	Lointain infrarouge
ATR	Réflexion totale atténuée
KPI	Phosphate de potassium
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane
ϵ	Coefficient d'extinction molaire

ν	Vibration d'élongation
ν^{as}	Vibration d'élongation antisymétrique
ν^{s}	Vibration d'élongation symétrique
δ	Vibration de déformation
K	Kelvin

Liste des acides aminés

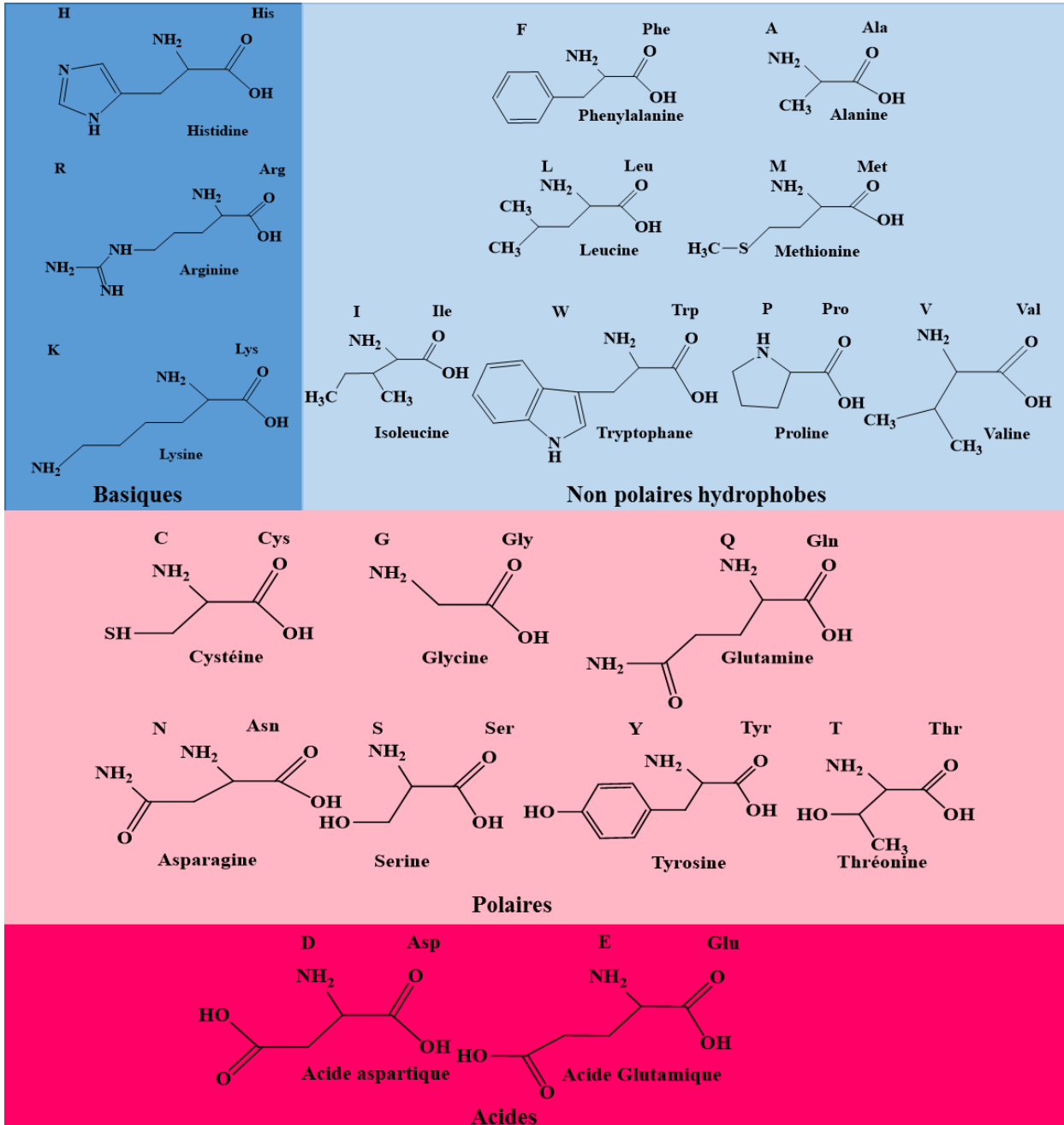


Table des matières

Chapitre 1- INTRODUCTION

1 Les interactions protéines-protéines et protéines-peptides.....	1
1.1 Les différents types d'interactions entre protéines.....	2
1.1.1 Les interactions de Van der Waals	2
1.1.2 Les liaisons hydrogènes	4
1.1.3 Les interactions hydrophobes.....	5
1.1.4 Les interactions électrostatiques.....	6
1.2 Différentes techniques utilisées pour étudier les interactions protéines-protéines	7
1.2.1 Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET).....	7
1.2.2 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)	7
1.2.3 La résonance plasmonique de surface (SPR)	8
1.2.4 L'analyse calorimétrique par dosage isotherme (ITC).....	8
1.2.5 La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	8
1.2.6 La spectrométrie de masse	8
1.3 Interaction entre l'adrénodoxine, l'adrénodoxine réductase et le cytochrome P450	9
1.3.1 L'adrénodoxine	9
1.3.2 L'adrénodoxine réductase	10
1.3.3 Le cytochrome P450 (CYP106A2)	11
1.3.4 Le mécanisme de transfert d'électrons entre Adx, AdR et P450	12
1.3.5 Le site d'interaction entre l'Adx et l'AdR	14
1.3.6 Le site d'interaction entre l'Adx et le P450	16
1.3.7 Les différentes méthodes d'analyses présentes dans la littérature pour caractériser l'interaction entre l'Adx, l'AdR et le P450	17
1.4 Les domaines PDZ	18

1.4.1 La structure des domaines PDZ	18
1.4.2 Le mécanisme de liaison du domaine PDZ.....	19
1.4.3 Le Scribble humain et ses domaines PDZ.....	21
1.4.4 Les domaines PDZ et leur interactions avec les protéines virales	21
1.4.5 Les différentes techniques présentes dans la littérature pour étudier l'interaction entre les domaines PDZ et les protéines virales	22
2 La stabilité des protéines	23
2.1 Le repliement et le dépliement des protéines	23
2.2 Les facteurs qui affectent la stabilité des protéines	24
2.2.1 La température.....	25
2.3 Les hémocyanines	26
2.3.1 L'hémocyanine de la tarentule <i>Eurypelma californicum</i>	27
2.3.2 L'hémocyanine du limule <i>Limulus polyphemus</i>	28
2.3.3 L'hémocyanine de l'écrevisse <i>Astacus leptodactylus</i>	29
2.4 Le transport de l'oxygène par les protéines respiratoires.....	29
2.4.1 Les propriétés du site actif de l'hémocyanine	29
2.4.2 La coopérativité de la liaison dioxygène.....	30
2.4.3 Les différentes méthodes d'analyses présentes dans la littérature pour caractériser les hémocyanines.....	32
Objectifs de la thèse	34
3 Références bibliographiques	35

Chapitre 2- MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

1	Techniques de caractérisation	46
1.1	La spectroscopie	46
1.2	Spectroscopie UV/Visible	47
1.3	Spectroscopie infrarouge	48
1.4	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	49
1.4.1	Les éléments optiques et l'appareillage	51
1.5	La spectroscopie infrarouge des protéines	52
1.5.1	Analyse de la structure secondaire	54
1.6	La spectroscopie Infrarouge en mode de transmission	55
1.6.1	Spectroscopie infrarouge IRTF couplée au cryostat	56
1.6.2	Spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie	57
1.7	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (ATR)	61
1.8	Spectroscopie Raman et résonance Raman	62
2	Préparation des échantillons	64
2.1	Adrénodoxines, adrénodoxine réductase et cytochrome CYP106A2	64
2.2	Les domaines PDZ	65
2.2.1	Synthèse des peptides	65
2.3	Les hémocyanines	65
3	Conditions expérimentales	67
3.1	Spectroscopie UV/Visible	67
3.2	Spectroscopie infrarouge en mode ATR	67
3.3	Spectroscopie Raman	68
4	Références bibliographiques	69

Chapitre 3- ETUDE DE L'INTERACTION DE L'ADRENODOXINE, DE L'ADRENODOXINE REDUCTASE ET DU CYTOCHROME CYP106A2

1 Spectroscopie Raman de l'adrénodoxine et ses mutants.....	72
1.1 Spectroscopie Raman des complexes Adx/AdR	74
1.2 Spectroscopie infrarouge différentielle de l'Adx et ses mutants.....	80
1.3 Spectroscopie infrarouge différentielle de l'AdR	83
1.4 Spectroscopie Infrarouge différentielle des complexe Adx/AdR	83
2 Spectroscopie Raman du cytochrome CYP106A2.....	87
2.1 Spectroscopie Raman du complexe CYP106A2/Adx	90
3 Conclusion.....	94
4 Références bibliographiques	94

Chapitre 4- INTERACTION DE LA PDZ AVEC DES PEPTIDES VIRAUX

1 Structure des domaines PDZ de la protéine Scribble	99
1.1 Spectres infrarouge.....	99
1.2 Spectres Raman	103
2 Structure des peptides HPV16E6L/V et HTLV1 Tax1	104
2.1 Spectres Infrarouge	104
2.2 Spectres Raman	107
3 Structure des complexes PDZ en interaction avec les peptides viraux	109
3.1 Spectres infrarouge.....	109

3.2 Spectres Raman	113
4 Conclusion.....	114
5 Références Bibliographiques.....	115

Chapitre 5- STABILITE ET ETATS D'OXYGENATION DES HEMOCYANINES *LIMULUS POLYPHEMUS*, *EURYPELMA CALIFORNICUM* ET *ASTACUS LEPTODACTYLUS*

1 L'effet du vide sur la structure secondaire des protéines	118
2 L'effet du pH sur la structure des hémocyanines de <i>L. polyphemus</i> et <i>E. californicum</i>	119
3 L'effet de très basses températures sur la structure des hémocyanines de <i>L. polyphemus</i> et <i>E. californicum</i>	123
3.1 La transition de la structure secondaire sous l'effet de très basses températures	127
3.2 Réversibilité des changements structuraux des hémocyanines de <i>L. polyphemus</i> et <i>E. californicum</i> observés sous l'effet de très basses températures	128
3.3 L'effet des hautes températures sur la structure des hémocyanines de <i>L. polyphemus</i> et <i>E. californicum</i>	130
4 L'effet de l'oxygénation sur la structure secondaire des hémocyanines de <i>L. polyphemus</i> , <i>E. californicum</i> et <i>A. leptodactylus</i> à différents pH.....	134
4.1 Réversibilité de la structure secondaire des hémocyanines de <i>L. polyphemus</i> , <i>E. californicum</i> et <i>A. leptodactylus</i> vis-à-vis de l'oxygénation.....	141
4.2 Etude par spectroscopie Raman	142
5 Conclusion.....	147
6 Références bibliographiques	148
 CONCLUSION GENERALE.....	 150
 ANNEXES.....	 152

1 - INTRODUCTION

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des forces de Keesom.	2
Figure 2 : Représentation des forces de Debye.	3
Figure 3 : Représentation des forces de London.	4
Figure 4 : Schéma d'une liaison hydrogène.	4
Figure 5 : Schéma d'un pont salin entre l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase.	5
Figure 6 : Interaction électrostatique entre le groupe amino de la lysine et la fonction carboxylique de l'acide aspartique.	6
Figure 7 : Structure de la protéine Adrénodoxine obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1CJE)).	9
Figure 8 : Structure de la protéine Adrénodoxine réductase obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1CJC)).	10
Figure 9 : Représentation de la structure du cytochrome CYP106A2 estimée à partir du CYP11A1 obtenue à l'aide du logiciel Phyre (code PDB: (2WIV)).	11
Figure 10 : Représentation des trois modèles possibles du mécanisme de transfert d'électrons reproduit à partir de la référence.	12
Figure 11 : Schéma représentatif du mécanisme de transfert d'électrons. L'AdR est représentée en marron, en orange l'Adx oxydée, en beige l'Adx réduite et en jaune le cytochrome P450.	13
Figure 12 : Site d'interaction entre l'Adx et l'AdR obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1E6E)).	14
Figure 13 : Représentation de l'interaction entre les différents résidus d'acides aminés de la première (A) et deuxième (B) région d'interaction dans le complexe Adx/AdR.	15
Figure 14 : Localisation des différentes mutations d'Adx obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1E6E)).	16
Figure 15 : Représentation de l'interaction entre Adx et CYP11A1. En vert le CYP11A1, en rouge l'hème b et en jaune l'Adx	16
Figure 16 : Structure tridimensionnelle du domaine PDZ3 de PSD-95	19

1 - Introduction

Figure 17 : Structure du domaine PDZ3 de PSD-95 correspondant aux résidus (306-394) reproduit à partir de la référence. En rouge le peptide, en bleu les liaisons hydrogènes représentées en pointillés et en vert les interactions hydrophobes.....	20
Figure 18 : Représentation de la structure tridimensionnelle estimée de la PDZ 3 obtenue à l'aide du logiciel Phyre (A) (code PDB : (c2xkxB)), de la structure résolue de la PDZ 4 (B) (code PDB : (1uju)) et de la structure résolue du tandem PDZ 3-4 (C) (code PDB: (4WYT)).	21
Figure 19 : Schéma correspondant au dépliement et au repliement d'une protéine	24
Figure 20 : Les différents types de protéines de transport d'oxygène : Hémoglobine, Hémérythrine et Hémocyanine.....	26
Figure 21 : Schéma de l'hémocyanine de tarentule construit sur la base de la microscopie électronique. Les sous-unités sont représentées en différentes couleurs a: vert, b: gris, c: marron, d: jaune, e: rose, f: bleu et g: rouge.....	28
Figure 22 : Schéma 3D du 8x6 mers du <i>Limulus polyphemus</i> . Les huit sous-unités sont indiquées en différentes couleurs : Rouge pour le type I, mauve pour type IIA, vert type II , jaune type IIIA, bleue type IIIB, violet type IV, blanc type V et noir type VI	28
Figure 23 : Site actif au cours de l'oxygénation des hémocyanines.	30

1 Les interactions protéines-protéines et protéines-peptides

La cellule vivante est un système extrêmement complexe qui est constituée de centaines de milliers de macromolécules qui interagissent les unes avec les autres de façon continue pour maintenir les fonctions de la cellule.¹ Il a été révélé que plus de 80% des protéines fonctionnent sous la forme de complexes avec d'autres protéines ou peptides.² Les interactions protéines-protéines (IPP), sont définies par la liaison de deux ou plusieurs protéines pour former des machines moléculaires. Les IPP sont opérationnelles à presque tous les niveaux de la fonction cellulaire tels que les mécanismes de transport à travers les différentes membranes biologiques, la régulation et l'expression des gènes, et sont également un des mécanismes du système de communication au sein des organismes. Les IPP sont essentielles pour pratiquement tous les processus biologiques, dans la formation de structures macromoléculaires et cellulaires et dans des complexes enzymatiques responsables de la régulation des voies de signalisation.^{3,4} L'analyse fonctionnelle des protéines implique l'exploration de leurs interactions avec d'autres molécules jouant un rôle vital dans différentes voies métaboliques. En effet, environ 60% de ces voies d'interactions telles que la transduction de signaux ou le système immunitaire impliquent des protéines qui contiennent des domaines d'interaction avec des peptides.⁵ Récemment, Russel *et al* ont estimé qu'entre 15 et 40% de toutes les interactions au sein de la cellule auront lieu via des interactions protéines-peptides.^{6,7}

Les interactions protéiques et peptidiques ont fait l'objet d'intenses recherches au cours de ces dernières années en raison de leur importance dans la compréhension de nombreuses maladies ainsi que la recherche de cibles pour les agents thérapeutiques.⁸ Au cours de ces deux dernières décennies, il y a eu un intérêt important dans le développement de sondes thérapeutiques et chimiques qui inhibent une interaction protéine-protéine spécifique.⁹ White *et al* se sont également focalisés sur la conception d'inhibiteurs d'interactions protéines-protéines qui sont des petites molécules ciblées contre une variété d'interactions protéiques et qui ont un potentiel thérapeutique pour le traitement du cancer.¹⁰ Il est donc très important de comprendre ces interactions au niveau moléculaire. L'importance des IPP a conduit au développement de multiples technologies afin de détecter ces interactions, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction des rayons X et la résonance paramagnétique électronique (RPE) parmi diverses méthodes d'analyses.^{11,12} De nombreuses modifications peuvent se produire dans des complexes de protéines à la suite de perturbations génétique et biochimique. Ces derniers incluent des changements au niveau de la protéine et sa localisation ainsi que des

modifications post-traductionnelles qui peuvent modifier le lien entre ses partenaires d'interactions. Un des défis important en biologie est de comprendre comment ces complexes protéiques répondent aux perturbations génétiques.³

1.1 Les différents types d'interactions entre protéines

Les protéines sont des macromolécules, la liaison entre elles impliquent souvent de nombreux atomes. Leurs interactions sont très spécifiques et souvent une macromolécule de protéine particulière est capable de reconnaître son partenaire parmi des centaines de milliers de candidats¹³. Ces interactions mettent en jeu plusieurs types d'interactions tels que les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques.¹⁴⁻¹⁷

1.1.1 Les interactions de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals sont à courte portée et se produisent lorsque deux atomes ou molécules se rapprochent l'une de l'autre. Ces interactions sont la somme des forces d'attraction ou de répulsion entre les molécules, elles sont non covalentes et sont considérées comme des interactions attractives faibles qui deviennent seulement appréciables lorsque les molécules interagissantes sont neutres et non polaires.

Les interactions de Van der Waals sont classées en trois catégories : les forces de Keesom (interaction dipôle/dipôle entre deux molécules polaires), les forces de Debye (interaction entre une molécule polaire et une molécule non polaire) et les forces de London (interaction entre deux molécules non polaires).¹⁸

1.1.1.1 Les forces de Keesom

Les forces de Keesom n'ont lieu qu'entre molécules polaires et résultent de l'interaction entre des dipôles électriques permanents (Figure 1).



Figure 1 : Représentation des forces de Keesom.

L'énergie de ces interactions de Keesom dépend de l'interaction entre les dipôles électriques permanents mais également de la température. La force de Keesom augmente avec l'intensité des dipôles permanents ainsi que leur alignement et diminue à mesure que la température augmente. Cette interaction est assez faible avec une énergie allant de 0,5 à 3,0 KJ/mol.¹⁹

1.1.1.2 Les forces de Debye

Cette interaction a lieu entre un dipôle permanent et un dipôle induit et implique une molécule polaire et une autre qui peut être polaire ou apolaire.¹⁹ Le champ électrique de la molécule polaire va induire une déformation du nuage électronique de l'autre molécule résultant en la formation d'un dipôle (Figure 2).

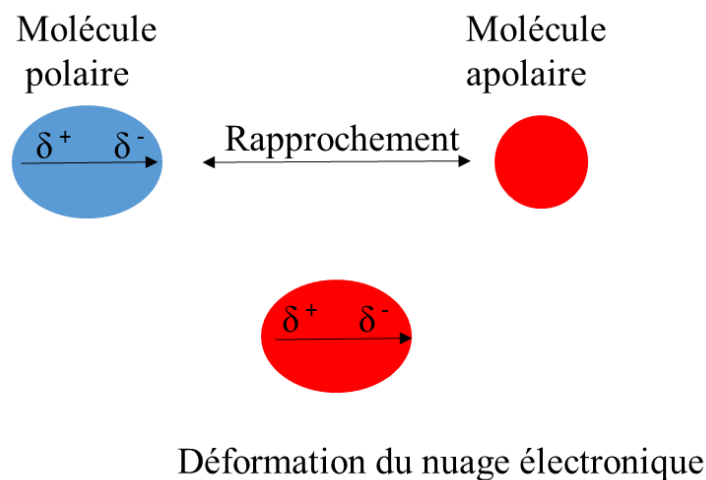


Figure 2 : Représentation des forces de Debye.

L'énergie de l'interaction est dépendante du dipôle permanent et de la polarisabilité de la molécule au dipôle induit, la polarisabilité augmentant avec la taille de la molécule. L'énergie de cette interaction est du même ordre de grandeur que celle de Keesom soit de 0,5 à 3,0 kJ/mol.

1.1.1.3 Les forces de London

Il s'agit d'une interaction mettant en jeu des dipôles induits entre deux molécules pouvant être polaires ou apolaires, mais prépondérante entre deux molécules apolaires. En l'absence de moment dipolaire permanent, des moments dipolaires instantanés peuvent survenir en raison de légères répartitions inhomogènes de leurs nuages électroniques (Figure 3).

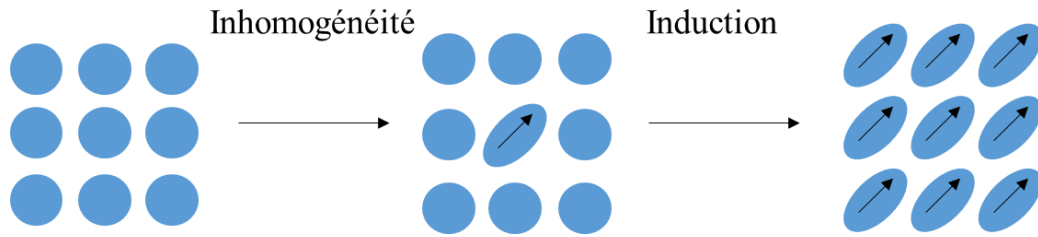


Figure 3 : Représentation des forces de London.

L'énergie des forces de London est dépendante de la polarisabilité des molécules en interactions et est de l'ordre de 0,5 à 30,0 kJ/mol.²⁰

1.1.2 Les liaisons hydrogènes

Une liaison hydrogène implique l'interaction d'un atome d'hydrogène portant une charge partielle positive avec un atome électronégatif. Ce dernier est, dans la plupart des cas, de l'azote, de l'oxygène, ou un halogène qui provient d'un autre groupement chimique (Figure 4). Par exemple dans une chaîne polypeptidique, les liaisons hydrogènes se forment à travers les groupements N-H et C=O de l'unité peptidique. Le groupement N-H agit comme un donneur d'hydrogène dans une liaison hydrogène et le groupement C=O comme accepteur de liaison hydrogène. De nombreuses liaisons hydrogènes sont fournies par des chaînes latérales polaires, par le groupement OH des acides aminés tels que la serine, la thréonine et la tyrosine ou bien des groupements carboxyles tel que ceux des acides aspartique et glutamique ainsi que d'autres acide aminés comme la lysine et l'histidine.²¹ Les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes sont considérées comme les principaux facteurs responsables des propriétés des protéines telles que l'organisation structurale, la stabilité ainsi que les propriétés fonctionnelles.²⁰ L'énergie de cette liaison est de 8,0 à 21,0 kJ/mol.

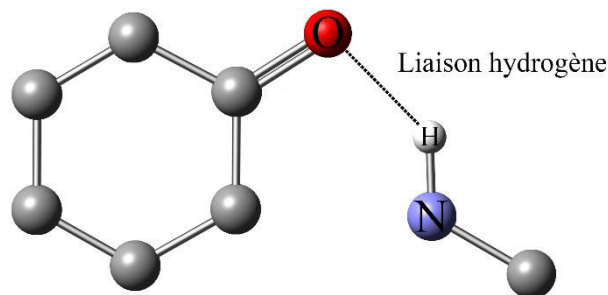


Figure 4 : Schéma d'une liaison hydrogène.

Le pont salin, un cas particulier de liaisons hydrogènes, se distingue dans les protéines par l'implication de partenaires possédant une charge formelle. Le plus souvent, les ponts salins se produisent entre les groupes carboxyles déprotonés des acides aspartiques et glutamiques, ceux des extrémités C-terminales (accepteur de protons) et le groupement α - amino de l'extrémité N-terminale, ϵ du groupement amino de la lysine, un groupe guanidine de l'arginine ou le groupement imidazole des histidines dans leurs formes protonées (donneurs de protons). Il est important de noter que les ponts salins ne sont pas des liaisons hydrogènes fortes. On peut montrer par exemple un pont salin reliant la protéine adrénodoxine à sa partenaire redox l'adrénodoxine réductase (Figure 5).^{20, 22}

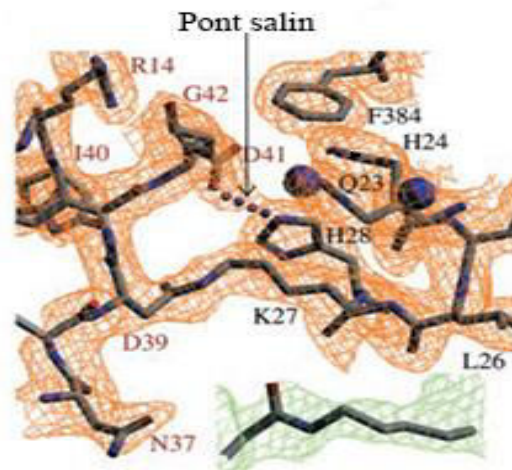


Figure 5 : Schéma d'un pont salin entre l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase.

Les ponts salins sont des interactions électrostatiques à longue portée entre le donneur et l'accepteur de protons. Par conséquent, ils peuvent être considérés comme des paires d'ions. De plus, on leur attribue un rôle dans la stabilisation électrostatique de la structure native de la protéine.

1.1.3 Les interactions hydrophobes

L'effet hydrophobe est considéré comme la principale force motrice du repliement des protéines.¹⁶ Les acides aminés sont constitués de chaînes latérales pouvant être polaires ou non polaires. Les résidus polaires sont nommés hydrophiles et montrent de fortes interactions avec les molécules d'eau. En revanche, d'autres acides aminés tels que la leucine, l'alanine et la

phénylalanine sont constitués d'une longue chaîne d'atomes de carbone qui auront tendance à se regrouper dans un environnement non polaire formant des interactions «hydrophobes» entre elles et avec d'autres solutés non polaires. Ces interactions hydrophobes sont énergétiquement favorables car elles minimisent les interactions entre les résidus non polaires et l'eau. Le repliement des protéines résulte ainsi d'une forte concentration de résidus hydrophobes tournés vers l'intérieur de la protéine avec très peu de résidus hydrophiles présents. Au contraire, la surface de la protéine sera composée majoritairement de résidus hydrophiles avec peu de résidus hydrophobes présents.²³

1.1.4 Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques ont un rôle majeur dans la stabilisation, l'affinité des liaisons ainsi que les propriétés chimiques et la réactivité biologique des protéines.²⁴ Les interactions électrostatiques, aussi connues sous les appellations d'interactions ioniques ou interaction charge-charge, prennent place entre deux groupements chargés positivement et négativement ; l'énergie de ces interactions est donnée par la loi de Coulomb. Ces charges peuvent être originaires de résidus chargés sur les chaînes latérales d'acides aminés comme la lysine, l'arginine et l'histidine (chargées positivement) ou bien comme les acides aspartique et glutamique chargés négativement (Figure 6).

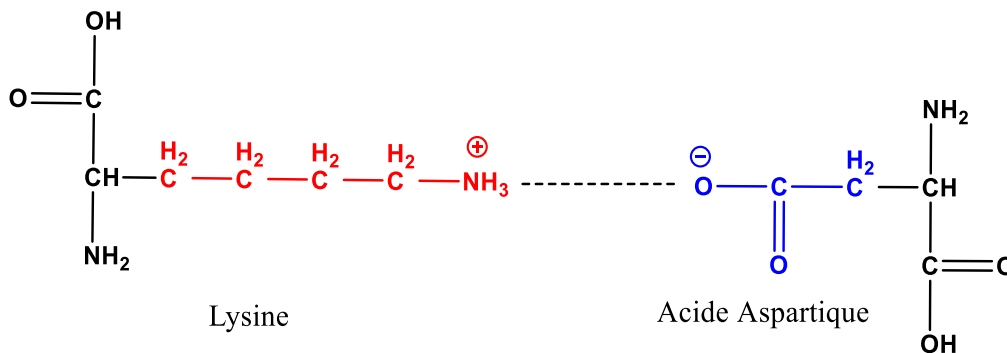


Figure 6 : Interaction électrostatique entre le groupe amino de la lysine et la fonction carboxylique de l'acide aspartique.

De plus, à pH physiologique les résidus terminaux NH_2 et COOH d'une chaîne polypeptidique sont également chargés. Ainsi, toutes ces charges peuvent contribuer à des interactions électrostatiques dans la structure d'une protéine. Les résidus chargés sont présents le plus souvent à la surface de la protéine où ils sont en interactions avec les molécules d'eau, leur présence au sein du cœur hydrophobe de la protéine étant énergétiquement défavorable. Ces

interactions électrostatiques entre les groupements chargés à la surface d'une protéine peuvent être affaiblies par la présence de sels en solution.²³

1.2 Différentes techniques utilisées pour étudier les interactions protéines-protéines

La spectroscopie infrarouge et Raman sont essentielles pour étudier les IPP. Ces deux techniques sont complémentaires et permettent d'avoir des informations sur la structure secondaire de la protéine ainsi que le cofacteur. Ces deux techniques constituent la majeure partie de ce travail de thèse et seront de ce fait détaillées par la suite.

Parmi les nombreuses méthodes d'analyses ayant été appliquées à l'étude des IPP, nous pouvons citer les exemples suivants en raison de leur importance respective dans l'étude de ces interactions.

1.2.1 Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET)

Le FRET est un processus non radiatif par lequel l'énergie d'un fluorophore donneur à l'état excité est transmise à un fluorophore accepteur à proximité immédiate, soit à une distance inférieure à 10 nm. Cette technique permet de contrôler la distance entre les différentes sondes fluorescentes qui sont attachées à des macromolécules. Le FRET est utilisé pour obtenir à la fois des informations statiques et dynamiques sur les relations de distance intramoléculaire et intermoléculaire.²⁵ Aujourd'hui, cette technique est largement appliquée dans de nombreux domaines tels que l'imagerie moléculaire, les moteurs moléculaires et les biocapteurs.²⁶⁻²⁸

1.2.2 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion de la lumière statique et dynamique (Dynamic Light Scattering) est une autre approche pour étudier les complexes protéiques. C'est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant d'accéder à la taille de particules. Le principe de cette technique consiste à éclairer l'échantillon par un faisceau laser, les fluctuations de la lumière diffusée sont alors détectées à un angle θ par un détecteur de photon rapide. La diffusion de la lumière dynamique permet par exemple de distinguer si une protéine est sous forme d'un monomère ou d'un dimère.²⁹

1.2.3 La résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique qui permet de mesurer les interactions biomoléculaires en temps réel avec un degré élevé de sensibilité.³⁰ La SPR, est un phénomène qui se produit lorsque la lumière polarisée heurte un film métallique à l'interface du support avec différents indices de réfraction. Cette technique permet par exemple de déterminer les constantes d'association et de dissociation d'un complexe.³¹ Cette méthode d'analyse a été utilisée pour étudier un ensemble diversifié de partenaire d'interaction d'intérêts biologiques tels que les protéines-protéines, protéines-lipides, protéines- acides nucléiques ainsi que d'autres molécules comme les substrats, les médicaments et les cofacteurs.³⁰

1.2.4 L'analyse calorimétrique par dosage isotherme (ITC)

C'est une technique adaptée notamment pour l'étude des interactions et ne nécessitant pas la présence d'un chromophore ou fluorochrome.³² Cette technique permet de déterminer des paramètres thermodynamiques tels que l'affinité, l'enthalpie et la stœchiométrie d'une liaison d'interaction. Elle est basée sur la mesure de la chaleur absorbée ou libérée lors de la titration d'une solution de molécules A avec une molécule B. Le signal mesuré est la chaleur dégagée ou absorbée lors de l'interaction des deux réactifs.³³

1.2.5 La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est un phénomène physique basé sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Cette technique permet de déterminer la structure tridimensionnelle de macromolécules ainsi que d'étudier des phénomènes chimiques en fonction du temps, y compris la cinétique des réactions et la dynamique intramoléculaire. L'avantage de la RMN est qu'elle ne se limite pas aux systèmes de haute affinité. Elle peut être appliquée à l'étude des interactions faibles. La principale contrainte de la RMN est sa faible sensibilité ainsi que la complexification des spectres pour les protéines de haute masse moléculaire (supérieure à 150 kDa) rendant difficile leur interprétation.^{34, 35}

1.2.6 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de mesurer la masse de molécules et des produits issus de leur fragmentation. Dans cette technique, les molécules à analyser doivent être converties en ions en phase gazeuse, séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Cette

méthode d'analyse permet de déterminer la stœchiométrie grâce à sa grande résolution et précision ainsi que la détermination des constantes de stabilité des complexes protéiques.³⁶⁻³⁸

1.3 Interaction entre l'adrénodoxine, l'adrénodoxine réductase et le cytochrome P450

Le transfert d'électrons est l'étape clé de différentes réactions biologiques, telles que la photosynthèse, la respiration ainsi que d'autres processus qui ont lieu dans les organismes vivants. L'intérêt porté à l'étude de l'adrénodoxine (Adx), de l'adrénodoxine réductase (AdR) et du cytochrome P450 s'est accru très fortement durant ces dernières années. La connaissance de ces biomolécules a progressé grâce à des études biochimiques, spectroscopiques et cristallographiques.³⁹ Cependant de nombreuses questions subsistent quant au mécanisme de transfert d'électrons généré par ces protéines qui reste peu connu jusqu'à présent.

1.3.1 L'adrénodoxine

L'adrénodoxine (Adx) appartient à la famille des ferrédoxines, dont les membres comportent un cluster fer-soufre (Figure 7).

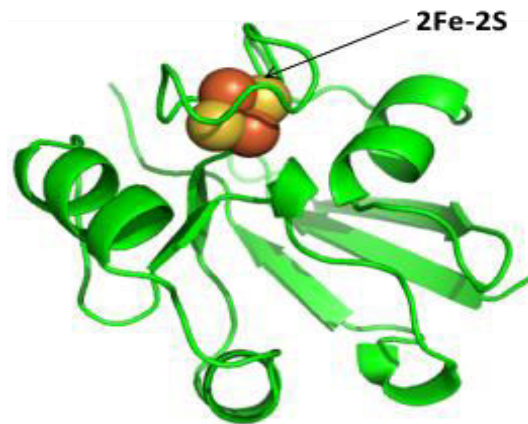


Figure 7 : Structure de la protéine Adrénodoxine obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1CJE)).

Le centre à deux atomes de fer et deux atomes de soufre dans le cas de l'Adx, va permettre de stocker des électrons via des passages entre les états d'oxydation +II et +III des atomes de fer.

L'Adx bovine de forme sauvage « Wild type (WT) » est une protéine soluble de 14kDa, contenant 128 résidus d'acides aminés. La structure cristallographique de cette protéine a été

déterminée à une résolution de 2.5 Å.⁴⁰ Cette protéine est synthétisée dans le cytoplasme des cellules du cortex surrénal et importée dans la matrice mitochondriale. Elle présente un intérêt particulier en raison de son rôle spécifique en tant que transporteur d'électrons notamment lors de la biosynthèse des hormones stéroïdes.^{41, 42 43} L'Adx reçoit deux électrons de sa partenaire redox l'adrénodoxine réductase (AdR) et les transfère au cytochrome mitochondrial P450.⁴⁴

1.3.2 L'adrénodoxine réductase

L'adrénodoxine réductase (AdR, NADPH : ferrédoxine surrénale oxydoréductase) est une flavoenzyme monomérique de 51 kDa qui contient 460 résidus d'acides aminés et comporte une flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur (Figure 8). L'AdR représente la première composante dans les systèmes de transfert d'électrons du cytochrome mitochondrial P450.^{45, 46}

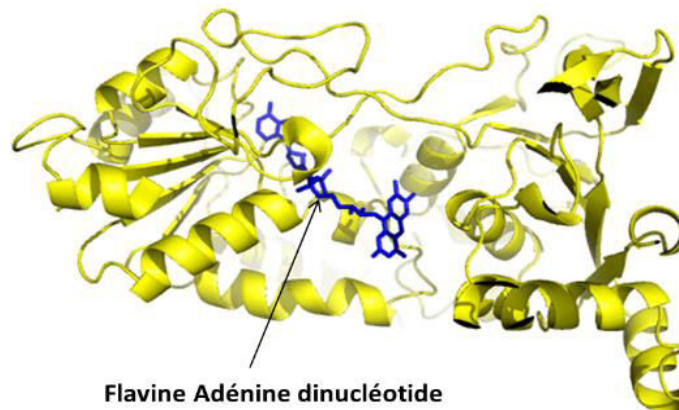


Figure 8 : Structure de la protéine Adrénodoxine réductase obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1CJC)).

L'AdR a été isolée à partir des glandes surrénales bovines et sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X avec une résolution de 2.8 Å.⁴⁷ Il existe chez l'homme une seule adrénodoxine réductase, qui est codée par un gène nucléaire et exprimée dans tous les tissus humains. Cette flavoenzyme est la plus abondante dans les cellules produisant des stéroïdes dans le cortex surrénalien, dans les ovaires et les testicules.⁴⁵ L'AdR reçoit deux électrons du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et les transfère par l'intermédiaire de l'Adx aux différents types de cytochromes P450.

1.3.3 Le cytochrome P450 (CYP106A2)

Les cytochromes P450 doivent leur nom au fait que lorsqu'ils sont réduits et incubés avec du monoxyde de carbone, ceci donne lieu à une absorption maximale à 450 nm en spectroscopie optique. En effet, le terme cytochrome représente l'hème, le P fait référence au pigment et le 450 reflète le pic d'absorption du complexe avec le CO à 450 nm.⁴⁸ Les cytochromes P450 sont classés en plus de 700 familles se basant sur leurs identités de séquence.⁴⁹ La plupart des cytochromes P450 interagissent avec des protéines de transfert d'électrons. Les cytochromes P450 sont repartis en dix classes en fonction de la nature de leurs partenaires redox. Les P450 sont identifiés par l'abréviation CYP suivi d'un nombre désignant la famille des protéines (définie par une identité de séquence de plus de 40%), une lettre désignant une sous famille (plus de 55% d'identité) et un nombre représentant le gène individuel à l'intérieur de la sous famille comme par exemple le CYP106A2.⁵⁰ La protéine soluble CYP106A2 est de masse moléculaire 47,5 kDa pour 410 résidus d'acides aminés et contient un hème *b* comme cofacteur (Figure 9). Cette protéine issue de la bactérie *Bacillus megaterium* joue un rôle important dans l'hydroxylation de la testostérone et la progestérone principalement dans la position 15 et selon l'orientation β .^{51, 52} Les 6 β , 9 α et 11 α -hydroxyprogestérones sont connues en tant que produits pharmaceutiques, comme précurseurs utiles dans la synthèse des anti-inflammatoires et des composés anti-tumoraux.

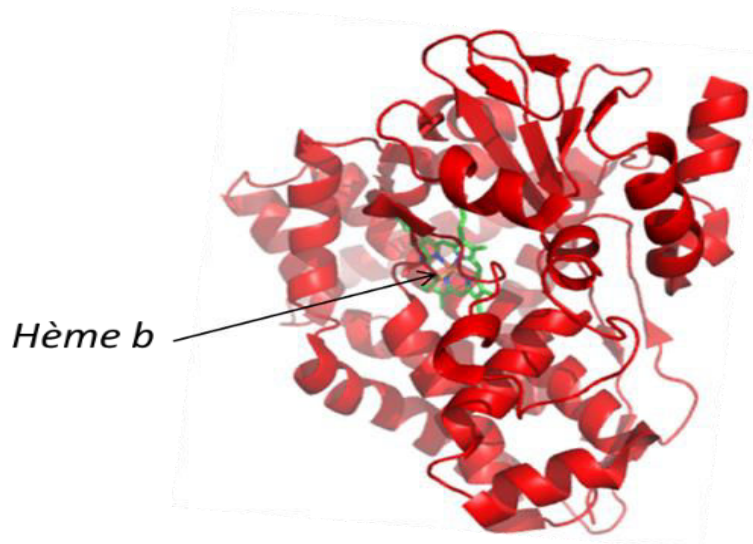


Figure 9 : Représentation de la structure du cytochrome CYP106A2 estimée à partir du CYP11A1 obtenue à l'aide du logiciel Phyre (code PDB: (2WIV)).

La fonction biologique ainsi que le donneur d'électrons du CYP106A2 restent inconnus. Par contre les protéines surrénales bovines telles que l'adrénodoxine réductase, l'adrénodoxine, la putidarédoxine réductase et la putidarédoxine ont été identifiées en tant que partenaires de transfert d'électrons appropriés.⁵³

1.3.4 Le mécanisme de transfert d'électrons entre Adx, AdR et P450

Bien que de nombreuses études aient été réalisées afin de déterminer la fonction de l'Adx et de son interaction avec l'AdR et le cytochrome P450, le mécanisme exact du transfert d'électrons n'a pas été encore déterminé et reste en cours de discussion.⁵⁴⁻⁵⁶ Au cours du temps, quatre modèles ont été proposés afin d'expliquer ce mécanisme (Figure 10).

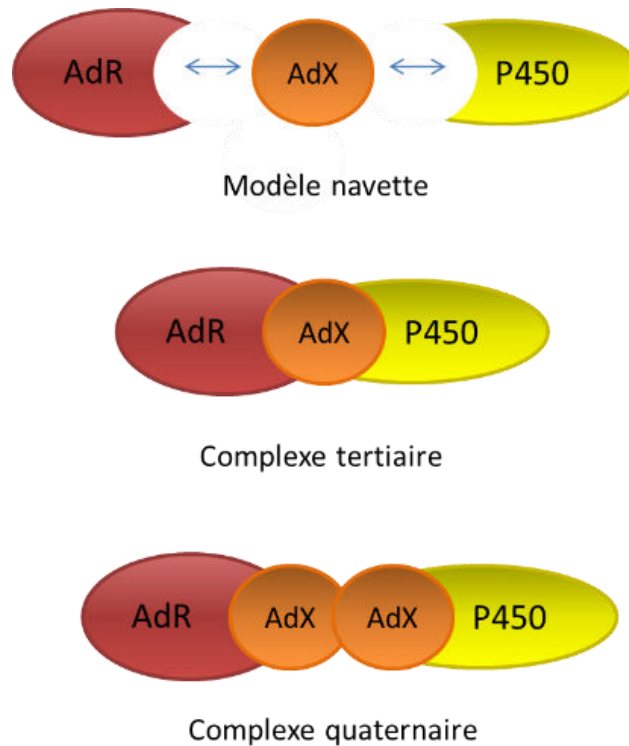


Figure 10 : Représentation des trois modèles possibles du mécanisme de transfert d'électrons reproduit à partir de la référence ⁵⁴.

Le premier modèle dit « navette » décrit l'Adx comme un transporteur mobile entre l'adrénodoxine et le cytochrome P450.^{46, 57} Le modèle du complexe tertiaire sollicite la formation d'un complexe 1:1:1 constitué de l'AdR, l'Adx et du P450⁵⁸ tandis que le modèle du complexe quaternaire 1:2:1 sollicite la formation d'un complexe avec deux protéines d'Adx, une AdR et un P450.⁵⁹ Le quatrième modèle, le plus récemment proposé, est une variation du

1 - Introduction

modèle navette, et semble être le plus en accord avec les plus récents résultats expérimentaux en cristallographie et en électrophorèse (Figure 11).

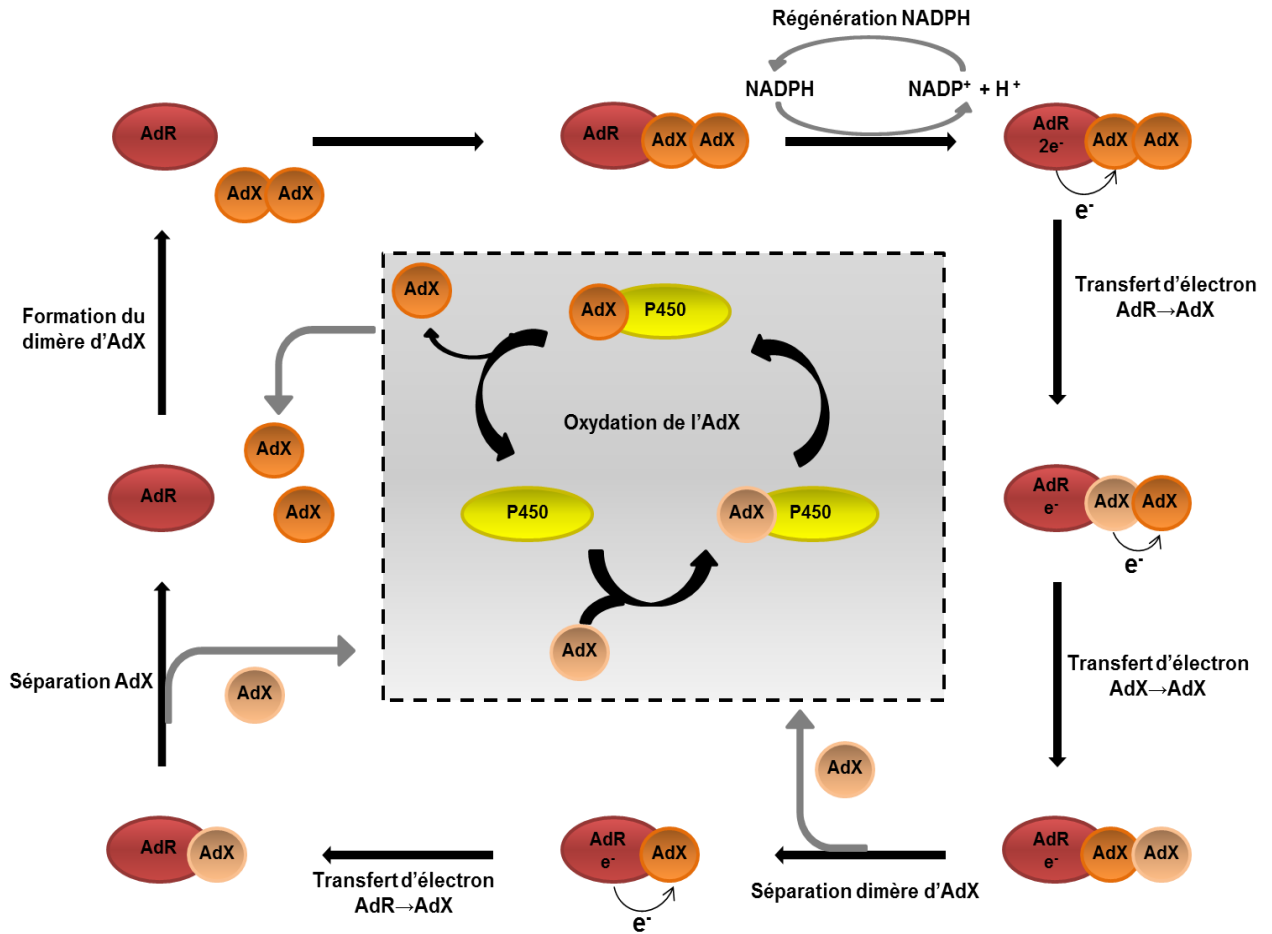


Figure 11 : Schéma représentatif du mécanisme de transfert d'électrons. L'AdR est représentée en marron, en orange l'Adx oxydée, en beige l'Adx réduite et en jaune le cytochrome P450.

Dans ce mécanisme, le dimère d'Adx oxydé se lie à l'AdR par l'un des deux Adx favorisant alors la réduction de l'AdR par deux équivalents de NADPH. Par la suite, la première Adx liée à l'AdR se fait réduire par l'AdR. Puis la molécule d'Adx réduite transfère l'électron à la deuxième molécule d'Adx ce qui conduit à la dissociation du dimère. La molécule d'Adx qui est toujours liée à l'AdR est ensuite réduite à nouveau par celui-ci et se dissocie de l'AdR. Les deux Adx réduites s'oxydent individuellement en transférant un électron au cytochrome P450 produisant deux Adx oxydées. La régénération du dimère oxydé d'Adx permet à un nouveau cycle de se mettre en place. Une des questions qui peut se poser est la raison pour laquelle l'Adx se dimérise naturellement. Le transport des deux électrons via le dimère d'Adx est beaucoup plus rapide que par l'intermédiaire de deux monomères. En effet, si un des monomères agit

comme une « navette » entre l'AdR et le P450, le second ne pourrait se lier que lorsque le premier est dissocié. Ces deux étapes nécessitent un temps plus long qui pourrait être évité par la formation de dimères.⁵⁶ L'équilibre entre le monomère et le dimère joue donc un rôle très important dans le mécanisme du transfert d'électrons. Quand la concentration du NADPH augmente, le dimère d'Adx oxydé se réduit ce qui induit une diminution de la concentration d'Adx oxydée et le ratio entre le dimère et le monomère favorise le dimère ce qui implique un déplacement rapide des électrons. Par contre si seul le monomère est présent, la diminution de la concentration d'Adx oxydée ne pourrait pas être compensée immédiatement.⁵⁶

1.3.5 Le site d'interaction entre l'Adx et l'AdR

L'interaction entre l'Adx et l'AdR a été proposée comme résultant principalement d'interactions électrostatiques. On note deux régions d'interaction principales (Figure 12).

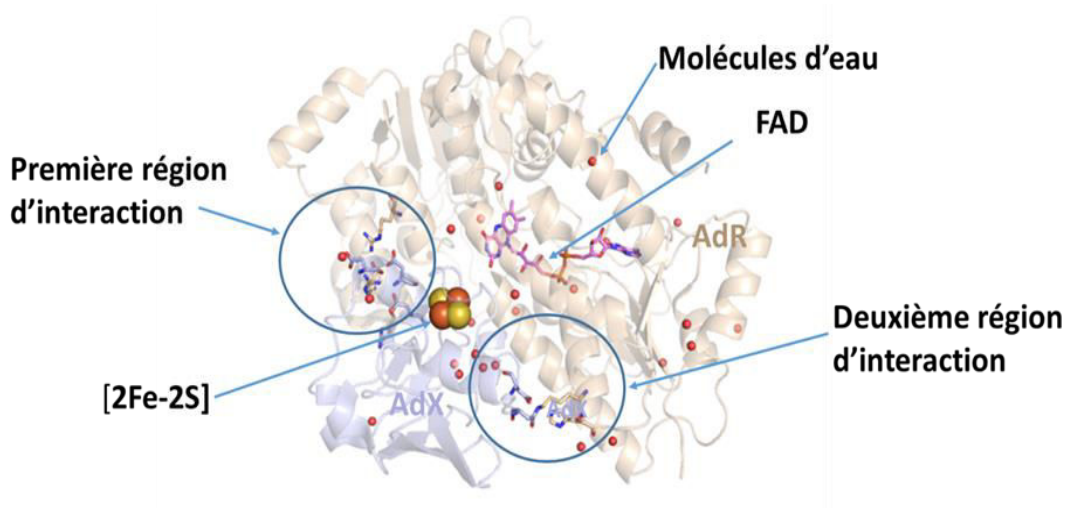


Figure 12 : Site d'interaction entre l'Adx et l'AdR obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1E6E)).

La structure cristallographique du complexe Adx/AdR a été déterminée avec une résolution de 2.8 Å.⁵⁵ La première région d'interaction est composée des résidus d'acides aminés arginine (Arg 211, 240 et 244) du domaine NADP de l'AdR qui sont impliqués dans de nombreux ponts salins avec les groupements carboxylate des acides aspartique (Asp 72, 76 et 79) de l'Adx (Figure 13A).⁶⁰

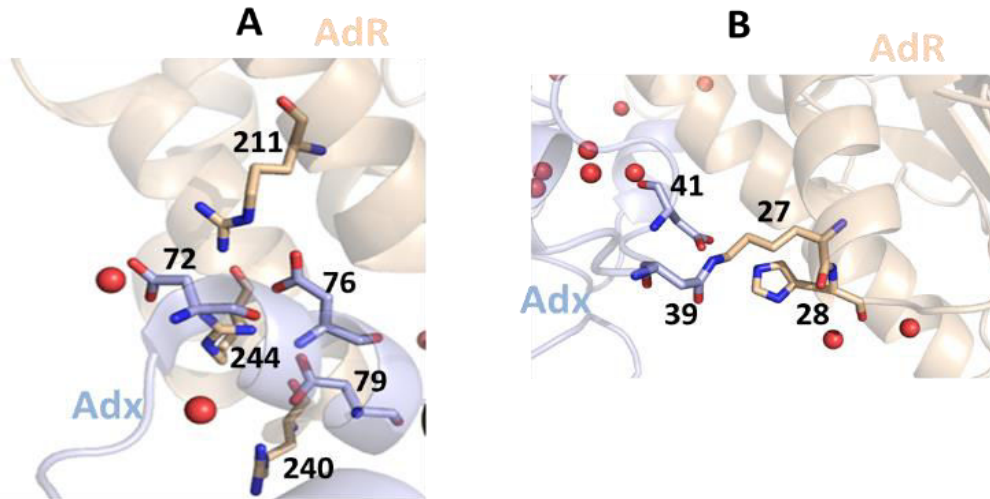


Figure 13 : Représentation de l'interaction entre les différents résidus d'acides aminés de la première (A) et deuxième (B) région d'interaction dans le complexe Adx/AdR.

La deuxième région d'interaction met en jeu des interactions polaires entre les groupements carboxylate des acides aspartiques (Asp 39 et 41) de l'Adx avec l'histidine (His 28) et la lysine (Lys 27) de l'AdR (Figure 13B). De plus, des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions électrostatiques ont été observées entre les résidus liant le cluster [2Fe-2S] de l'Adx et l'anneau isoalloxazine FAD de l'AdR.^{55, 61}

Au cours de cette thèse, nous avons étudié différents mutants de l'Adx tels que la forme tronquée Adx (4-108), dont les trois premiers résidus d'acides aminés (Ser1-Ser3) ainsi que la partie C-terminale (Asp 109- Glu 128) ont été supprimés.⁴⁴ L'Adx S112W inclut, elle, une mutation à la position 112 et les résidus d'acides aminés au-delà de la position 113 sa partie C-terminale ont été supprimés.^{62, 63} Un autre mutant de l'Adx a été également étudié, le D113Y, où l'acide aspartique à la position 113 a été remplacé par une tyrosine. Enfin le T54S ; D113Y est un double mutant dont le résidu d'acide aminé thréonine a été remplacé par une serine.⁶⁴

Ces différents mutants ont été choisis car ils comportent des mutations localisées dans des régions spécifiques de l'interaction avec l'AdR comme le montre la représentation ci-dessous. Elles devraient donc présenter une influence significative sur la formation des différents complexes (Figure 14). De plus, la mutation de certaines de ces protéines pourrait conduire à une fluctuation du potentiel d'oxydoréduction ainsi que de l'affinité de liaison pour les partenaires redox tels que l'AdR et le CYP11A1.

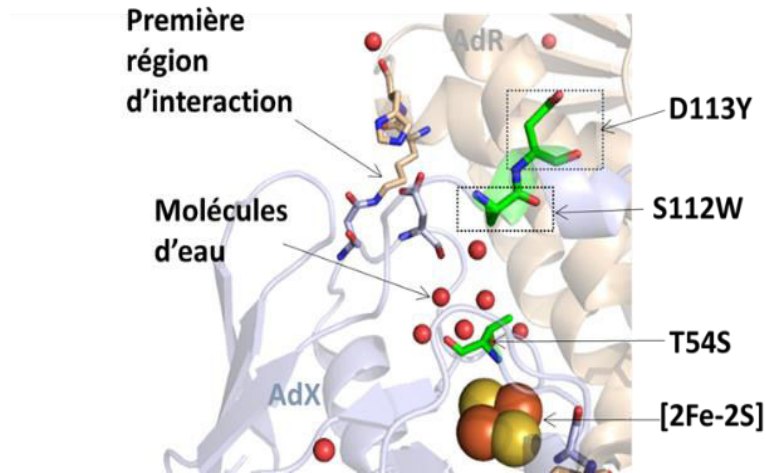


Figure 14 : Localisation des différentes mutations d'Adx obtenue à l'aide du logiciel Pymol (code PDB: (1E6E)).

1.3.6 Le site d'interaction entre l'Adx et le P450

Comme la structure cristallographique du CYP106A2 n'est pas encore résolue, nous allons nous appuyer sur la famille CYP11A1 (ou P450_{scc}, enzyme de clivage de la chaîne latérale) afin d'expliquer l'interaction entre cette protéine et l'Adx. L'Adx se lie à la surface proximale de CYP11A1 par l'intermédiaire de son hélice F en contact avec l'hélice K du CYP11A1 (Figure 15).⁶⁵

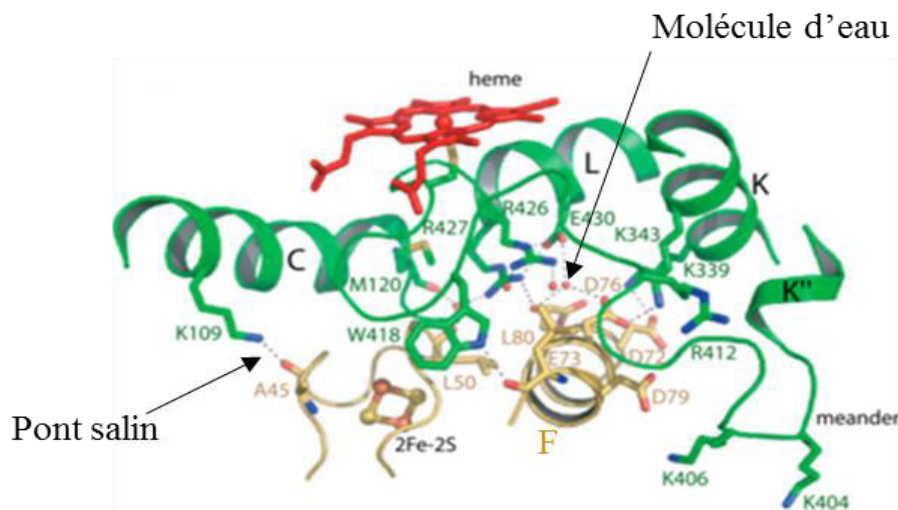


Figure 15 : Représentation de l'interaction entre Adx et CYP11A1. En vert le CYP11A1, en rouge l'hème b et en jaune l'Adx⁶⁵.

La boucle qui entoure le cluster [2Fe-2S] correspond au domaine central et interagit avec la boucle de la liaison hémique C et L du CYP11A1. Lors de la formation du complexe, les liaisons hydrogènes deviennent prédominantes. En effet, des liaisons hydrogènes ont été observées entre

les résidus lysine (K 109) du CYP11A1 et alanine (A 45) de l'Adx, ainsi qu'entre le tryptophane (W 418) du CYP11A1 et la leucine (L 80) de l'Adx. Ce complexe présente également un nombre important de molécules d'eau qui sont représentées sous forme de petites sphères. La présence de ces dernières va permettre la formation de liaisons hydrogènes entre la méthionine (M 120) du CYP11A1 et la thréonine (T 49) de l'Adx ainsi qu'entre la méthionine (M 120) du CYP11A1 et l'alanine (A 51) de l'Adx. Le résidu d'acide aminé aspartate (Asp 79) qui se retrouve dans le domaine d'interaction de l'Adx, va influencer la formation du complexe Adx/CYP11A1 et son activité.^{43, 66} Celui-ci est situé à proximité de la région dite « meander » soit plus spécifiquement à côté des lysines (K 406 et 404) du CYP11A1. Lors de la formation du complexe, l'aspartate (Asp 79) peut interagir avec l'un de ces résidus en fonction des changements conformationnels dus à la flexibilité de la région « meander ».⁶⁵ A l'heure actuelle, il n'existe pas suffisamment de données dans la littérature pour permettre de visualiser le site d'interaction entre l'adrénodoxine réductase et le cytochrome CYP11A1.

1.3.7 Les différentes méthodes d'analyses présentes dans la littérature pour caractériser l'interaction entre l'Adx, l'AdR et le P450

Au cours des deux dernières décennies, beaucoup de travaux ont été réalisés afin d'obtenir une meilleure compréhension du mécanisme de transfert d'électrons ainsi que de la cinétique de ce système.⁶⁷⁻⁶⁹ Schiffler *et al* se sont focalisés sur l'étude des paramètres cinétiques étudiés par la résonance plasmonique de surface qui leur a permis de déterminer l'interaction de l'Adx avec ses partenaires redox AdR et le cytochrome CYP11A1. Les résultats obtenus ont montré des différences significatives entre les interactions de l'Adx et de l'Adx S112W avec l'AdR et le CYP11A1⁶³. Comme l'interaction entre l'Adx et ses partenaires redox est principalement de nature électrostatique, il était très important d'étudier l'effet du sel sur ces interactions. Schiffler *et al* ont montré en combinant la résonance plasmonique de surface et les expériences de conversion de substrat que la variation de la concentration en sel n'a pas d'effet sur la formation du complexe Adx/AdR. En revanche, elle a une forte influence sur la formation du complexe Adx /CYP11A1 et peut empêcher ce dernier de se former⁷⁰. Le complexe Adx/AdR a été étudié par spectroscopie RMN afin de déterminer si des marqueurs lanthanides pouvaient fournir des appuis suffisants pour établir l'orientation de la protéine dans un complexe.⁷¹ Les résultats obtenus ont permis l'établissement du premier modèle structural du complexe Adx/AdR en solution. Müller *et al* ont cherché à étudier par spectrométrie de masse et par dégradation d'Edman deux liaisons de carbodiimide transversales covalentes entre les complexes Adx, AdR

et Adx, cytochrome P450_{scc} (enzyme de clivage de la chaîne latérale)⁷². Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y a pas de « crosslink » dans la première région d'interaction entre Adx et AdR. Par contre, avec le complexe Adx/P450_{scc}, l'Asp 79 de l'Adx est impliqué dans un « crosslink » avec la Lys 403 du P450_{scc}. L'interaction du CYP106A2 avec différents partenaires d'interaction tels que l'Adx et la Fdx1 du *Sorangium cellulosum* a été étudiée par voie électrochimique. Les résultats ont montré une vague de réduction intense dans le cas du complexe AdxWT/AdR, beaucoup plus prononcée avec la forme tronquée de l'Adx (4-108). La combinaison du Fdx1 avec le CYP106A2 a montré une meilleure vague de réduction. En effet l'interaction entre ces deux protéines est largement suffisante pour augmenter le potentiel d'oxydoréduction de ce complexe, ce qui le rend plus facile à réduire.⁷³

1.4 Les domaines PDZ

Le deuxième système d'intérêt qui sera développé au cours de cette partie est centré sur l'étude des protéines à domaines PDZ ainsi que leurs interactions avec divers peptides. Les domaines PDZ sont composés d'environ 90 résidus d'acide aminés et sont retrouvés dans les bactéries, les levures, les plantes et les animaux.^{74, 75} L'acronyme PDZ est issu du nom des trois premières protéines dans lesquelles un motif spécifique a été identifié : la protéine de densité post synaptique 95 (PSD 95), la « Drosophila large-disc tumor suppressor » (Dlg1) et la protéine Zonula occludens 1 (ZO-1).⁷⁶ Les domaines PDZ sont également dénommés DHR (Discs large Homology Region) ou bien GLGF (Glycine-Leucine-Glycine-Phénylalanine) en référence aux séquences d'acides aminés trouvées dans le domaine PDZ. Les domaines d'interactions des protéines PDZ attirent l'attention en raison de leurs rôles cruciaux dans les jonctions cellulaires, les voies de signalisation et la circulation subcellulaire membranaire.^{77, 78}

1.4.1 La structure des domaines PDZ

Les domaines PDZ sont composés de six feuillets β antiparallèles (β A- β F) et deux hélices (α A- α B).⁷⁹ Les extrémités N et C terminales des domaines PDZ sont situées à proximité l'une de l'autre. Le peptide se lie dans un sillon entre le feuillet (β B) et l'hélice (α B) et s'oriente en antiparallèle au feuillet (β B) (Figure 16).

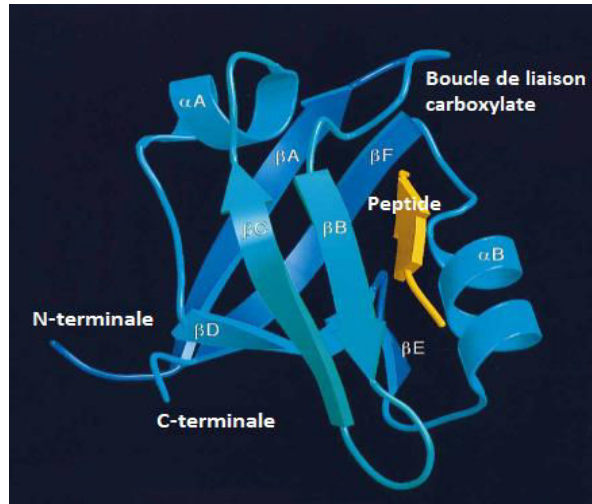


Figure 16 : Structure tridimensionnelle du domaine PDZ3 de PSD-95⁸⁰.

La séquence d'acides aminés (Glycine-Leucine-Glycine-Phénylalanine) GLGF du domaine PDZ est située au sein de la boucle de liaison du feuillet (β A et B). Ces acides aminés jouent un rôle important dans la coordination de la liaison hydrogène du groupement carboxylate (COO^-) de la partie C-terminale du peptide.⁸¹

1.4.2 Le mécanisme de liaison du domaine PDZ

Les domaines PDZ se lient à des motifs spécifiques de la partie C terminale sur le peptide, qui comprennent quatre à cinq résidus d'acides aminés. Dans les complexes, le résidu C-terminal du ligand est appelé P_0 ; les résidus suivants vers l'extrémité N-terminale sont appelés P_{-1} , P_{-2} , et P_{-3} etc..... Des études précédentes ont révélé que les résidus P_0 et P_{-2} sont importants pour la reconnaissance du ligand.⁸² Les domaines PDZ sont divisés en au moins trois classes principales sur la base de leurs préférences pour les résidus des deux sites P_0 et P_{-2} . Dans la première classe, les domaines PDZ reconnaissent le motif S/T-X- Φ -COOH (Φ représente un résidu hydrophobe, X un acide aminé et COOH un groupement carboxylate libre) ; dans la deuxième classe, les domaines PDZ reconnaissent le motif Φ -X- Φ -COOH tandis que dans la troisième classe, les domaines PDZ reconnaissent le motif X-X-C-COOH (Figure 17).

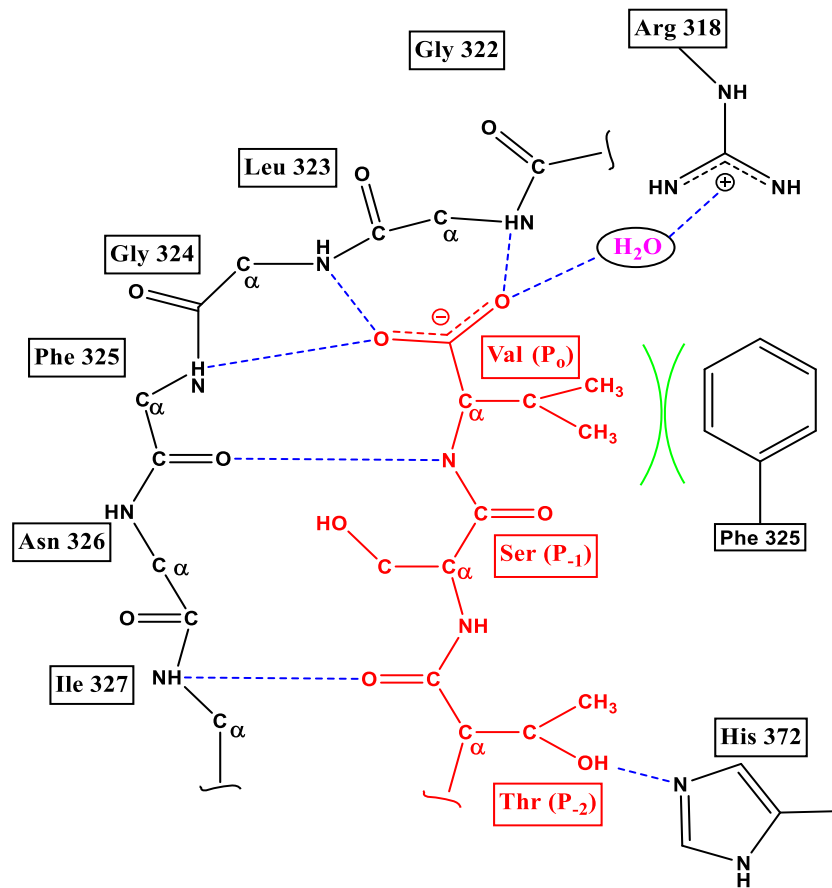


Figure 17 : Structure du domaine PDZ3 de PSD-95 correspondant aux résidus (306-394) reproduit à partir de la référence⁸³. En rouge le peptide, en bleu les liaisons hydrogènes représentées en pointillés et en vert les interactions hydrophobes.

Les structures des complexes PDZ peptidiques montrent une boucle GLGF située à la fin du sillon de la liaison peptidique qui est également nommée boucle de liaison carboxylate. Dans le complexe, le ligand carboxylate terminal est coordonné par un réseau de liaisons hydrogène à des groupes amides de la chaîne principale de la boucle GLGF ainsi que par une molécule d'eau qui est coordonnée par la chaîne latérale d'un résidu d'acide aminé tel que la lysine ou l'arginine au début de la boucle.⁸³ La figure 17 représentée ci-dessus montre que les liaisons hydrogènes sont présentes entre l'azote de l'amide du résidu d'acide aminé valine (P₀) et le groupe carbonyle de la phénylalanine 325 ainsi qu'entre l'oxygène du carbonyle de la thréonine (P₂) et l'azote de l'amide de l'isoleucine 327. En effet, ces interactions entre les chaînes principales avec le feuillet (β B) sont responsables de la stabilisation du peptide dans le sillon de liaison et peuvent augmenter l'affinité de l'interaction.

1.4.3 Le Scribble humain et ses domaines PDZ

La protéine Scribble humaine (hScrib) de 220 kDa et 1630 résidus d'acides aminés est l'homologue humain de la protéine suppresseur de tumeur, la *Drosophila melanogaster*. La hScrib se trouve au niveau des jonctions serrées de l'épithélium et des jonctions adhérentes. Les mutations dans les gènes du Scribble provoquent la rupture de la polarité cellulaire et conduisent à la prolifération des cellules épithéliales.^{84, 85} hScrib contient quatre domaines PDZ et seize « leucine-rich repeats » (LRRs) qui est un autre motif d'interaction protéine-protéine. Récemment, les protéines avec des domaines PDZ et LRRs ont été signalées comme ayant des fonctions communes dans le contrôle de la forme cellulaire et la polarité. Ces protéines sont des membres de la famille des protéines « LRR and PDZ domain » (LAP).⁸⁵ Le Scribble fonctionne supposément comme une protéine d'échafaudage se liant aux protéines à l'aide de ces motifs de liaisons. Trois domaines de PDZ ; les PDZ 3, 4 et le tandem PDZ 3-4 (Figure 18), seront caractérisés au cours de cette thèse.

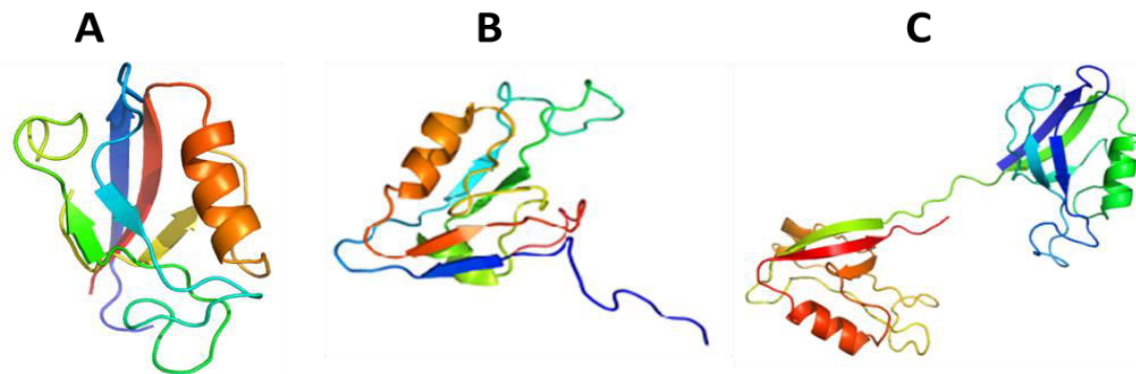


Figure 18 : Représentation de la structure tridimensionnelle estimée de la PDZ 3 obtenue à l'aide du logiciel Phyre (A) (code PDB : (c2xkxB)), de la structure résolue de la PDZ 4 (B) (code PDB : (1uju)) et de la structure résolue du tandem PDZ 3-4 (C) (code PDB: (4WYT)).

1.4.4 Les domaines PDZ et leur interactions avec les protéines virales

Les protéines virales telles que celles du papillomavirus humain (HPV) et du virus T-lymphotrope humain de type1 (HTLV1 Tax1) sont souvent les cibles des domaines PDZ entraînant une perturbation des processus cellulaires au cours du cycle de vie viral. Les HPV sont de petits virus non enveloppés avec un génome circulaire (ADN) d'environ 8kb. Il existe plus de 150 types de papillomavirus, dont environ 40 peuvent infecter les organes génitaux humains. Les deux oncoprotéines E6 et E7 du HPV ont un rôle important au cours de la réplication virale et dans la tumorigénèse.^{86, 87} L'oncoprotéine E6 a un certain nombre de

fonctions distinctes dans la cellule hôte, elle cible notamment la protéine de suppresseur de tumeur p53 par la formation d'un complexe trimérique avec l'ubiquitine ligase cellulaire E6AP.^{88, 89} E6 peut également bloquer l'activité transcriptionnelle de p53. De plus, la protéine E6 interagit avec les membres de la famille des protéines PDZ en se liant spécifiquement aux domaines PDZ et en favorisant la dégradation par le protéasome de plusieurs membres de la famille PDZ y compris la hDLG, MUPP-1 et hScrib.⁹⁰⁻⁹² L'interaction de la protéine E6 avec les domaines PDZ est médiée par les séquences C-terminales du peptide correspondantes au motif X-[T/S]-X-[L/V] de la classe I des domaines PDZ^{93, 94} et est associée notamment au développement du cancer du col de l'utérus.^{95, 96}

Le virus T-lymphotrope humain de type1 (HTLV1 Tax1) est la cause de divers cancers comme les leucémies et lymphomes. Le HTLV appartient à la famille des Rétrovirus.⁹⁷ Les rétrovirus sont des virus à ARN qui utilisent une enzyme appelée transcriptase inverse pour produire de l'ADN à partir de l'ARN. Le ou les récepteurs d'entrées du HTLV-1 dans la cellule ne sont pas connus. Une fois à l'intérieur de la cellule, ce virus synthétise des copies d'ADN via la transcriptase inverse et les intègre dans le génome de l'hôte en tant que provirus.⁹⁸ De plus, HTLV1 Tax1 contient dans sa partie C-terminale un motif de liaison de la PDZ ((PSD 95/SAP90), Discs Large et Zonula Occludens-1)).⁹⁹ Le hScrib se lie à l'extrémité C-terminale du HTLV1 Tax1 par l'intermédiaire de ses domaines PDZ plus précisément le domaine de la PDZ 2 et 4. Cependant HTLV1 Tax1 pourrait modifier les activités de hDlG et hScrib en modifiant leur localisation subcellulaire à travers les interactions avec leurs domaines PDZ.¹⁰⁰

1.4.5 Les différentes techniques présentes dans la littérature pour étudier l'interaction entre les domaines PDZ et les protéines virales

Les interactions PDZ-peptide ont fait l'objet de nombreux travaux. Fournane *et al* se sont focalisés sur l'interaction de la MAGI-1 (Membrane-associated guanylate Kinase) qui contient six domaines PDZ avec des protéines virales telles que l'oncoprotéine E6 du HPV et le HTLV1 Tax1 par résonance plasmonique de surface.¹⁰¹ D'après les résultats obtenus ils ont pu confirmer que les résidus situés à l'intérieur et à l'extérieur du motif de liaison PDZ canionique contribuent à la spécificité de l'interaction entre le domaine PDZ de MAGI-1 et le peptide HPV16E6. La structure cristallographique de la PDZ 3 de la protéine synaptique PSD-95 en présence et en absence du peptide a été déterminée avec une résolution de 1.8 Å et 2.3 Å respectivement.⁸⁰ L'étude de ces deux structures a permis de révéler le mécanisme par lequel

un domaine PDZ reconnaît et se lie à l'extrémité C-terminale de plusieurs protéines. La structure tridimensionnelle du deuxième domaine de la PDZ de MAGI-1 seule ainsi que liée au peptide HPV16E6 a été résolue en RMN.¹⁰² Les résultats ont montré d'importants changements de la dynamique du squelette peptidique ainsi que dans les liaisons hydrogènes lors de la formation du complexe PDZ/HPV16E6. Une méthode de calcul nommée la MIEC-SVM, basée sur les composantes d'énergie moléculaire d'interaction, a été développée afin d'investiguer et de prédire la spécificité de la liaison entre les domaines de protéines et les peptides.¹⁰³ Cette méthode a par exemple montré une utilité en permettant de discriminer entre les peptides selon leur capacité à se lier à la PDZ¹⁰⁴.

2 La stabilité des protéines

On peut trouver des organismes vivants dans une vaste gamme de conditions environnementales, notamment des conditions extrêmes avec des pH pouvant atteindre des valeurs de 1 jusqu'à 12, des températures faibles (-5°C) comme très hautes (110°C) ou encore une pression hydrostatique pouvant se situer entre 0,1 et 120 MPa.¹⁰⁵ La capacité de survie de ces organismes dans de telles conditions est liée entre autre à la stabilité de leurs protéines, dont l'étude de la stabilité est essentielle à la compréhension de leur structure et fonction. La plupart des protéines ne sont stables qu' à pH neutre et à température ambiante et donc sont facilement dénaturées par l'augmentation ou la diminution de la température, de la pression et du pH.¹⁰⁶ La stabilité des macromolécules biologiques est quantifiée par l'énergie libre standard ΔG , pour des réactions de repliement et dépliement sous des conditions physiologiques (température ambiante et pH neutre),¹⁰⁷ l'effet hydrophobe et les liaisons hydrogènes étant les principaux facteurs déterminant la stabilité de la structure native de la protéine.¹⁰⁸

2.1 Le repliement et le dépliement des protéines

Les protéines sont repliées et maintenues ensemble par plusieurs formes d'interactions moléculaires. Ces interactions comprennent les interactions hydrophobes, électrostatiques, liaisons hydrogène et les liaisons disulfures formées dans les protéines. Au sein de la chaîne polypeptidique, les chaînes latérales des acides aminés hydrophiles sont liées les unes aux autres d'une manière électrostatique. De la même façon, les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes sont liées les unes aux autres et repoussées par les chaînes latérales des acides aminés hydrophiles. Ceci crée une force physique qui entraîne la chaîne linéaire de la protéine

à se replier de manière à permettre à un grand nombre d'acides aminés de même type d'être plus proches (Figure 19). Dans la plupart des protéines intracellulaires ou extracellulaires, le processus de pliage crée une forme globulaire, dans laquelle les acides aminés hydrophobes sont enfouis vers l'intérieur de la protéine et les acides aminés hydrophiles se retrouvent à la surface. Cette répartition entre les acides aminés stabilise la protéine¹⁰⁹.

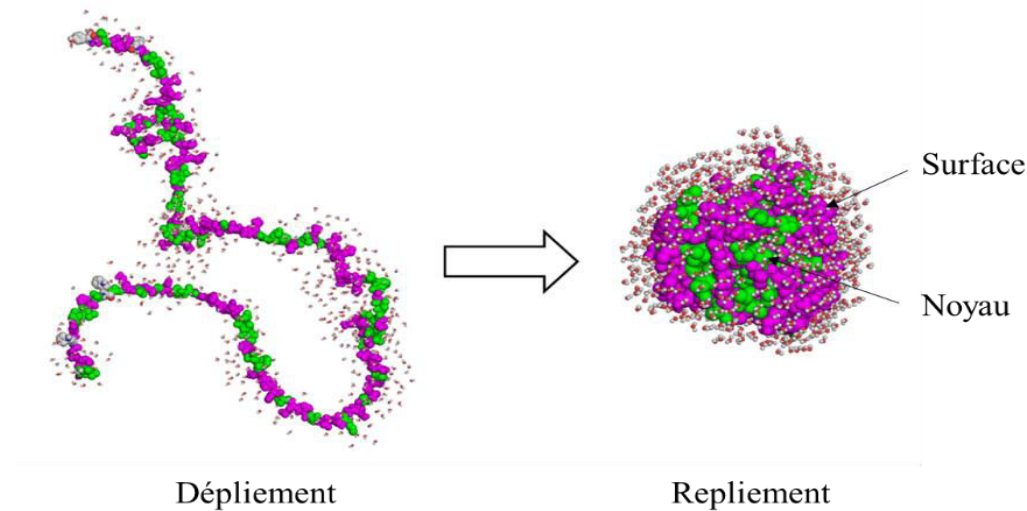


Figure 19 : Schéma correspondant au dépliement et au repliement d'une protéine¹⁰⁹.

L'intérêt d'étudier des protéines dépliées a connu une forte croissance en raison de leur importance dans les études des protéines repliées, notamment l'étude de leur stabilité et de leur fonction.¹¹⁰ Les protéines dépliées ont des entropies larges comparées aux protéines repliées en raison de rotation autour des liaisons du squelette polypeptidique ainsi que des chaînes latérales moins restreintes.¹⁰⁸ Les protéines dépliées sont caractérisées par des séquences d'acides aminés désordonnées contenant peu de structure secondaire ordonnée telle que les hélices α ou les feuillets β .¹¹¹ Il est important de noter qu'en plus du pH, la température et la composition du solvant, la modification de la séquence d'acides aminés peut également déstabiliser l'état natif d'une protéine.¹¹²

2.2 Les facteurs qui affectent la stabilité des protéines

Les protéines sont peu stables et facilement dénaturées par diverses contraintes telles que la température (chauffage, congélation), et la pression. La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants pour la vie, car elle influence la plupart des réactions

biochimiques y compris le repliement et le dépliement des protéines. L'influence de la température est l'un des principaux facteurs qui sera étudié au cours de cette thèse.

2.2.1 La température

Les protéines ont une gamme de température limitée dans laquelle l'intégrité structurale est maintenue. En dehors de cette gamme, la dénaturation se produit entraînant une perte de la fonction ou une baisse de l'activité de la protéine. La plupart des protéines se dénaturent irréversiblement lors d'un traitement thermique, notamment via la formation d'agrégats causé par le dépliement de la protéine.¹¹³ Bien que la plupart des protéines soient thermolabiles, certaines protéines telles que celles trouvées dans les organismes hyper thermophiles sont connues pour être stables même à très haute température.¹¹⁴ Des études précédentes ont montré que la façon dont les protéines atteignent leur stabilité thermique est différente d'une protéine à l'autre. Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la stabilité thermique des protéines telles que l'exposition du solvant à la surface, l'augmentation de la densité de compactage qui réduit les cavités dans le noyau hydrophobe, l'augmentation de l'hydrophobicité dans la zone centrale et l'augmentation des liaisons hydrogènes entre les résidus polaires.¹¹⁴

De nombreuses formes de vie doivent faire face à une variété de conditions imposées par les changements climatiques. Une de ces contraintes environnementales, qui a un effet sur les nombreuses formes de vie, est le froid. Trois points importants peuvent menacer la vie à des températures inférieures à 0°C.

Le premier point est lié à la formation des cristaux de glace qui causent des dommages physiques, surtout au niveau des tissus fragiles tels que les capillaires. En deuxième point, la congélation va empêcher la livraison de l'oxygène et des nutriments aux organes qui se fait par l'intermédiaire du sang et de l'hémolymphe. Enfin, le dernier point concerne la transformation d'environ deux tiers de l'eau du corps en glace qui a des effets osmotiques sur les cellules.¹¹⁵ Pour éviter de se retrouver congelés, certains animaux s'adaptent au froid en maintenant leurs fluides corporels à l'état liquide à des températures qui sont bien en dessous de l'environnement prévu pour leur habitat et font face à chacun de ces points cités ci-dessus.^{116, 117} De plus, le froid a également un effet sur la stabilité et l'activité de la protéine. D'une part la diminution de la température conduit à la formation d'un système mieux ordonné. Or l'état natif de la protéine est censé être plus ordonné, ainsi le froid peut avoir pour effet de stabiliser la protéine.

Cependant, le phénomène de dénaturation des « protéines froides » est également connu depuis longtemps et de nombreuses enzymes étudiées en solution se sont avérées inactives à basses températures telles que l'acétyl-CoA hydrolase par exemple.¹¹⁸ Il existe de plus une classe spéciale de protéines adaptées au froid nommée protéines antigel (AFP) qui vont permettre à certaines bactéries, plantes et invertébrés de vivre dans des environnements froids en empêchant la congélation des cellules et des tissus.¹¹⁹

2.3 Les hémocyanines

Les protéines respiratoires sont des éléments clés de l'alimentation en oxygène chez tous les organismes vivants aérobiques en facilitant le transport et le stockage de l'oxygène. Trois types peuvent être distingués en fonction de la nature du site se liant à l'oxygène qui comprend un noyau de porphyrine contenant un ion de fer pour l'hémoglobine, une paire d'ions de fer pour l'hémérythrine et une paire d'ions de cuivre pour l'hémocyanine (Figure 20).¹²⁰

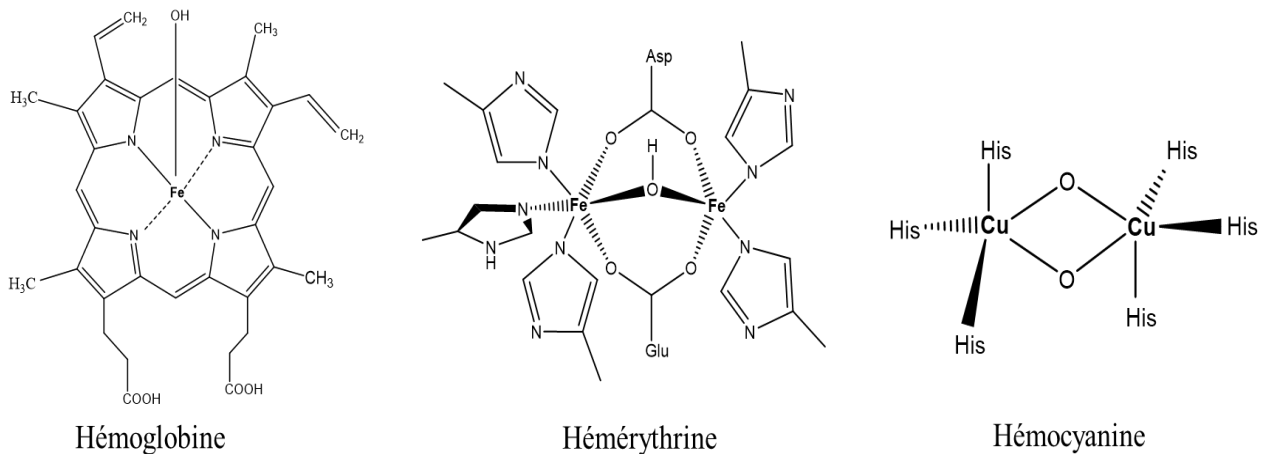


Figure 20 : Les différents types de protéines de transport d'oxygène : Hémoglobine, Hémérythrine et Hémocyanine.

Au cours de cette thèse nous allons nous focaliser sur l'étude des hémocyanines (Hcs) qui sont de grosses protéines résultant de l'assemblage de plusieurs sous-unités pouvant aller jusqu'à des masses de plusieurs millions de daltons. Les hémocyanines sont des protéines extracellulaires présentes dans l'hémolymphe de plusieurs espèces d'arthropodes et de mollusques.^{121, 122} Les hémocyanines d'arthropode se composent d'hexamères ou de multiples d'hexamères tel que (2 x 6 mers, 4 x 6 mers, 6 x 6 mers et 8 x 6 mers).^{122, 123} Chaque sous-unité

d'une masse moléculaire d'environ 72-75 kDa comprend un site actif contenant une paire d'atomes de cuivre qui se lie à une molécule de dioxygène et trois histidines de part et d'autre.¹²⁴⁻¹²⁶ Chaque sous-unité est constituée de trois domaines structuraux : le domaine N-terminal qui est composé d'hélices α , le domaine central qui est principalement hélicoïdal contenant le site actif et le domaine C-terminal qui comprend des feuillets β .^{126, 127} Herskovits *et al* ont montré que les sous-unités au sein de chaque hexamère et les hexamères sont liés entre eux par des interactions hydrophiles et polaires.¹²⁸

Les hémocyanines de mollusque sont des macromolécules cylindriques constituées de 10 à 20 sous-unités ayant une masse allant jusqu'à 9 MDa. Les sous-unités ont huit domaines, chacun ayant une paire d'atomes de cuivre et une masse molaire de 50 kDa.¹²⁹ Il existe différentes espèces d'hémocyanines qui se différencient les unes par rapport aux autres en fonction de la masse moléculaire, du nombre de sous-unités et des conditions de vie de l'organisme hôte. Trois espèces d'hémocyanines provenant d'organismes aux conditions de vie bien différentes vont être étudiées.

2.3.1 L'hémocyanine de la tarentule *Eurypelma californicum*

L'Eurypelma californicum Hc issue de l'araignée homonyme vivant dans le désert de l'Amérique du Nord, est adaptée à un environnement particulièrement hostile caractérisé par des larges fluctuations de température pouvant aller jusqu'à 70°C entre le jour et la nuit. Dans ces conditions extrêmes, l'alimentation en oxygène de l'animal doit être maintenue. Cela implique que sa protéine respiratoire hémocyanine doit être fortement adaptée aux changements environnementaux et doit conserver ses propriétés fonctionnelles telles que la coopérativité et la régulation allostérique de la fixation de l'oxygène.¹³⁰ *L'Eurypelma californicum* Hc, d'une masse moléculaire de 1.7 MDa, est composée de 24 sous-unités qui appartiennent à sept types différents (*a, b, c, d, e, f* et *g*) qui sont représentés ci-dessous en différentes couleurs (Figure 21).

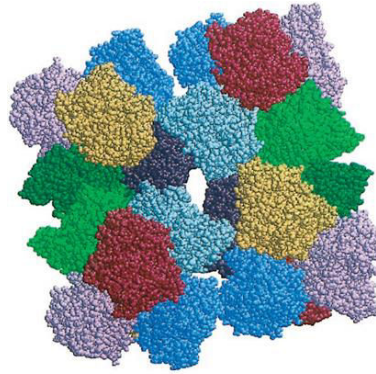


Figure 21 : Schéma de l'hémocyanine de tarentule construit sur la base de la microscopie électronique.¹³¹ Les sous-unités sont représentées en différentes couleurs a: vert, b: gris, c: marron, d: jaune, e: rose, f: bleu et g: rouge.

Les sous-unités *a*, *d*, *e*, *f* et *g* ont une stœchiométrie de quatre tandis qu'elle est de deux pour les sous-unités *b* et *c*.¹³² Chaque sous-unité a des propriétés immunologiques et physicochimiques uniques mais un comportement similaire de liaison à l'oxygène.^{132, 133}

2.3.2 L'hémocyanine du limule *Limulus polyphemus*

L'hémocyanine issue du crabe « sabot de cheval » vivant sur la côte Est de l'Amérique du nord et centrale à une profondeur allant de -30 à -1000 m requiert une certaine tolérance à la température et la salinité. L'hémocyanine du *Limulus polyphemus* est parmi les plus grandes protéines respiratoires trouvées dans la nature avec une masse moléculaire de 3.5 MDa.¹³⁴ Cette protéine est composée de 48 sous-unités qui sont classées en huit hexamères. Ces sous-unités sont présentées avec un nombre différents de copies : six de type I, deux de type IIA, huit des types II, IIIA, IIIB et IV et quatre de type V et VI (Figure 22).^{135, 136}

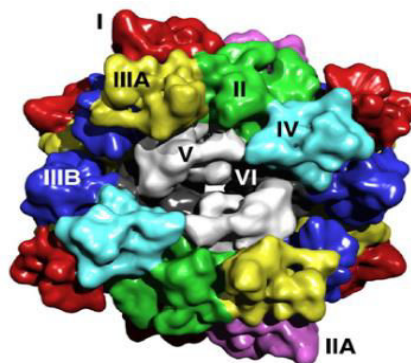


Figure 22 : Schéma 3D du 8x6 mers du *Limulus polyphemus*. Les huit sous-unités sont indiquées en différentes couleurs : Rouge pour le type I, mauve pour type IIA, vert type II, jaune type IIIA, bleue type IIIB, violet type IV, blanc type V et noir type VI.¹³⁴

Chaque type de sous-unité dispose d'une fonction précise et occupe une position spécifique dans le complexe 48-mérique.^{136, 137} La structure cristallographique des hémocyanines est restée longtemps inaccessible en comparaison à d'autres protéines respiratoires comme l'hémoglobine ou l'hémérythrine en raison de la grande longueur des chaînes polypeptidiques, l'hétérogénéité des sous-unités et la complexité des structures quaternaires. Seule la structure cristallographique de la sous-unité II du *Limulus polyphemus* (Lpol-II) a été obtenue avec une résolution de 2.4 Å.^{127, 138} La sous-unité Lpol-II présente une homologie de séquence de 60% avec la sous-unité a de *Eurypelma californicum*, calculée à partir des structures primaires entières de ces sous-unités.¹³⁹

2.3.3 L'hémocyanine de l'écrevisse *Astacus leptodactylus*

L'*Astacus leptodactylus* hémocyanine est issue de l'écrevisse éponyme vivant dans le Sud-Est de l'Europe avec des étés chauds et des hivers froids. Cette espèce tolère une vaste gamme de fluctuation de température (4 - 32°C) et de teneur en sel de l'eau (4 - 44%) ainsi qu'une courte période de basse pression en oxygène.¹⁴⁰ L'hémolymphe de l'*Astacus leptodactylus* contient deux oligomères d'hémocyanines : le 6-mer et le 12-mer. Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude et la caractérisation de l'hémocyanine de l'*Astacus leptodactylus* sous la forme 12-mer de masse moléculaire 0.85 MDa. Le 12-mer se compose de deux 6-mer identiques, qui sont construits à partir de quatre types de sous-unités : α , α' , β et γ .¹⁴¹ La seule différence dans la composition des sous-unités de l'hexamère et du di-hexamère est la sous-unité qui relie les deux hexamères dans ce dernier par la formation d'une liaison disulfure de nature covalente. La sous-unité α' est responsable du contact inter-hexamères.^{141, 142} Le nombre relatif de 12-mer et 6-mer dépend de la température d'acclimatation, un nombre supérieur de 12-mer étant produit à basse température (4 - 6°C). Ce phénomène est unique à l'*Astacus leptodactylus*.^{140 143}

2.4 Le transport de l'oxygène par les protéines respiratoires

2.4.1 Les propriétés du site actif de l'hémocyanine

Le site actif de l'hémocyanine est constitué de deux atomes de cuivre. L'oxygène y est stocké sous la forme de peroxyde reliant les deux atomes de cuivre et fait l'objet de régulations allostériques par la variation de la distance entre les deux atomes de cuivre.

En effet, le processus d'oxygénation implique plusieurs changements significatifs dans le site de liaisons du cuivre des hémocyanines. Le dioxygène va être réduit par les Cu (I) pour former un peroxyde coordonné $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ entre les deux ions de cuivre dont le degré d'oxydation va passer à (II) (Figure 23).¹⁴⁴

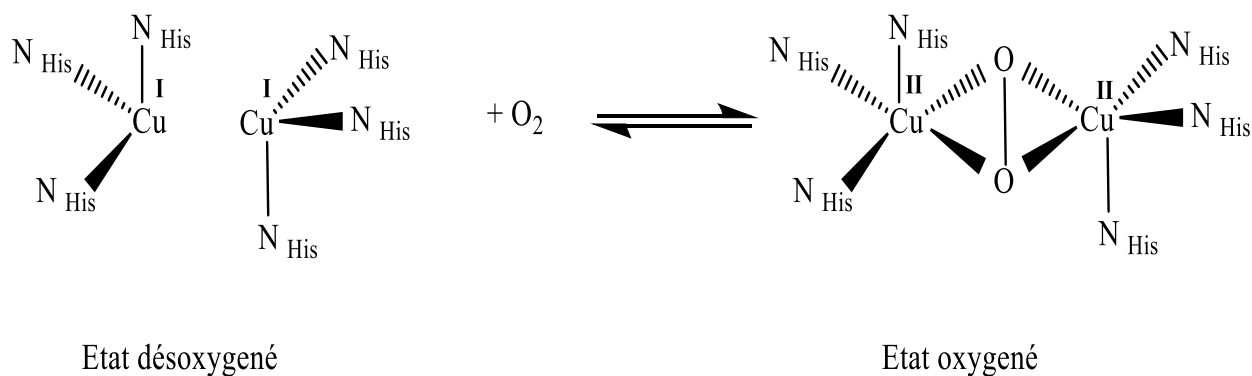


Figure 23 : Site actif au cours de l'oxygénation des hémocyanines.

Des études spectroscopiques telles que celles de spectrométrie d'absorption des rayons-X (EXAFS), ont montré que dans l'état oxygéné les atomes de cuivre adoptent une géométrie tétraédrique et sont séparés par une distance de 3.6 Å, les deux atomes d'oxygène du pont peroxyde se trouvant dans un environnement similaire.^{145, 146} Dans l'état désoxygéné, les atomes de cuivre ont également une géométrie tétraédrique mais se trouvent à une distance de 4.6 Å. La sphère de coordination des atomes de cuivre est complétée dans l'état oxygéné comme dans l'état désoxygéné par trois résidus d'histidine.¹⁴⁷ Peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur l'état désoxygéné des hémocyanines car les ions cuivreux (+I) ne sont pas détectables par RPE, toutes les orbitales d du centre métallique étant pleines.

2.4.2 La coopérativité de la liaison dioxygène

Les protéines possédant des liaisons au dioxygène ne sont pas des monomères indépendants avec un seul site de liaison au dioxygène, mais sont présentes sous la forme d'espèces oligomériques contenant plusieurs sous-unités similaires. Les sous-unités sont maintenues ensemble par des forces de Van der Waals ou par des interactions fortes telles que les liaisons hydrogènes, ponts salins et des liaisons covalentes. Ainsi, la fixation ou la libération du

dioxygène à un seul site peut affecter l'affinité et la cinétique de liaison du dioxygène sur les autres sites.¹⁴⁸ La liaison dioxygène est ainsi dite coopérative. Quand la coopérativité est positive, l'affinité du site vacant augmente avec l'occupation du site adjacent. Ce comportement où la liaison d'une molécule influence la liaison des molécules successives est désigné comme une interaction allostérique homotrope. Une interaction allostérique hétérotope se produit lorsque l'interaction entre la protéine et un autre type de molécules, comme par exemple le polyphosphate pour l'hémoglobine humaine, influence la liaison de la première molécule.¹⁴⁹ Ces molécules sont souvent appelées des effecteurs allostériques. Une des interactions allostériques hétérotopes couramment observée est l'effet de Bohr nommé d'après le biologiste Christian Bohr.

2.4.2.1 L'effet de Bohr

L'interaction entre les sous-unités de l'hémocyanine résulte en une coopérativité élevée de la liaison à l'oxygène, on observe également un effet important de molécules effectrices telles que des protons issus de l'acidité du milieu sur l'affinité pour l'oxygène. Cette corrélation entre l'affinité de l'oxygène et la liaison de la protéine à des protons a été découverte en premier pour l'hémoglobine et est dénommé effet de Bohr lorsqu'elle est négative comme c'est le cas de la plupart des protéines respiratoires ou effet de Bohr inverse lorsqu'elle est positive.¹⁵⁰ Ainsi, à un faible degré d'oxygénation et un pH physiologique, les protons liés à l'hémocyanine favorisent la liaison à l'oxygène, alors qu'à haut degré d'oxygénation, les protons liés à l'hémocyanine vont favoriser la libération de l'oxygène. Par conséquent, les protons dans le sang de l'araignée, le crabe et l'écrevisse vont agir comme des activateurs ou des inhibiteurs allostériques de l'oxygène en fonction du degré d'oxygénation de l'hémocyanine.

Plusieurs modèles complexes tels que Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) et Monod-Wyman-Changeux (MWC) ont été mis au point pour décrire les transitions conformationnelles des sous-unités au sein de l'oligomère ^{151 152}.

2.4.2.2 Le modèle Monod-Wyman-Changeux (MWC)

Différents modèles ont été proposés afin d'étudier le mécanisme moléculaire des interactions allostériques des hémocyanines.^{153, 154} Le modèle le plus adapté est le MWC¹⁵². Ce modèle est composé de deux éléments principaux : le premier est de considérer que la protéine possède au moins deux sites de liaison différents dont un est le site actif de l'enzyme et le deuxième est le

site de régulation. Le deuxième élément est de considérer que la protéine existe sous deux états conformationnels, un état tendu T dans lequel les sites ont une faible affinité pour le ligand et un état relâché R où les sites ont une forte affinité pour le ligand.¹⁵⁵ L'équilibre entre les deux conformations est caractérisé par une constante allostérique $L_0 = [R_0] / [T_0]$

Les hémocyanines des arthropodes composés de plus de six sous-unités ne peuvent pas être décrites par le modèle simple du MWC mais sont en bon accord avec une extension de ce modèle appelé modèle emboîté (Nested) MWC. Celui-ci est caractérisé par quatre conformations (tT, tR, rR, et rT).¹²⁴ Les deux unités allostériques des molécules natives ne peuvent pas adopter toutes les conformations possibles indépendamment les unes des autres, la conformation rR peut se produire uniquement avec rR et tR et la conformation rT seulement avec rT et tR. Cela signifie que les deux unités allostériques sont couplées de façon que seules certaines combinaisons de conformation soient possibles.¹⁵⁶ Des effecteurs allostériques tels que les protons et le lactate peuvent déplacer l'équilibre entre ces conformations.

2.4.3 Les différentes méthodes d'analyses présentes dans la littérature pour caractériser les hémocyanines

La complexité des hémocyanines due à leur grande taille, par rapport à l'hémoglobine ou l'hémérythrine, rend généralement plus complexe leur caractérisation détaillée. L'analyse de la stabilité des hémocyanines a été caractérisée par diverses méthodes. La stabilité thermique des huit unités fonctionnelles de l'hémocyanine β du mollusque *gastropodan helix pomatia*, a été étudiée par spectroscopie FTIR. La plupart des unités fonctionnelles ont été trouvées stables dans la gamme de température allant de 77 à 83 °C.¹⁵⁷ Pavlina *et al* se sont focalisés sur l'étude de la stabilité de la structure quaternaire des hémocyanines de *L. polyphemus* et de *P. vulgaris* en utilisant la spectroscopie de fluorescence et des agents de dénaturation. Il a été observé que la structure quaternaire des protéines Hcs est stabilisée par les forces polaires et hydrophiles et leurs procédures de dénaturation sont constituées de deux étapes, commençant par la dissociation de la molécule native en ses sous-unités puis par une dénaturation des sous-unités.¹⁵⁸ La stabilité thermique de l'hémocyanine du *L. polyphemus* et *E. californicum* a été étudiée par dichroïsme circulaire (Far-UV-CD). Les deux formes oxygénées de ces arthropodes sont thermostables avec des températures de fusion de 91 et 92.5°C respectivement.¹⁵⁹ Au-delà de leur stabilité, l'analyse des états d'oxygénation des hémocyanines a été rapportée par différentes méthodes. Decker *et al* ont étudié les structures quaternaires de l'état oxygéné et

1 - Introduction

désoxygéné de l'hémocyanine de la tarentule en utilisant la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).¹⁶⁰ Des différences considérables ont été observées entre les deux états d'oxygénation ainsi que des changements au niveau de la structure quaternaire à différents niveaux structuraux des sous-unités de la protéine. Brouwer *et al* ont cherché à étudier les formes oxygénées et désoxygénées de l'hémocyanine *helix pomatia* et *L. polyphemus* par « Stopped flow » ainsi que par des expériences de vitesse de sédimentation.¹⁶¹ Ils ont conclu que la forme oxygénée de l'hémocyanine du *L.polyphemus* et *l'helix pomatia* se dissocie plus rapidement que les formes désoxygénées lorsque le calcium est éliminé à un pH basique et que les changements de structure quaternaire des deux hémocyanines induites par l'oxygénation affectent la stabilité structurale des oligomères.

Objectifs de la thèse

➤ Interactions Adx/AdR

Les interactions protéines-protéines sont essentielles pour pratiquement tous les processus biologiques, dans la formation de structures macromoléculaires et cellulaires et dans des complexes enzymatiques responsables de la régulation des voies de signalisation. Bien que les propriétés des systèmes Adx et AdR aient été étudiées extensivement, le mécanisme de transfert d'électron est encore mal connu. Lors de cette thèse nous allons appliquer les méthodes de spectroscopies Raman et infrarouge à l'étude de l'interaction entre ces différentes protéines afin d'apporter de nouvelles données pour compléter la compréhension de ce mécanisme d'échange électronique.

➤ Interactions PDZ et peptides viraux

L'étude de l'interaction entre les domaines PDZ et les peptides viraux présente un intérêt majeur et fournit des informations importantes dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques antivirales. Comme la structure cristallographique de la PDZ3 de la protéine Scribble n'est pas encore résolue et qu'il n'existe que peu d'informations dans la littérature sur les PDZ3, PDZ4 et PDZ3-4 par comparaison au domaine PDZ1 de la protéine MAGI-1, nous allons étudier dans le cadre de ce travail la structure secondaire et tertiaire de ces domaines en présence et en absence des peptides afin de pouvoir éventuellement estimer la structure et également observer les changements conformationnels qui se produisent lors de la formation des complexes.

➤ Stabilité des hémocyanines et influence de l'oxygène sur la structure secondaire

A notre connaissance, il n'existe aucune donnée concernant la stabilité des Hcs du *L. polyphemus* et *E. californicum* sous l'effet de très basses températures. L'objectif de ce projet sera de présenter une étude comparative de stabilité entre ces deux protéines tout en suivant l'évolution de la structure secondaire via la bande amide I en fonction de la

température. Cette dernière pourra être contrôlée à l'aide d'un système cryogénique permettant d'atteindre des températures basses de 20 K.

Comme la fonction principale de ces protéines est le transport de l'oxygène, le deuxième objectif de ce projet sera d'étudier l'influence de la teneur en oxygène sur la structure secondaire des Hcs du *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus*. Cette étude est à notre connaissance la première s'intéressant à l'influence de l'oxygène sur la structure secondaire.

3 Références bibliographiques

1. Zhang, Z., Witham, S., and Alexov, E. (2011) On the role of electrostatics in protein-protein interactions, *Phys Biol* 8.
2. Berggard, T., Linse, S., and James, P. (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions, *Proteomics* 7, 2833-2842.
3. Lev, I., Volpe, M., Goor, L., Levinton, N., Emuna, L., and Ben-Aroya, S. (2013) Reverse PCA, a Systematic Approach for Identifying Genes Important for the Physical Interaction between Protein Pairs, *Plos Genet* 9.
4. Pawson, T., and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains, *Science* 300, 445-452.
5. Das, A. A., Sharma, O. P., Kumar, M. S., Krishna, R., and Mathur, P. P. (2013) PepBind: A Comprehensive Database and Computational Tool for Analysis of Protein-peptide Interactions, *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 11, 241-246.
6. Petsalaki, E., and Russell, R. B. (2008) Peptide-mediated interactions in biological systems: new discoveries and applications, *Curr Opin Biotech* 19, 344-350.
7. Neduva, V., Linding, R., Su-Angrand, I., Stark, A., de Masi, F., Gibson, T. J., Lewis, J., Serrano, L., and Russell, R. B. (2005) Systematic discovery of new recognition peptides mediating protein interaction networks, *Plos Biol* 3, 2090-2099.
8. Pattin, K. A., and Moore, J. H. (2009) Role for protein-protein interaction databases in human genetics, *Expert Rev Proteomic* 6, 647-659.
9. Blazer, L. L., and Neubig, R. R. (2009) Small Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitors as CNS Therapeutic Agents: Current Progress and Future Hurdles, *Neuropsychopharmacology* 34, 126-141.
10. White, A. W., Westwell, A. D., and Braheimi, G. (2008) Protein-protein interactions as targets for small-molecule therapeutics in cancer, *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10, null-null.
11. Pelletier, H., and Kraut, J. (1992) Crystal-Structure of a Complex between Electron-Transfer Partners, Cytochrome-C Peroxidase and Cytochrome-C, *Science* 258, 1748-1755.
12. Sarewicz, M., Borek, A., Daldal, F., Froncisz, W., and Osyczka, A. (2008) Demonstration of short-lived complexes of cytochrome c with cytochrome bc(1) by

- EPR spectroscopy - Implications for the mechanism of interprotein electron transfer, *Journal of Biological Chemistry* 283, 24826-24836.
13. Carbonell, P., Nussinov, R., and del Sol, A. (2009) Energetic determinants of protein binding specificity: Insights into protein interaction networks, *Proteomics* 9, 1744-1753.
 14. Israelachvili, J. N. (2011) Intermolecular and Surface Forces (Third Edition), In *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)* (Israelachvili, J. N., Ed.), Academic Press, San Diego.
 15. Fersht, A. R., Shi, J. P., Knilljones, J., Lowe, D. M., Wilkinson, A. J., Blow, D. M., Brick, P., Carter, P., Waye, M. M. Y., and Winter, G. (1985) Hydrogen-Bonding and Biological Specificity Analyzed by Protein Engineering, *Nature* 314, 235-238.
 16. Matthews, B. W. (2001) Hydrophobic Interactions in Proteins, In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.
 17. Hunenberger, P. H., Borjesson, U., and Lins, R. D. (2001) Electrostatic interactions in biomolecular systems, *Chimia* 55, 861-866.
 18. Roth, C. M., Neal, B. L., and Lenhoff, A. M. (1996) Van der Waals interactions involving proteins, *Biophysical Journal* 70, 977-987.
 19. Atkins, P., and Paula, J. (2010) Molecular Interactions, In *Physical Chemistry*, p 972, Oxford University Press, Oxford.
 20. Karshikoff, A. (2006) *Non-Covalent interactions in proteins*, Imperial College Press, London.
 21. Baker, E. N., and Hubbard, R. E. (1984) Hydrogen-Bonding in Globular-Proteins, *Prog Biophys Mol Bio* 44, 97-179.
 22. Jeffrey, G. A. (1997) *An introduction to hydrogen bonding*, Oxford University Press, New York.
 23. Garrett, R. H., and Grisham, C. M. (2008) *Biochemistry*, 4th ed., Cengage Learning, Boston.
 24. Sharp, K. (2002) Electrostatic Interactions in Proteins, In *Computational Approaches to Biochemical Reactivity* (Náray-Szabó, G., and Warshel, A., Eds.), pp 199-235, Springer Netherlands.
 25. Luedtke, R., Owen, C. S., Vanderkooi, J. M., and Karush, F. (1981) Proximity Relationships within the Fc Segment of Rabbit Immunoglobulin-G Analyzed by Resonance Energy-Transfer, *Biochemistry* 20, 2927-2936.
 26. Jares-Erijman, E. A., and Jovin, T. M. (2003) FRET imaging, *Nat Biotechnol* 21, 1387-1395.
 27. Verbrugge, S., Lansky, Z., and Peterman, E. J. G. (2009) Kinesin's step dissected with single-motor FRET, *P Natl Acad Sci USA* 106, 17741-17746.
 28. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature* 388, 882-887.
 29. Hanlon, A. D., Larkin, M. I., and Reddick, R. M. (2010) Free-Solution, Label-Free Protein-Protein Interactions Characterized by Dynamic Light Scattering, *Biophysical Journal* 98, 297-304.

30. P, T., M, C., P, M., and TC, P. (2005) Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology, *Ann Ist Super Sanita* 41, 437-441.
31. Homola, J. (2006) *surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer, Berlin.
32. Lewis, E., and Murphy, K. (2005) Isothermal Titration Calorimetry, In *Protein-Ligand Interactions* (Ulrich Nienhaus, G., Ed.), pp 1-15, Humana Press.
33. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter, *Anal Biochem* 179, 131-137.
34. Shekhtman, A., and Burz, D. S. (2012) *Protein NMR Techniques*, Humana Press.
35. Shimaoka, M. (2011) *Integrin an Cell Adhesion Molecules*, Humana Press, New York.
36. Sanglier, S., Leize, E., Van Dorsselaer, A., and Zal, F. (2003) Comparative ESI-MS study of similar to 2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: From protein oligomeric state to biotope, *J Am Soc Mass Spectr* 14, 419-429.
37. Daniel, J. M., Friess, S. D., Rajagopalan, S., Wendt, S., and Zenobi, R. (2002) Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry, *Int J Mass Spectrom* 216, 1-27.
38. Schuck, P. (2007) *Protein Interactions Biophysical Approaches for the Study of Complex Reversible Systems*, Springer, New York.
39. Grinberg, A. V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., and Bernhardt, R. (2000) Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 40, 590-612.
40. Pikuleva, I. A., Tesh, K., Waterman, M. R., and Kim, Y. (2000) The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers, *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 373, 44-55.
41. Usanov, S. A., Chashchin, V. L., and Akhrem, A. A. (1990) Cytochrome P-450 dependent : pathways of the biosynthesis of steroid hormones, In *Frontiers in Biotransformation* 3, 1-57.
42. Bernhardt, R. (1996) Cytochrome P450: Structure, function, and generation of reactive oxygen species, *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 127, 137-221.
43. Beckert, V., and Bernhardt, R. (1997) Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes P450_{scc} and P450_{11 beta}, *Journal of Biological Chemistry* 272, 4883-4888.
44. Muller, A., Muller, J. J., Muller, Y. A., Uhlmann, H., Bernhardt, R., and Heinemann, U. (1998) New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108), *Structure* 6, 269-280.
45. Hanukoglu, I. (1992) Steroidogenic Enzymes - Structure, Function, and Role in Regulation of Steroid-Hormone Biosynthesis, *J Steroid Biochem* 43, 779-804.
46. Lambeth, J. D., Seybert, D. W., Lancaster, J. R., Salerno, J. C., and Kamin, H. (1982) Steroidogenic Electron-Transport in Adrenal-Cortex Mitochondria, *Mol Cell Biochem* 45, 13-31.
47. Ziegler, G. A., Vornhein, C., Hanukoglu, I., and Schulz, G. E. (1999) The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis, *Journal Of Molecular Biology* 289, 981-990.

48. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J Biotechnol* 124, 128-145.
49. Virus, C., and Bernhardt, R. (2008) Molecular evolution of a steroid hydroxylating cytochrome P450 using a versatile steroid detection system for screening, *Lipids* 43, 1133-1141.
50. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., and Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains, *Bba-Gen Subjects* 1770, 330-344.
51. Bleif, S., Hannemann, F., Lisurek, M., von Kries, J. P., Zapp, J., Dietzen, M., Antes, I., and Bernhardt, R. (2011) Identification of CYP106A2 as a Regioselective Allylic Bacterial Diterpene Hydroxylase, *Chembiochem*.
52. Zehentgruber, D., Hannemann, F., Bleif, S., Bernhardt, R., and Lutz, S. (2010) Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2, *Chembiochem* 11, 713-721.
53. Berg, A., Ingelmansundberg, M., and Gustafsson, J. A. (1979) Purification and Characterization of Cytochrome P-450meg, *Journal of Biological Chemistry* 254, 5264-5271.
54. Ewen, K. M., Kleser, M., and Bernhardt, R. (2011) Adrenodoxin: the archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins, *Biochimica Biophysica Acta* 1814, 111-125.
55. Muller, J. J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., and Heinemann, U. (2001) Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis, *Journal Of Biological Chemistry* 276, 2786-2789.
56. Beilke, D., Weiss, R., Lohr, F., Pristovsek, P., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Ruterjans, H. (2002) A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin, *Biochemistry* 41, 7969-7978.
57. Hanukoglu, I., Privalle, C. T., and Jefcoate, C. R. (1981) Mechanisms of Ionic Activation of Adrenal Mitochondrial Cytochrome-P-450scc and Cytochrome-P450(11-Beta), *Journal of Biological Chemistry* 256, 4329-4335.
58. Kido, T., and Kimura, T. (1979) The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P-450scc with adrenodoxin and adrenodoxin reductase.adrenodoxin complex. The implication in ACTH function, *Journal of Biological Chemistry* 254, 11806-11815.
59. Hara, T., and Takeshima, M. (1994) Conclusive evidence of a quaternary cluster model for cholesterol side chain cleavage reaction catalyzed by cytochrome P450scc, In *8th international Conference*, pp 417-420, Paris.
60. Muller, A., Muller, J. J., Muller, Y. A., Uhlmann, H., Bernhardt, R., and Heinemann, U. (1998) New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108), *Structure* 6, 269-280.
61. Shakya, S. K., Gu, W., and Helms, V. (2005) Molecular dynamics simulation of truncated bovine adrenodoxin, *Biopolymers* 78, 9-20.

62. Bichet, A., Hannemann, F., Rekowski, M., and Bernhardt, R. (2007) A new application of the yeast two-hybrid system in protein engineering, *Protein Engineering Design and Selection* 20, 117-123.
63. Schiffler, B., Zollner, A., and Bernhardt, R. (2011) Kinetic and optical biosensor study of adrenodoxin mutant AdxS112W displaying an enhanced interaction towards the cholesterol side chain cleavage enzyme (CYP11A1), *Eur Biophys J Biophys* 40, 1275-1282.
64. Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H. W., and Bernhardt, R. (2001) The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450_{scc}) and CYP11B1 (cytochrome P450_{11β}). Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin, *J Biol Chem* 276, 36225-36232.
65. Strushkevich, N., MacKenzie, F., Cherkasova, T., Grabovec, I., Usanov, S., and Park, H. W. (2011) Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system (vol 108, pg 10139, 2011), *P Natl Acad Sci USA* 108, 15535-15535.
66. Coghlan, V. M., and Vickery, L. E. (1991) Site-Specific Mutations in Human Ferredoxin That Affect Binding to Ferredoxin Reductase and Cytochrome-P450_{scc}, *Journal of Biological Chemistry* 266, 18606-18612.
67. Uhlmann, H., Kraft, R., and Bernhardt, R. (1994) C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450, *J Biol Chem* 269, 22557-22564.
68. Archakov, A. I., and Ivanov, Y. D. (2011) Application of AFM and optical biosensor for investigation of complexes formed in P450-containing monooxygenase systems, *Bba-Proteins Proteom* 1814, 102-110.
69. Muller, J. J., Lapko, A., Ruckpaul, K., and Heinemann, U. (2003) Modeling of electrostatic recognition processes in the mammalian mitochondrial steroid hydroxylase system, *Biophysical Chemistry* 100, 281-292.
70. Schiffler, B., Zollner, A., and Bernhardt, R. (2004) Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study, *Journal of Biological Chemistry* 279, 34269-34276.
71. Keizers, P. H., Mersinli, B., Reinle, W., Donauer, J., Hiruma, Y., Hannemann, F., Overhand, M., Bernhardt, R., and Ubbink, M. (2010) A solution model of the complex formed by adrenodoxin and adrenodoxin reductase determined by paramagnetic NMR spectroscopy, *Biochemistry* 49, 6846-6855.
72. Muller, E. C., Lapko, A., Otto, A., Muller, J. J., Ruckpaul, K., and Heinemann, U. (2001) Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{scc}. Mass spectrometry and Edman degradation of complexes of the steroidogenic hydroxylase system, *Eur J Biochem* 268, 1837-1843.
73. Colas, H., Ewen, K. M., Hannemann, F., Bistolos, N., Wollenberger, U., Bernhardt, R., and de Oliveira, P. (2012) Direct and mediated electrochemical response of the cytochrome P450 106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368, *Bioelectrochemistry* 87, 71-77.

74. Cho, K. O., Hunt, C. A., and Kennedy, M. B. (1992) The Rat-Brain Postsynaptic Density Fraction Contains a Homolog of the Drosophila Disks-Large Tumor Suppressor Protein, *Neuron* 9, 929-942.
75. Woods, D. F., and Bryant, P. J. (1993) Zo-1, Dlg1 and Pcd-95/Sap90 - Homologous Proteins in Tight, Septate and Synaptic Cell-Junctions, *Mech Develop* 44, 85-89.
76. Kennedy, M. B. (1995) Origin of Pdz (Dhr, Glgf) Domains, *Trends Biochem Sci* 20, 350-350.
77. Zhang, M. J., and Wang, W. N. (2003) Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins, *Accounts Chem Res* 36, 530-538.
78. Fanning, A. S., and Anderson, J. M. (1996) Protein-protein interactions: PDZ domain networks, *Curr Biol* 6, 1385-1388.
79. Cabral, J. H. M., Petosa, C., Sutcliffe, M. J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., and Liddington, R. C. (1996) Crystal structure of a PDZ domain, *Nature* 382, 649-652.
80. Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: Molecular basis of peptide recognition by PDZ, *Cell* 85, 1067-1076.
81. Hung, A. Y., and Sheng, M. (2002) PDZ domains: Structural modules for protein complex assembly, *Journal of Biological Chemistry* 277, 5699-5702.
82. Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., and Cantley, L. C. (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains, *Science* 275, 73-77.
83. Harris, B. Z., and Lim, W. A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly, *J Cell Sci* 114, 3219-3231.
84. Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N. (2000) Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors, *Science* 289, 113-116.
85. Bilder, D., Birnbaum, D., Borg, J. P., Bryant, P., Huibregtse, J., Jansen, E., Kennedy, M. B., Labouesse, M., Legouis, R., Mechler, B., Perrimon, N., Petit, M., and Sinha, P. (2000) Collective nomenclature for LAP proteins, *Nat Cell Biol* 2, E114-E114.
86. Munger, K., and Howley, P. M. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Res* 89, 213-228.
87. Ganguly, N., and Parihar, S. P. (2009) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis, *J Biosciences* 34, 113-123.
88. Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990) Association of Human Papillomavirus Type-16 and Type-18 E6 Proteins with P53, *Science* 248, 76-79.
89. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990) The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Type-16 and Type-18 Promotes the Degradation of P53, *Cell* 63, 1129-1136.
90. Gardiol, D., Kuhne, C., Glaunsinger, B., Lee, S. S., Javier, R., and Banks, L. (1999) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation, *Oncogene* 18, 5487-5496.

91. Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., and Javier, R. T. (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins, *Journal of Virology* 74, 9680-9693.
92. Nakagawa, S., and Huibregtse, J. M. (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase, *Mol Cell Biol* 20, 8244-8253.
93. Simonson, S. J. S., Difilippantonio, M. J., and Lambert, P. F. (2005) Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential, *Cancer Research* 65, 8266-8273.
94. Liu, Y., Henry, G. D., Hegde, R. S., and Baleja, J. D. (2007) Solution structure of the hDlg/SAP97 PDZ2 domain and its mechanism of interaction with HPV-18 Papillomavirus E6 protein, *Biochemistry* 46, 10864-10874.
95. Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T., and Ishibashi, M. (1997) Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein, *P Natl Acad Sci USA* 94, 11612-11616.
96. Le, S. S., Weiss, R. S., and Javier, R. T. (1997) Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein, *P Natl Acad Sci USA* 94, 6670-6675.
97. Cann, A. J., and Chen, I. (1996) Human T-cell leukemia virus types I and II., In *Fields Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia.
98. Manns, A., Hisada, M., and Grenade, L. L. (1999) Human T-lymphotropic virus type I infection, *The Lancet* 353, 1951-1958.
99. Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F., and Jalinet, P. (1998) The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins, *Oncogene* 16, 643-654.
100. Arpin-Andre, C., and Mesnard, J. M. (2007) The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells, *Journal of Biological Chemistry* 282, 33132-33141.
101. Fournane, S., Charbonnier, S., Chapelle, A., Kieffer, B., Orfanoudakis, G., Trave, G., Masson, M., and Nomine, Y. (2011) Surface plasmon resonance analysis of the binding of high-risk mucosal HPV E6 oncoproteins to the PDZ1 domain of the tight junction protein MAGI-1, *Journal of Molecular Recognition* 24, 511-523.
102. Charbonnier, S., Nomine, Y., Ramirez, J., Luck, K., Chapelle, A., Stote, R. H., Trave, G., Kieffer, B., and Atkinson, R. A. (2011) The Structural and Dynamic Response of MAGI-1 PDZ1 with Noncanonical Domain Boundaries to the Binding of Human Papillomavirus E6, *Journal of Molecular Biology* 406, 745-763.
103. Hou, T. J., Zhang, W., Case, D. A., and Wang, W. (2008) Characterization of domain-peptide interaction interface: A case study on the amphiphysin-1 SH3 domain, *Journal of Molecular Biology* 376, 1201-1214.
104. Li, N., Hou, T. J., Ding, B., and Wang, W. (2011) Characterization of PDZ domain-peptide interaction interface based on energetic patterns, *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 79, 3208-3220.

105. Hinz, H. J., Steif, C., Vogl, T., Meyer, R., Renner, M., and Ledermuller, R. (1993) Fundamentals of Protein Stability, *Pure Appl Chem* 65, 947-952.
106. Privalov, P. L., and Khechinashvili, N. N. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study, *Journal of Molecular Biology* 86, 665-684.
107. Pace, C. N. (1990) Conformational Stability of Globular-Proteins, *Trends Biochem Sci* 15, 14-17.
108. Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M., and Gajiwala, K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins, *Faseb J* 10, 75-83.
109. Kessel, A., and Ben-Tal, N. (2010) *Introduction to Proteins: Structure, Function, and Motion*, CRC Press, Boca Raton, FL.
110. Creighton, T. E. (1992) *Protein Folding*, W. H. Freeman Company, Oxford.
111. Rose, G. D. (2002) *Unfolded Proteins*, Vol. 62, Elsevier Science, San Diego.
112. Shortle, D. (1993) Denatured States of Proteins and Their Roles in Folding and Stability, *Curr Opin Struc Biol* 3, 66-74.
113. Bull, H. B., and Breese, K. (1973) Thermal stability of proteins, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 158, 681-686.
114. Kim, T. D., Ryu, H. J., Cho, H. I., Yang, C.-H., and Kim, J. (2000) Thermal Behavior of Proteins: Heat-Resistant Proteins and Their Heat-Induced Secondary Structural Changes†, *Biochemistry* 39, 14839-14846.
115. Storey, K. B., and Storey, J. M. (2001) *Protein Adaptations and Signal Transduction*, Elsevier Science, Amsterdam.
116. Lee, R. E., and Costanzo, J. P. (1998) Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals, *Annu Rev Physiol* 60, 55-72.
117. Storey, K. B., and Storey, J. M. (1996) Natural freezing survival in animals, *Annu Rev Ecol Syst* 27, 365-386.
118. Prass, R. L., Isohashi, F., and Utter, M. F. (1980) Purification and Characterization of an Extra-Mitochondrial Acetyl Coenzyme-a Hydrolase from Rat-Liver, *Journal of Biological Chemistry* 255, 5215-5223.
119. Garcia-Arribas, O., Mateo, R., Tomczak, M. M., Davies, P. L., and Mateu, M. G. (2007) Thermodynamic stability of a cold-adapted protein, type III antifreeze protein, and energetic contribution of salt bridges, *Protein Science* 16, 227-238.
120. Vinogradov, S. N. (1985) The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 82, 1-15.
121. van Holde, K. E., and Miller, K. I. (1995) Hemocyanins, In *Advances in Protein Chemistry* (C.B. Anfinsen, F. M. R. J. T. E., and David, S. E., Eds.), pp 1-81, Academic Press.
122. Markl, J., and Decker, H. (1992) *Blood and Tissue Oxygen Carriers*, Vol. 13, Springer.
123. Holde, K. E. v., and Miller, K. I. (1982) Haemocyanins, *Q Rev Biophys* 15, 1-129.

124. Decker, H., Hellmann, N., Jaenicke, E., Lieb, B., Meissner, U., and Markl, J. (2007) Minireview: Recent progress in hemocyanin research, *Integrative and Comparative Biology* 47, 631-644.
125. Markl, J. (1986) Evolution and Function of Structurally Diverse Subunits in the Respiratory Protein Hemocyanin from Arthropods, *Biol Bull* 171, 90-115.
126. Volbeda, A., and Hol, W. G. J. (1989) Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* 209, 249-279.
127. Magnus, K. A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., and Hol, W. G. J. (1994) Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 19, 302-309.
128. Herskovits, T. T. (1988) Recent Aspects of the Subunit Organization and Dissociation of Hemocyanins, *Comp Biochem Phys B* 91, 597-611.
129. Linzen, B., Soeter, N. M., Riggs, A. F., Schneider, H. J., Schartau, W., Moore, M. D., Yokota, E., Behrens, P. Q., Nakashima, H., Takagi, T., Nemoto, T., Vereijken, J. M., Bak, H. J., Beintema, J. J., Volbeda, A., Gaykema, W. P. J., and Hol, W. G. J. (1985) The Structure of Arthropod Hemocyanins, *Science* 229, 519-524.
130. Sterner, R., Vogl, T., Hinz, H. J., Penz, F., Hoff, R., Foll, R., and Decker, H. (1995) Extreme Thermostability of Tarantula Hemocyanin, *FEBS Letters* 364, 9-12.
131. Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Schweikardt, T., Decker, H., and Burmester, T. (2000) Complete Sequence of the 24-mer Hemocyanin of the Tarantula *Eurypelma californicum* : structure and intramolecular evolution of the subunits, *Journal of Biological Chemistry* 275, 39339-39344.
132. Markl, J., Savel, A., Decker, H., and Linzen, B. (1980) Hemocyanins in Spiders .9. Homogeneity, Subunit Composition and the Basic Oligomeric Structure of *Eurypelma-Californicum* Hemocyanin, *H-S Z Physiol Chem* 361, 649-660.
133. Decker, H., Markl, J., Loewe, R., and Linzen, B. (1979) Hemocyanins in Spiders .8. Oxygen-Affinity of the Individual Subunits Isolated from *Eurypelma-Californicum* Hemocyanin, *H-S Z Physiol Chem* 360, 1505-1507.
134. Martin, A. G., Depoix, F., Stohr, M., Meissner, U., Hagner-Holler, S., Hammouti, K., Burmester, T., Heyd, J., Wriggers, W., and Markl, J. (2007) *Limulus polyphemus* hemocyanin: 10 angstrom cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers, *Journal of Molecular Biology* 366, 1332-1350.
135. Brenowitz, M., Bonaventura, C., Bonaventura, J., and Gianazza, E. (1981) Subunit Composition of a High Molecular-Weight Oligomer - *Limulus-Polyphemus* Hemocyanin, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 210, 748-761.
136. Lamy, J., Lamy, J., Sizaret, P. Y., Billiald, P., Jolles, P., Jolles, J., Feldmann, R. J., and Bonaventura, J. (1983) Quaternary Structure of *Limulus-Polyphemus* Hemocyanin, *Biochemistry* 22, 5573-5583.
137. Sullivan, B., Bonaventura, J., and Bonaventura, C. (1974) Functional Differences in the Multiple Hemocyanins of the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus* L, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 2558-2562.

138. Hazes, B., Kalk, K. H., Hol, W. G. J., Magnus, K. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., and Dauter, Z. (1993) Crystal structure of deoxygenated limulus polyphemus subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: Clues for a mechanism for allosteric regulation, *Protein Science* 2, 597-619.
139. Buzy, A., Gagnon, J., Lamy, J., Thibault, P., Forest, E., and Hudryclergeon, G. (1995) Complete Amino-Acid-Sequence of the Aa6 Subunit of the Scorpion Androctonus-Australis Hemocyanin Determined by Edman Degradation and Mass-Spectrometry, *European Journal of Biochemistry* 233, 93-101.
140. Decker, H., and Foll, R. (2000) Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus*, *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* 127, 147-154.
141. Stocker, W., Raeder, U., Bijlholt, M. M. C., Wichertjes, T., Vanbruggen, E. F. J., and Markl, J. (1988) The Quaternary Structure of 4 Crustacean 2-Hexameric Hemocyanins - Immunocorrelation, Stoichiometry, Reassembly and Topology of Individual Subunits, *J Comp Physiol B* 158, 271-289.
142. Markl, J., Decker, H., Stocker, W., Savel, A., Linzen, B., Schutter, W. G., and Vanbruggen, E. F. J. (1981) On the Role of Dimeric Subunits in the Quaternary Structure of Arthropod Hemocyanins, *H-S Z Physiol Chem* 362, 185-188.
143. Kolsch, A., Hornemann, J., Wengenroth, C., and Hellmann, N. (2013) Differential regulation of hexameric and dodecameric hemocyanin from *A-leptodactylus*, *Bba-Proteins Proteom* 1834, 1853-1859.
144. Freedman, T. B., Loehr, J. S., and Loehr, T. M. (1976) Resonance Raman Study of Copper Protein, Hemocyanin - New Evidence for Structure of Oxygen-Binding Site, *Journal of the American Chemical Society* 98, 2809-2815.
145. Woolery, G. L., Powers, L., Winkler, M., Solomon, E. I., and Spiro, T. G. (1984) Exafs Studies of Binuclear Copper Site of Oxyzidohemocyanin, Deoxyzidohemocyanin, Metaquozidohemocyanin, Metfluorozidohemocyanin, and Metazidohemocyanin from Arthropods and Mollusks, *Journal of the American Chemical Society* 106, 86-92.
146. Thamann, T. J., Loehr, J. S., and Loehr, T. M. (1977) Resonance Raman Study of Oxyhemocyanin with Unsymmetrically Labeled Oxygen, *Journal of the American Chemical Society* 99, 4187-4189.
147. Magnus, K. A., Tonthat, H., and Carpenter, J. E. (1994) Recent Structural Work on the Oxygen-Transport Protein Hemocyanin, *Chem Rev* 94, 727-735.
148. Jameson, G. B., and Ibers, J. A. (1994) Biological and synthetic oxygen carriers, In *Bioinorganic Chemistry* (Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S., Eds.), University Science Books, Mill Valley, CA.
149. Gutfreund, H. (1982) Allosteric Effects in Haemoglobin, *FEBS Letters* 148, 149-150.
150. Sterner, R., and Decker, H. (1994) Inversion of the Bohr Effect Upon Oxygen-Binding to 24-Meric Tarantula Hemocyanin, *P Natl Acad Sci USA* 91, 4835-4839.
151. Koshland, D. E., Némethy, G., and Filmer, D. (1966) Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits*, *Biochemistry* 5, 365-385.
152. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *Journal of Molecular Biology* 12, 88-118.

153. Johnson, B. A., Bonaventura, C., and Bonaventura, J. (1988) Allostery in *Callinectes-Sapidus* Hemocyanin - Cooperative Oxygen Binding and Interactions with L-Lactate, Calcium, and Protons, *Biochemistry* 27, 1995-2001.
154. Makino, N. (1986) Analysis of Oxygen Binding to *Panulirus-Japonicus* Hemocyanin - the Effect of Divalent-Cations on the Allosteric Transition, *European Journal of Biochemistry* 154, 49-55.
155. Ben-Naim, A. (2001) *Cooperativity and regulation in biochemical processes*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York.
156. Decker, H., and Sterner, R. (1990) Nested Allostery of Arthropodan Hemocyanin (*Eurypelma-Californicum* and *Homarus-Americanus*) - the Role of Protons, *Journal of Molecular Biology* 211, 281-293.
157. Yesilyurt, B. T., Gielens, C., and Meersman, F. (2008) Thermal stability of homologous functional units of *Helix pomatia* hemocyanin does not correlate with carbohydrate content, *Febs Journal* 275, 3625-3632.
158. Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Stevanovic, S., Hristova, R., Atanasov, B., Nikolov, P., and Voelter, W. (2005) Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61, 1207-1217.
159. Nikolova Georgieva, D., Stoeva, S., Abid Ali, S., Abbasi, A., Genov, N., and Voelter, W. (1998) Circular dichroism study of the hemocyanin thermostability, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 54, 765-771.
160. Decker, H., Hartmann, H., Sterner, R., Schwarz, E., and Pilz, I. (1996) Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin, *Febs Letters* 393, 226-230.
161. Brouwer, M., Bonaventura, C., and Bonaventura, J. (1981) Effect of Oxygen and Allosteric Effectors on Structural Stability of Oligomeric Hemocyanins of the Arthropod, *Limulus-Polyphemus*, and the Mollusk, *Helix-Pomatia*, *Biochemistry* 20, 1842-1848.

2 - MATRIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

Liste des figures

Figure 1 : Représentation du spectre électromagnétique.	47
Figure 2 : Les différents modes normaux de vibration observés en IR.....	49
Figure 3 : Fonctionnement d'un interféromètre de Michelson.	50
Figure 4 : En (A) l'interférogramme et en (B) le spectre d'absorption obtenu après la transformée de Fourier	51
Figure 5 : Spectre d'absorption d'une protéine dans l'infrarouge moyen (A) et dans l'infrarouge lointain (B).	53
Figure 6 : Schéma des différentes parties constituant la cellule de mesure d'absorption infrarouge	55
Figure 7 : Descriptif des différents compartiments du cryostat à hélium.	56
Figure 8 : Schéma de la cellule électrochimique en (A) avant assemblage et en (B) après assemblage.	57
Figure 9 : Représentation de la grille d'or modifiée.	58
Figure 10 : Spectre d'absorption des formes oxydée et réduite de l'Adx en (A) et spectre différentiel en (B).	60
Figure 11 : Représentation schématique du principe de l'ATR.....	61
Figure 12 : Schéma du principe de l'effet Raman et de l'effet de résonance Raman.	63

Liste des tableaux

Tableau 1 : Equipements utilisés pour la réalisation des mesures en infrarouge en fonction de la gamme spectrale étudiée.	52
Tableau 2 : Contribution des bandes amide du squelette polypeptidique dans l'infrarouge moyen et lointain.....	53
Tableau 3 : Attribution des positions des structures secondaires de la bande amide I.	54
Tableau 4 : Liste des 19 médiateurs utilisés dans les expériences de spectroélectrochimie. ...	59
Tableau 5 : Les coefficients d'extinction molaires et les longueurs d'onde des différentes protéines étudiées.	67

1 Techniques de caractérisation

Cette thèse se base sur plusieurs techniques de caractérisation principalement dans le domaine de la spectroscopie, tout d'abord la spectroscopie UV-Visible, puis la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie Raman.

1.1 La spectroscopie

La spectroscopie est une méthode basée sur les interactions des rayonnements électromagnétiques avec la matière. Cette interaction peut produire une absorption, une émission ou une diffusion de la lumière. L'énergie du rayonnement électromagnétique est déterminée par l'équation suivante :

$$E = h\nu \quad ; \quad c = \lambda \cdot \nu \quad ; \quad E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equation 1}$$

E représente l'énergie du rayonnement en Joule (J), h la constante de Planck (6.626×10^{-34} J.s), λ la longueur d'onde en m, c la vitesse de la lumière dans le vide (3×10^8 m.s⁻¹) et ν la fréquence en Hz.

Les rayonnements électromagnétiques sont classés en fonction de leurs fréquences ou de leurs longueurs d'onde et comprennent les ondes radio, les micro-ondes, l'infrarouge, le visible, l'ultraviolet, les rayons X et les rayons gamma (Figure 1).

L'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière peut induire des phénomènes différents en fonction de l'énergie du rayonnement. Par exemple, les rayonnements gamma de très haute énergie sont impliqués dans le changement de la configuration du noyau, alors que les rayonnements de faible énergie de type radiofréquence induisent des changements de spin.

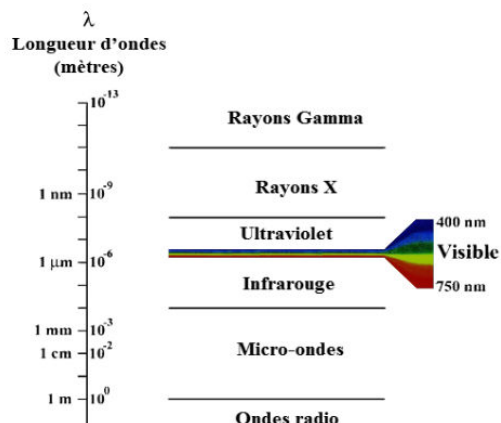


Figure 1 : Représentation du spectre électromagnétique.¹

1.2 Spectroscopie UV/Visible

L'absorption du rayonnement électromagnétique dans le domaine spectral UV/Visible conduit à des transitions électroniques induisant une excitation d'électrons à partir d'une orbitale moléculaire occupée vers une orbitale moléculaire non-occupée de plus haute énergie.² ³ Typiquement ces transitions électroniques détectées sont dans le proche ultraviolet (200-400 nm) et dans la gamme de la lumière visible (400-800 nm).

La spectroscopie UV/Visible est une technique importante pour l'étude des protéines principalement dans la gamme spectrale de 200 à 800 nm, puisque de nombreux résidus d'acides aminés et des cofacteurs y présentent des coefficients d'extinction molaire élevés et sont donc facilement détectables même à des faibles concentrations.

En spectroscopie UV/Visible, l'absorption d'un échantillon est mesurée en représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. L'absorbance est reliée à la concentration de l'échantillon et au coefficient d'extinction molaire, par la loi de Beer-Lambert.

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon l c \quad \text{Equation 2}$$

A représente l'absorbance, I₀ l'intensité de la lumière incidente, I l'intensité de la lumière sortante, ε le coefficient d'extinction molaire (mol⁻¹.L.cm⁻¹), l le chemin optique en cm et c la concentration de l'échantillon en mol.L⁻¹. Cette technique est utilisée pour déterminer la concentration des différentes protéines étudiées au cours de mon travail de thèse.

1.3 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est l'une des techniques les plus importantes utilisées pour l'identification des composés et la détermination de leurs structures. L'un des avantages principaux de l'IR est l'étude de l'échantillon à l'état liquide, poudre ou sous forme d'un film sec. ⁴ L'énergie du rayonnement infrarouge se situe entre le visible et les micro-ondes (Figure 1). Ce domaine est divisé en trois régions : le proche infrarouge (NIR) (13000-4000 cm⁻¹), le moyen infrarouge (MIR) (4000-600 cm⁻¹) et le lointain infrarouge (FIR) (600-10 cm⁻¹). L'absorption du rayonnement IR résulte des changements des modes de vibration ou de rotation des molécules. Pour une molécule linéaire ou non linéaire formée de N atomes, il existe 3N-5 et 3N-6 modes normaux de vibration. ⁵ Ces modes de vibrations sont actifs en IR seulement si le moment dipolaire de la molécule change au cours de la vibration. Pour une molécule composée de deux atomes A et B, les fréquences de vibrations peuvent être modélisées à partir d'un oscillateur harmonique. La fréquence d'oscillation d'un mode de vibration $\tilde{\nu}$ est décrite par l'équation (3) qui découle de la loi de Hooke.⁵⁻⁷

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad \mu = \frac{m_A \cdot m_B}{m_A + m_B} \qquad \text{Equation 3}$$

où $\tilde{\nu}$ est le nombre d'onde en cm⁻¹, k la constante de force de la liaison considérée en N.m⁻¹ et μ la masse réduite en kg. D'après l'équation 3, si la constante de force k augmente ou bien la masse réduite μ diminue, le nombre d'onde se déplace vers des valeurs plus élevées et vice-versa. La masse réduite est influencée par le marquage isotopique des atomes d'une molécule ce qui implique que le changement dans la masse va induire un changement dans la fréquence.

Deux types de modes normaux de vibration sont observés en spectroscopie infrarouge ; les vibrations d'élongation qui mettent en jeu la longueur de la liaison et les vibrations de déformation qui correspondent à des changements au niveau des angles de liaison (Figure 2).

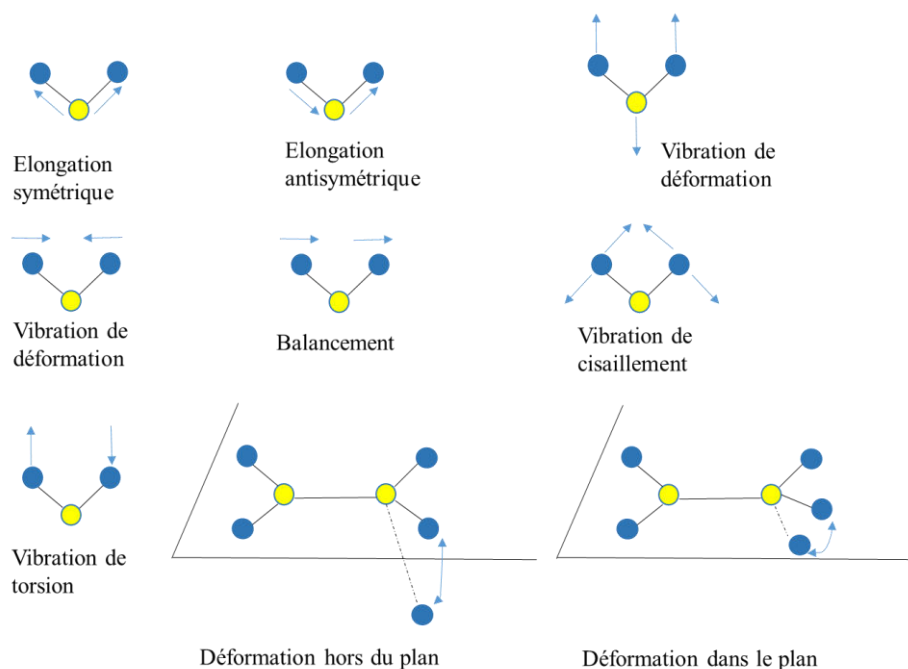


Figure 2 : Les différents modes normaux de vibration observés en IR.

1.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'interféromètre le plus couramment utilisé dans la spectrométrie IRTF est l'interféromètre de Michelson.⁸ Ce dernier est composé de deux miroirs dont l'un est mobile et l'autre est fixe. Le rayonnement infrarouge provenant d'une source Globar pour l'infrarouge moyen (MIR) ou bien d'une source à vapeurs de mercure pour l'infrarouge lointain (FIR) va heurter la lame séparatrice qui se trouve dans le plan des deux miroirs. Il en résulte que la moitié du rayonnement est réfléchi sur le miroir mobile et la moitié est transmise sur le miroir fixe. Ensuite, ces deux faisceaux sont réfléchis vers la lame séparatrice via les deux miroirs où ils se recombinent. De nouveau le faisceau est divisé en deux fractions égales dont une fraction va passer à travers l'échantillon pour atteindre le détecteur (faisceau transmis) tandis que la deuxième fraction est réfléchi dans la direction de la source (faisceau réfléchi) (Figure 3).

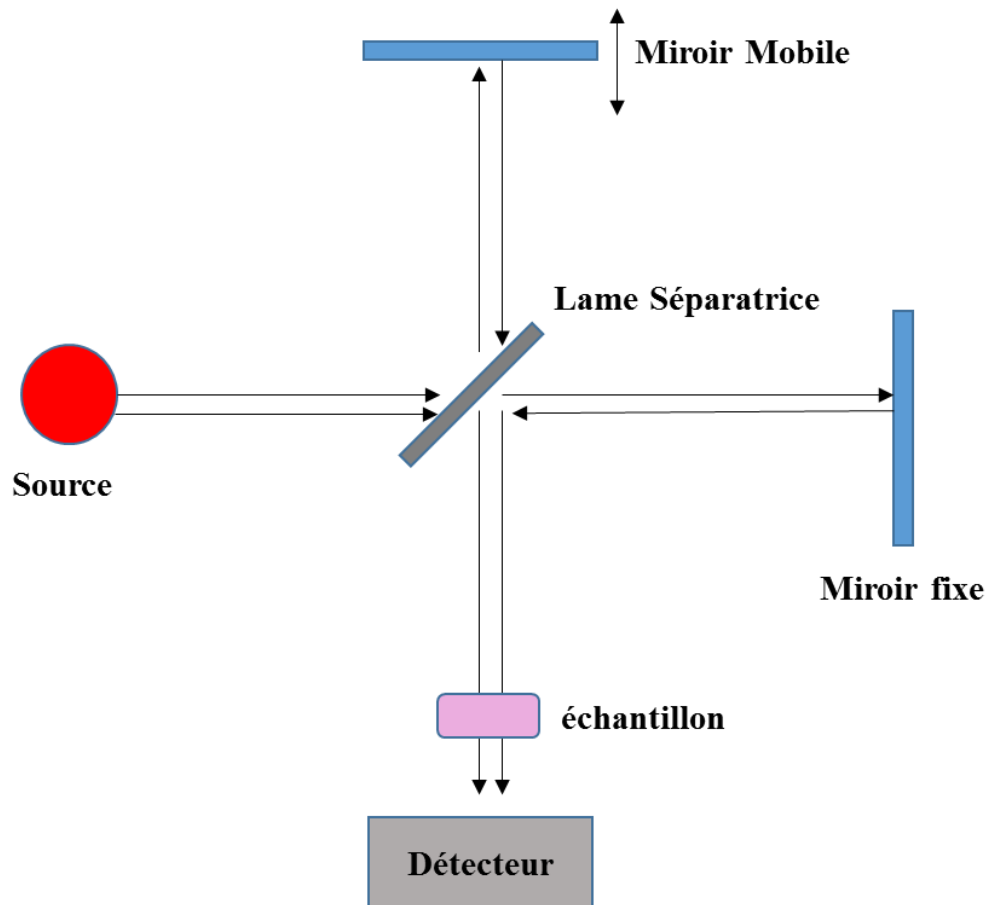


Figure 3 : Fonctionnement d'un interféromètre de Michelson.⁹

Le miroir mobile est la composante la plus importante de l'interféromètre et sa vitesse est contrôlée à l'aide d'un laser hélium-néon. En fonction de la position du miroir, le rayonnement infrarouge donnera lieu à des interférences soit constructives soit destructives quand il se recombine au niveau de la lame séparatrice produisant alors un interférogramme. Enfin, la transformation de Fourier est utilisée pour convertir l'interférogramme en un spectre donné en nombre d'onde (Figure 4).

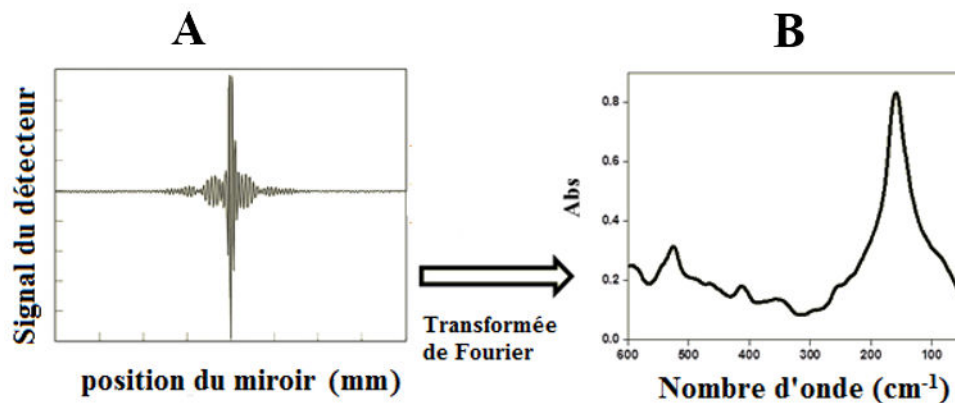


Figure 4 : En (A) l'interférogramme et en (B) le spectre d'absorption obtenu après la transformée de Fourier.⁵

Les équations essentielles pour la transformée de Fourier sont les suivantes :

$$I(\delta) = \int_0^{\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad \text{Equation 4}$$

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\delta \quad \text{Equation 5}$$

avec $\tilde{\nu}$ le nombre d'onde en cm^{-1} , I l'intensité de l'interférogramme, δ la différence du chemin optique entre les deux faisceaux et $B(\tilde{\nu})$ la puissance de la densité spectrale. L'équation 4 décrit la variation de l'intensité en fonction de la différence de la longueur du trajet optique alors que l'équation 5 représente la variation de l'intensité en fonction du nombre d'onde.

1.4.1 Les éléments optiques et l'appareillage

Tous les spectres mesurés au cours de cette thèse ont été effectués sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Vertex 70 Bruker. Le spectromètre a été purgé à l'air sec afin d'éviter la contribution de l'humidité.

Pour obtenir un spectre infrarouge d'un échantillon dans la gamme spectrale souhaitée, l'optique doit être adapté d'une manière adéquate. Ces modifications concernent principalement la source, le détecteur et la séparatrice. Les éléments optiques appropriés pour chaque domaine spectral sont représentés dans le Tableau 1.

Eléments optiques	Moyen infrarouge	Lointain infrarouge
Source	Globar	Lampe à vapeur de mercure
Détecteur	Mercurie Cadmium Tellure (MCT) refroidi à l'azote liquide	Sulfate de Triglycine Deutééré (DTGS)
Séparatrice	Bromure de potassium (KBr)	Silicium

Tableau 1 : Equipements utilisés pour la réalisation des mesures en infrarouge en fonction de la gamme spectrale étudiée.

1.5 La spectroscopie infrarouge des protéines

Les protéines sont des macromolécules biologiques composées d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons polypeptidiques. La spectroscopie infrarouge des protéines permet de visualiser les contributions des modes de vibration du squelette polypeptidique notamment ceux des fonctions amides, des cofacteurs et des chaînes latérales d'acides aminés.^{10 11 12, 13 14}

Les bandes amides sont les signaux caractéristiques trouvés dans les spectres infrarouges des protéines et des polypeptides. Le spectre typique d'absorption en MIR et en FIR d'une protéine est indiqué sur la Figure 5 et les attributions des différents modes de vibration des bandes amide sont représentées dans le Tableau 2.

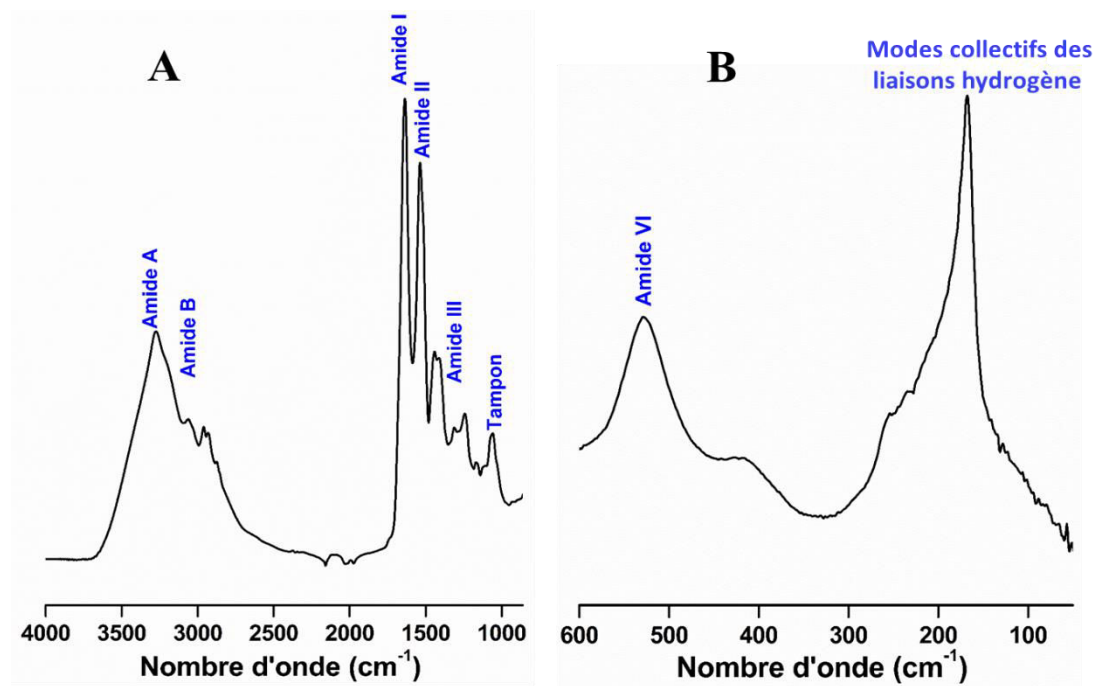


Figure 5 : Spectre d'absorption d'une protéine dans l'infrarouge moyen (A) et dans l'infrarouge lointain (B).

Bandes Amides	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Modes de Vibrations
Amide A	~ 3300	$\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{O-H})$,
Amide B	3100-3050	$\nu(\text{N-H})$
Amide I	1700-1600	80% $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$
Amide II	1580-1480	60% $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$
Amide III	1400-1200	$\delta(\text{N-H})$, $\delta(\text{C-N})$, $\nu(\text{C=O})$, $\delta(\text{N-C=O})$
Amide IV	780-650	$\delta(\text{C=O})$ dans le plan, $\nu(\text{C-C})$
Amide V	600-540	$\delta(\text{C-N})$ torsion
Amide VI	540-500	$\delta(\text{C=O})$ dans le plan et à l'extérieur du plan
Amide VII	290-250	$\delta(\text{N-H})$ à l'extérieur du plan

Tableau 2 : Contribution des bandes amide du squelette polypeptidique dans l'infrarouge moyen et lointain.¹⁵⁻¹⁷

Parmi les bandes amide observées ci-dessus, la bande amide I est spécifique de la structure secondaire de la protéine et est utilisée pour suivre les changements conformationnels induits en fonction de nombreux paramètres physico-chimiques tels que la température et le pH.

1.5.1 Analyse de la structure secondaire

Afin de déterminer la structure secondaire d'une protéine, sa bande amide I est décomposée à l'aide du logiciel Origin (version 8.5).^{18, 19} La décomposition de la bande amide I en plusieurs composantes caractéristiques des différents éléments de la structure secondaire tels que les hélices α , les feuillets β intra et intermoléculaires, les β coudes et la structure désordonnée est calculée avec des composantes déterminées précédemment à l'aide de la dérivée seconde de la bande amide I. La dérivée seconde permet de déterminer le nombre et les positions approximatives des différentes composantes de la bande amide I. La déconvolution est réalisée à l'aide d'un profil Gaussien de chaque composante et une optimisation consécutive d'amplitudes, des positions et des largeurs à mi-hauteur des bandes individuelles. Ensuite, la surface de chaque bande individuelle est utilisée pour calculer la contribution relative des composantes de la structure secondaire de la protéine par rapport à la surface totale de la bande amide I. L'erreur liée au programme utilisé pour la déconvolution ainsi qu'à la correction de la ligne de base est estimée à environ $\pm 3,5\%$. Le Tableau 3 résume les positions des différentes composantes de la bande amide I.

Structure secondaire	H ₂ O (cm ⁻¹)	D ₂ O (cm ⁻¹)
Hélices α	1648-1657	1642-1660
Feuillets- β parallèles	1623-1641	1615-1638
Feuillets- β antiparallèles	1674-1695 / 1615-1627	1672-1694/1613-1625
β -coudes	1662-1686	1653-1691
Structures désordonnées	1642-1657	1639-1654

Tableau 3 : Attribution des positions des structures secondaires de la bande amide I.^{20, 21, 22}

En spectroscopie infrarouge des protéines, travailler dans un solvant deutéré (D₂O) est fréquemment utilisé car il permet de mieux séparer les hélices α de la structure désordonnée. Ces deux structures se retrouvent chevauchées dans le cas d'un solvant H₂O. La structure

secondaire est sensible à l'échange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, en effet la bande amide II est extrêmement sensible au solvant deutéré car sa composante majeure est le mode de vibration δ (N-H), l'échange (H/D) induit un déplacement de plusieurs cm^{-1} vers des basses fréquences.

1.6 La spectroscopie Infrarouge en mode de transmission

La spectroscopie IRTF en mode de transmission est utilisée pour étudier des échantillons secs ou en solution. Le principe de cette méthode consiste à déposer 5 μl d'échantillon sur une fenêtre en fluorure de calcium (CaF_2) biseautée que l'on recouvre par une deuxième fenêtre en CaF_2 et de part et d'autre de joints pour assurer l'étanchéité du système (Figure 6). Le choix de la fenêtre dépend de la gamme spectrale étudiée. Par exemple, les fenêtres en silicium ou en polyéthylène sont utilisées pour les mesures dans l'infrarouge lointain tandis que les fenêtres en CaF_2 et en fluorure de baryum (BaF_2) sont destinées aux mesures en infrarouge moyen. Ensuite, ces fenêtres sont placées dans un support métallique et connectées à un bain thermostaté qui permet de réguler la température.

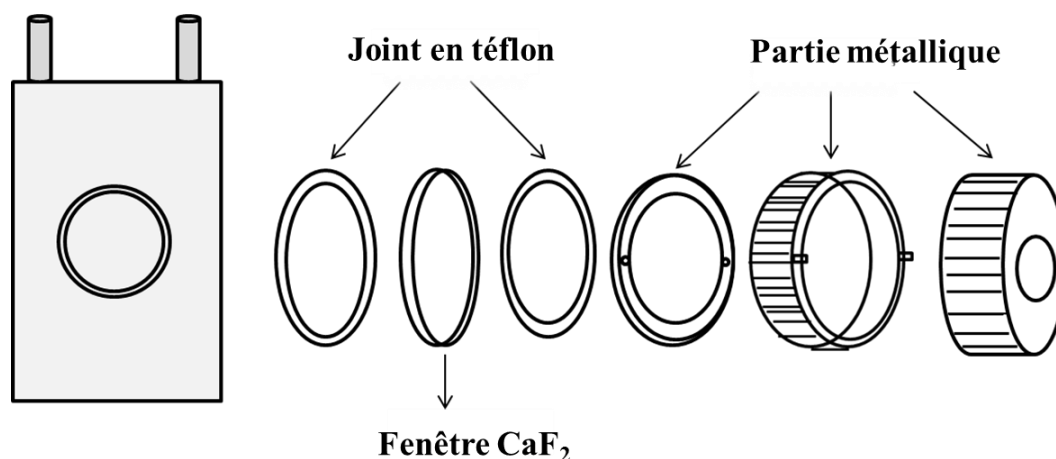


Figure 6 : Schéma des différentes parties constituant la cellule de mesure d'absorption infrarouge.²³

Cette cellule a été utilisée au cours de cette thèse pour suivre l'évolution de la structure secondaire des protéines hémocyanines en fonction de la température appliquée notamment des températures de chauffage. Ces mesures ont été effectuées en solution. Les spectres infrarouges ont été obtenus dans la gamme de température allant de 15 à 75°C avec un temps d'équilibre à chaque température de 10 min. Au total, cinq spectres moyennés sont obtenus avec une accumulation de 256 scans et une résolution de 4 cm^{-1} .

1.6.1 Spectroscopie infrarouge IRTF couplée au cryostat

Un système cryogénique a été mis en place dans le but de travailler à très basse température allant jusqu'à 10 K, afin de suivre la stabilité des hémocyanines. Pour réaliser ces mesures, 2 μ l de protéine sont déposés sur une fenêtre en CaF₂ de deux mm d'épaisseur et laissés sécher à l'air libre. Ensuite, cette fenêtre est placée dans un porte échantillon en cuivre (Figure 7A) et le système est monté sur une tête froide d'un cryostat à hélium à circuit fermé (Modèle DE-202 AE, Advanced Research Scientific, Allentown, PA, USA).

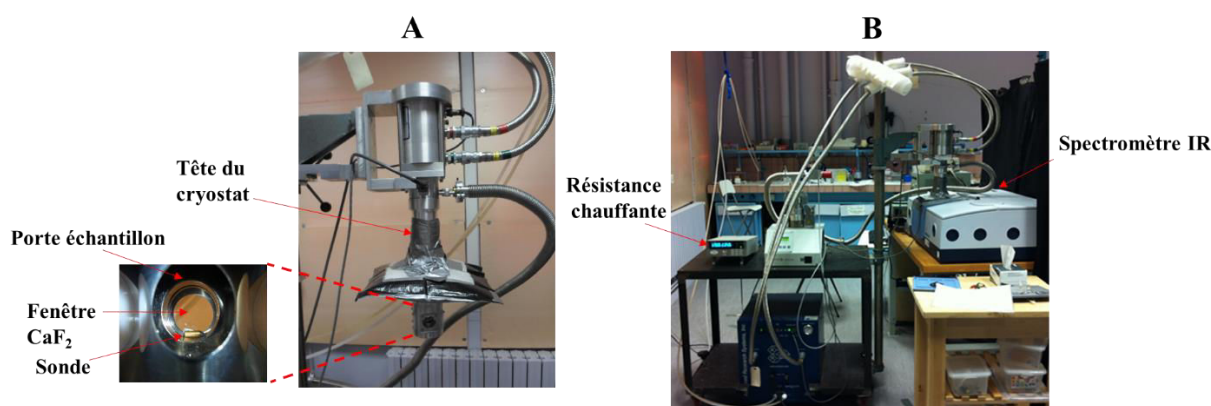


Figure 7 : Descriptif des différents compartiments du cryostat à hélium.

Ce système cryogénique ainsi que le porte échantillon fonctionnent avec un vide de l'ordre de 1x10⁻⁷ mbar. Cette pression est maintenue constante durant toute la période de l'expérience. La sonde qui se retrouve au niveau de la fenêtre en CaF₂, permet de fixer la température de l'échantillon. Cette température est réglée à l'aide d'une résistance chauffante (Figure 7B) et est suivie par un contrôleur de température numérique (Model 9700-1-1, Scientific Instruments, West Palm Beach, FL, USA). Pour nos expériences, la gamme de température étudiée est comprise entre 294 et 10 K.

1.6.1.1 Calcul de la dérivation moyenne

La dérivation moyenne entre les deux mesures réalisées par le cryostat et l'ATR a été calculée et moyennée pour chaque élément de la structure secondaire. La déviation standard a été calculée suite à l'application de la formule suivante.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

Après avoir calculé la moyenne qui correspond à \bar{x} , cette dernière a été soustraite de chaque observation x et ensuite divisé par le nombre total d'observation n .

1.6.2 Spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie

Afin de suivre les changements conformationnels au cours de la réaction d'oxydoréduction de la protéine, la cellule électrochimique en couche mince a été utilisée.²⁴ Cette cellule est composée d'un corps en PVC avec quatre entrées dont trois qui servent à connecter l'électrode de travail (une grille en or), la contre électrode (une feuille de platine) et l'électrode de référence qui est en chlorure d'argent (Ag/AgCl 3M KCl) (+208 mV pour SHE). La quatrième entrée sert à remplir la cellule avec le tampon (Figure 8A). La cellule électrochimique est maintenue dans le corps en PVC entre deux fenêtres en CaF₂ et deux joints de part et d'autre de chaque fenêtre afin d'assurer l'étanchéité de la cellule. Ensuite, l'ensemble est maintenu entre deux plaques métalliques qui se vissent créant ainsi un trajet optique de longueur inférieure à 10 μ m (Figure 8B). Enfin le système est transféré dans le spectromètre infrarouge et connecté au potentiostat par l'intermédiaire des trois électrodes et est maintenu à température constante (5°C) grâce à un bain thermostaté.

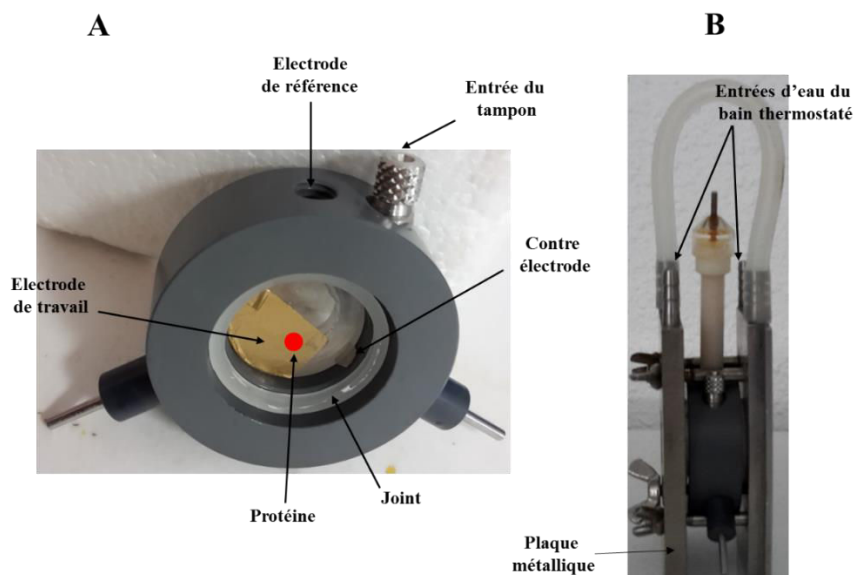


Figure 8 : Schéma de la cellule électrochimique en (A) avant assemblage et en (B) après assemblage.

L'électrode de travail, la grille d'or, est modifiée, au préalable, avec une solution d'acide 3-mercaptopropionique de concentration 2 mM et de cystéamine 2 mM au moins une heure afin d'éviter la dénaturation de la protéine (Figure 9).

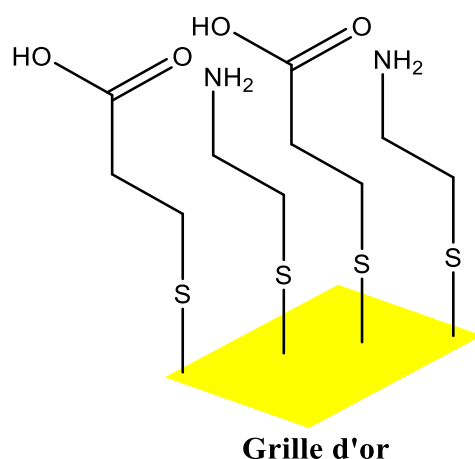


Figure 9 : Représentation de la grille d'or modifiée.

Les protéines possèdent souvent des cofacteurs qui sont cachés profondément à l'intérieur de leur structure, le transfert d'électron entre les cofacteurs et l'électrode de travail est donc assez lent. Pour favoriser le transfert d'électrons, les protéines étudiées ont été pré-incubées avec un mélange de 19 médiateurs pendant 35 min (Tableau 4). Ces derniers ont été choisis de façon appropriée afin de couvrir la gamme de potentiel de - 600 à + 600 mV vs. Ag/AgCl 3M KCl.²⁵ Ces médiateurs ont une concentration finale inférieure à 25 μM largement inférieure à celle de la protéine qui est de l'ordre de 1mM et donc ne contribuent pas aux spectres FTIR.^{26, 27}

Produits	E_m (mV) vs. Ag/AgCl 3M KCl	Solvant
(Ferrocenylméthyle) triméthylammoniumiodide	607	Ethanol
Acide 1,1'- ferrocène dicarboxylique	436	Ethanol
Hexacyanoferrate (II) de potassium trihydraté	212	Eau
1,1'- diméthylferrocène	133	Ethanol
Quinhydrone	70	Ethanol
Tetrachloro 1,4-benzoquinone	72	Acétone
N, N, N', N'-tétraméthyl-p- phénylènediamine	62	Eau

2,6-dichlorophénol -dophénol sel de sodium hydrate	9	Ethanol
Chlorure d'hexaamineruthénium (III)	-8	Eau
Acide Anthraquinone sulfonique	-23	Eau
1,4-naphthoquinone hydraté	-63	Ethanol
Anthraquinone	-108	Ethanol
5-hydroxy-1,4-naphthoquinone	-158	Ethanol
Duroquinone	-198	Ethanol
Ménadione	-220	Acétone
2-hydroxyl-1,4 naphthoquinone	-333	Ethanol
Acide 9,10-antraquinone -2,6- disulfonique	-433	Ethanol
Rouge Neutre	-515	Ethanol
Dichlorure de méthylviologène hydraté	-628	Eau

Tableau 4 : Liste des 19 médiateurs utilisés dans les expériences de spectroélectrochimie.

1.6.2.1 Spectroscopie différentielle

La bande amide I d'une protéine en solution se chevauche avec la bande associée au mode de vibration de déformation des molécules d'eau. Ainsi, pour éliminer la contribution de l'eau et visualiser les changements structuraux apportés par la formation d'espèces oxydées ou réduites, la spectroscopie différentielle a été développée.

Le principe de cette technique consiste à appliquer un potentiel oxydant pour produire la forme oxydée de la protéine et ensuite un potentiel réducteur pour obtenir la forme réduite. Le potentiel appliqué pour Adx et AdR correspondant à la forme oxydée est de 0 mV et celui de la forme réduite est de - 600 mV.²⁸ Ces deux spectres apparaissent identiques (Figure 10A). Or la soustraction du spectre de la forme oxydée du spectre de la forme réduite nous donne un spectre

différentiel (Figure 10B). Il est important de noter que les spectres différentiels obtenus ont été cyclés cinquante fois pendant une période de 12 h et les données ont été moyennées afin de diminuer la contribution de l'humidité.

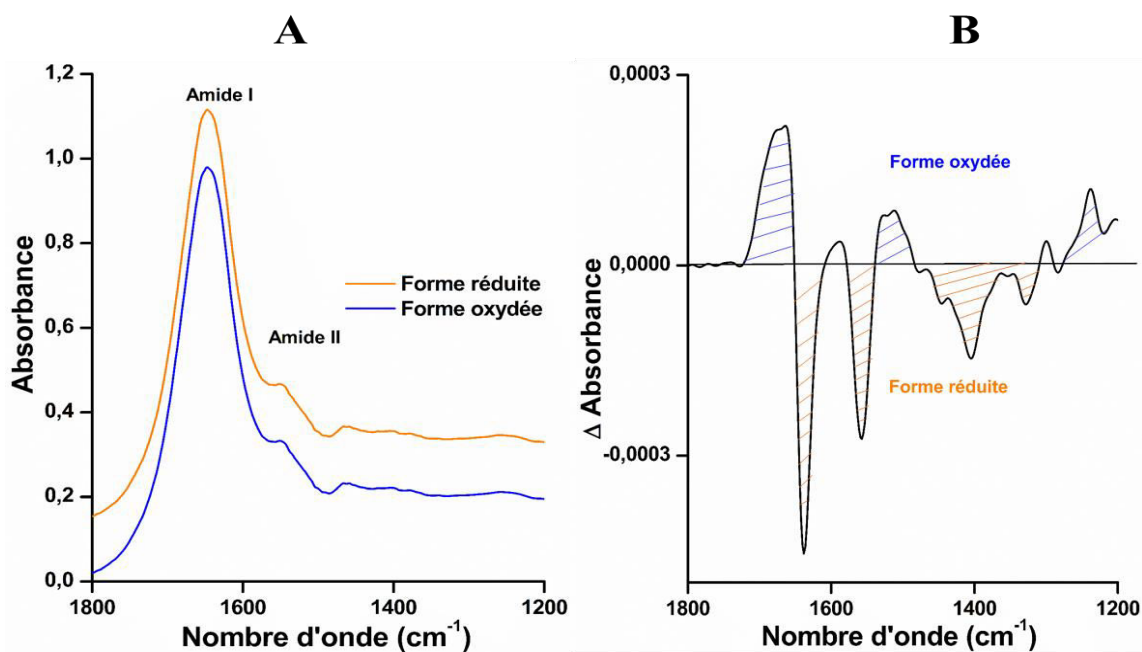


Figure 10 : Spectre d'absorption des formes oxydée et réduite de l'Adx en (A) et spectre différentiel en (B).

Le spectre différentiel présente des bandes positives correspondant à la forme oxydée et des bandes négatives associées à la forme réduite. L'attribution des bandes est effectuée à l'aide des études déjà établies dans la littérature sur les acides aminés isolés et les cofacteurs.²⁹

Cette technique est utilisée pour déterminer les spectres différentiels de l'Adx, l'AdR et les différents complexes Adx/AdR.

Le spectre différentiel fournit des informations concernant les changements conformationnels qui se produisent au cours de la réaction d'oxydo-réduction notamment au niveau des bandes amide I et II. De plus, la protonation et la déprotonation des résidus d'acides aminés acides tels que les acides aspartique et glutamique peuvent être détectées par des modifications au niveau de leurs contributions dans la région spectrale comprise entre 1750 et 1700 cm⁻¹.

1.7 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (ATR)

Cette technique a été développée par Harrick *et al* et est basée sur le phénomène de réflexion totale interne.^{30, 31 32} Le principe de la spectroscopie FTIR en mode ATR est illustré ci-dessous (Figure 11).

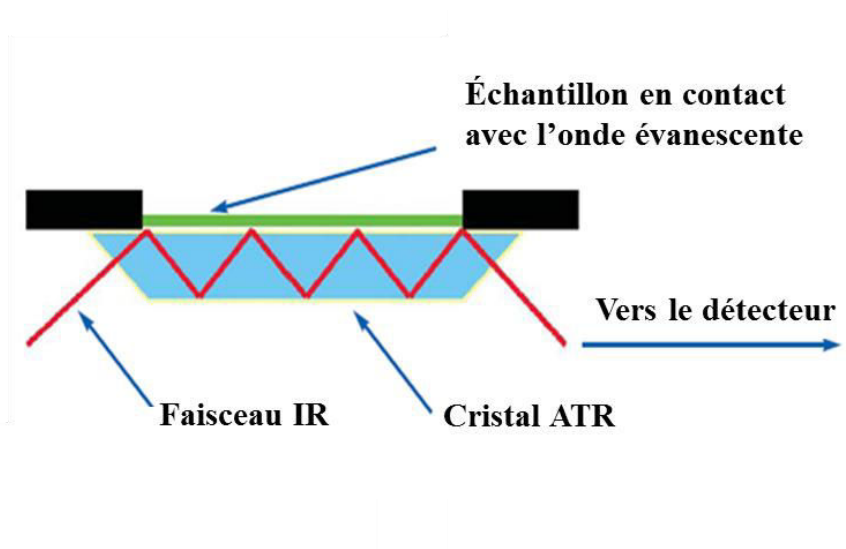


Figure 11 : Représentation schématique du principe de l'ATR.

Le faisceau infrarouge se propage dans un cristal transparent d'indice de réfraction n_1 nommé l'élément de réflexion interne qui est bien supérieur à celui de l'échantillon. L'échantillon est placé sur la surface du cristal dans un milieu d'indice de réfraction n_2 .

Si n_1 est supérieur à n_2 la réflexion totale interne se produit à l'interface des deux milieux, si l'angle d'incidence du faisceau est supérieur à l'angle critique. Cependant, à chaque réflexion interne, une onde évanescente pénètre dans l'échantillon. Cette onde possède un champ électrique qui interagit avec les modes de vibration de l'échantillon placé sur le cristal. Cette onde pénètre de quelques micromètres dans l'échantillon et la profondeur de pénétration d_p de l'onde évanescente est donnée par la relation suivante :

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{\sqrt{2\pi(\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2)}} \quad \text{Equation 6}$$

avec λ la longueur d'onde, n_1 l'indice de réfraction interne, n_2 l'indice de réfraction de l'échantillon et θ l'angle d'incidence.

Cependant, une atténuation du rayonnement réfléchi est induite par l'absorption d'une partie de l'énergie lorsqu'on s'approche de la longueur d'onde d'absorption de l'échantillon.

La spectroscopie FTIR en mode ATR est très utile pour étudier des films de protéines, car elle permet de limiter la contribution de l'eau et nécessite une faible quantité d'échantillon (1-2 μ l) comparé au mode de transmission (8 μ l).

1.8 Spectroscopie Raman et résonance Raman

Il s'agit d'une spectroscopie donnant accès comme la spectroscopie infrarouge à l'énergie des transitions entre deux niveaux vibrationnels de la molécule. Le phénomène qui rentre en jeu dans le cas de la spectroscopie Raman est un phénomène de diffusion liée à la variation de la polarisabilité de la molécule au cours de la transition vibrationnelle.

L'échantillon est soumis à une radiation monochromatique qui entraîne le passage des molécules à un niveau virtuel de plus grande énergie. Le retour au niveau électronique fondamental s'effectue ensuite soit sur le niveau vibrationnel initial, la raie correspondante est la raie de diffusion élastique Rayleigh, soit sur un autre niveau vibrationnel d'énergie plus faible ou plus grande. Les raies correspondantes sont les raies de diffusion inélastiques Stokes et anti-Stokes qui correspondent aux fréquences des transitions vibrationnelles de la molécule et constituent l'effet Raman (Figure 12).^{33, 34}

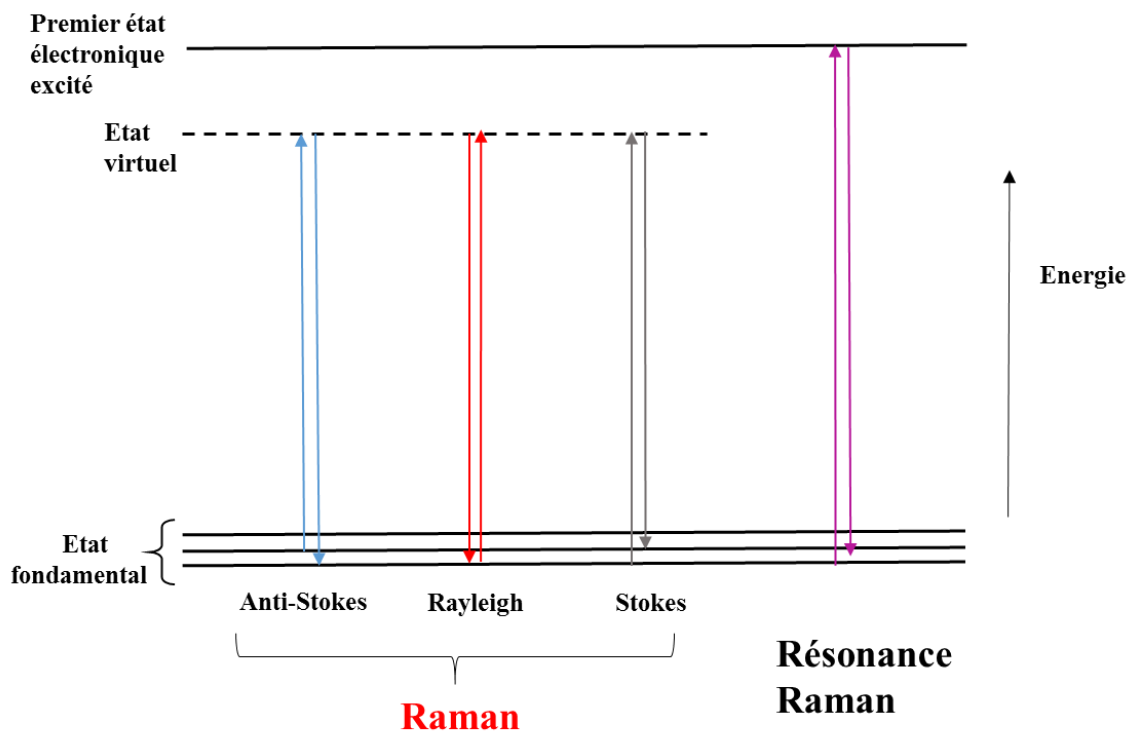


Figure 12 : Schéma du principe de l'effet Raman et de l'effet de résonance Raman.

Cette technique présente divers avantages : elle requiert une faible quantité d'échantillon et de concentration de l'ordre du (μl et μM) et permet l'analyse des solutions aqueuses puisque les bandes d'absorption de l'eau sont beaucoup plus faibles comparées aux bandes d'absorption dans le spectre IR. L'interprétation des spectres est beaucoup plus simple car les bandes ne se chevauchent pas comparée aux spectres d'absorption infrarouge. Ces avantages sont toutefois limités par quelques phénomènes tels que la fluorescence.³⁵

La spectroscopie Raman peut donner des spectres de faible intensité. Une des stratégies utilisées pour augmenter l'intensité ainsi que la précision de détection est la spectroscopie de résonance Raman. La différence entre la spectroscopie Raman et la spectroscopie de résonance Raman est le niveau de l'excitation. En résonance Raman, la molécule est excitée au premier état électronique alors que dans la spectroscopie Raman, elle est excitée à un état virtuel (Figure 12). Cette technique a été utilisée pour étudier l'interaction entre Adx et AdR ainsi que pour la caractérisation des états d'oxygénation des différentes espèces d'hémocyanines.

2 Préparation des échantillons

2.1 Adrénodoxines, adrénodoxine réductase et cytochrome

CYP106A2

Ces protéines ont été préparées par Brigit Heider-Lips, Simon Janocha et Frank Hannemann au sein du laboratoire du Pr. Rita Bernhardt (Institut de Biochimie, Université de Saarland campus B2.2, 66123 Saarbrücken Allemagne) selon les protocoles suivants.^{36, 37 38}

Pour la forme marquée ⁵⁴Fe Adx (4-108), le ⁵⁴Fe a été dissous dans du HCl et introduit dans l'Adx (4-108), au cours de l'expression dans *Escherichia coli* selon le mode opératoire suivant³⁹. La solution de fer (29.6 mg) a été dissoute dans 3 ml de HCl à 30% sous une agitation continue. Après la stérilisation et l'ajustement du pH à 7, 4 ml de cette solution de concentration 0.94 mg/ml ont été ajoutés à la place de FeSO₄ à 6 x 1000 ml milieu minimum M9 avec 1ml d'ampicilline (100 mg/ml) et 10 ml de pré-culture de l'Adx (4-108). L'expression et la purification du ⁵⁴Fe Adx (4-108) de concentration finale 1.12 mM ont été réalisées comme décrit précédemment pour les échantillons non marqués.

Pour les mesures réalisées par spectroscopie Raman, ces protéines sont solubilisées dans un tampon phosphate de potassium 20 mM KPI à pH 7.4. Les concentrations de ces échantillons sont de 1mM pour les différentes protéines d'Adx et 1.12 mM pour ⁵⁴Fe Adx (4-108), 0.20 mM pour AdR et 0.4 mM pour le CYP106A2. Les différents complexes de ces protéines ont été préparés avec un mélange stœchiométrique 1:1.

Pour les études réalisées par spectroscopie FTIR couplée à l'électrochimie, ces protéines ont été conditionnées dans un tampon phosphate de potassium 20 mM KPI avec 100 mM de KCl à pH 7.4. L'échange du tampon est fait à l'aide de membranes de filtration 10 kDa pour les protéines d'Adx et 30 kDa pour l'AdR (MWCO Amicon Millipore) et d'une centrifugeuse 5804 R (Ependorf, Le Pecq, France). Les protéines ont été conditionnées avec ce tampon trois fois à une vitesse de 7000 tours/min pendant environ 40 min. La concentration finale de ces échantillons, déterminée par spectroscopie UV/Visible, est de 0.3 mM pour les protéines Adx et de 0.2 mM pour l'AdR.

2.2 Les domaines PDZ

La purification de la PDZ3, PDZ4 et du tandem PDZ3-4 marqué à l'¹⁵N a été faite au Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, dans l'équipe Oncoprotéines à l'Université de Strasbourg en suivant le protocole de la PDZ1 MAGI-1 décrit par Charbonnier *et al* et Fournane *et al.*^{40, 41} Ces protéines ont été conditionnées dans un tampon phosphate 20 mM (NaH₂PO₄ et Na₂HPO₄) avec 50 mM de NaCl à pH 6.8 et concentré à l'aide d'une membrane de filtration de 5 kDa (MWCO Amicon Millipore). La concentration finale de ces protéines, déterminée par la spectroscopie UV/Visible, est aux alentours de 2 mM.

2.2.1 Synthèse des peptides

Trois peptides correspondant à la partie C-terminale de HPV16E6 du papillomavirus humain et HTLV1 Tax1 virus T-lymphotrope humain de type I ont été synthétisés à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire à l'Université de Strasbourg. Ces peptides contiennent de l'acide trifluoroacétique (TFA). Ce composé présente une forte contribution dans la gamme spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ surtout au niveau de la bande amide I, d'où l'importance d'enlever sa contribution. La procédure de suppression de cet acide consiste à le lyophiliser et à le traiter avec une solution de HCl à différentes concentrations comme décrit précédemment par Andrushchenko *et al* et Roux *et al.*^{42, 43} Ces peptides ont été remis en suspension dans un tampon 20 mM (NaH₂PO₄ et Na₂HPO₄) avec 50 mM de NaCl à pH 6.8 et leur concentration finale est de 2.4 mM pour HPV16E6L (forme sauvage « Wild type »), 5mM pour HPV16E6V (forme mutée) et 2.96 mM pour HTLV1 Tax1.

Le mélange de ces différents domaines de PDZ avec les peptides ont été préparés avec une stoechiométrie de 1:1.

2.3 Les hémocyanines

Les hémocyanines ont été préparées par le Pr. Nadja Hellmann au sein du laboratoire du Pr. Heinz Decker à l'Institut de Biophysique Moléculaire de l'Université de Mayence Jakob-Welder-Weg 26, 55128 Allemagne.

L'hémocyanine de *Eurypelma californicum* a été purifiée comme décrit précédemment par Hulber *et al.*⁴⁴ L'hémocyanine de *Limulus polyphemus* a été obtenue à partir de l'hémolymphe. L'hémolymphe bleue a été centrifugée pendant 30 min à 3300 g. Ensuite, le surnageant

2 - Matériels et méthodes expérimentales

dépourvu de cellules a également été centrifugé pendant 2h à 130 000g. Les culots d'hémocyanines sont ensuite remis en suspension dans un tampon de 100 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ à pH 7.8.⁴⁵

L'hémocyanine d'*Astacus leptodactylus* a été purifiée à partir de l'hémolymphe. Cette dernière a été centrifugée pendant 20 min pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant a été centrifugé pendant 6 h à 200 000 g à 4°C pour obtenir l'hémocyanine sous forme d'un culot. Ce dernier a été remis en suspension et appliqué sur une colonne d'exclusion afin de séparer l'hémocyanine 12-mer des agrégats ainsi que d'autres protéines.⁴⁶

Pour l'étude par spectroscopie FTIR couplée au cryostat ainsi que celle par FTIR en mode ATR et spectroscopie Raman, les hémocyanines de *Eurypelma californicum*, *Limulus polyphemus* et *Astacus leptodactylus* ont été conditionnées dans un tampon (20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂), (20 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) et (20 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂) respectivement. Le pH est ajusté dans le même tampon à des valeurs de 7, 7.5 à 7.8 et 8.5. Concernant les mesures réalisées par spectroscopie FTIR en mode transmission, ces trois protéines ont été conditionnées dans le même tampon en présence de D₂O. L'échange du tampon a été fait à l'aide de membranes de filtration 100 kDa (MWCO Amicon Millipore). Les protéines ont été centrifugées avec ce tampon trois fois à une vitesse de 4500 tours/min pendant environ 40 min. Les concentrations de ces protéines, déterminées par la spectroscopie UV/Visible, sont comprises entre 1 et 2 mM.

3 Conditions expérimentales

3.1 Spectroscopie UV/Visible

Les mesures d'absorption des différentes protéines ont été effectuées par un spectromètre UV/Visible Varian Cary 300 avec une cuve en quartz de trajet optique 1 cm. Ces mesures ont été réalisées afin de déterminer les concentrations des différentes protéines. Pour déterminer la concentration de chaque échantillon, 2µl de la solution de protéines ont été rajoutés à 500 µl de la solution dans laquelle l'échantillon a été conditionné. Ensuite, ces concentrations ont été obtenues par l'application de la loi de Beer-Lambert comme décrit précédemment dans la partie 1.2.

Protéines	Coefficient d'extinction molaire ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Longueur d'onde λ (nm)
Adx	9800	414
AdR	11300	450
CYP106A2	43890	280
PDZ3 et PDZ3-4	1325.8	275
PDZ4	2800	275
Hémocyanines	20000	340

Tableau 5 : Les coefficients d'extinction molaires et les longueurs d'onde des différentes protéines étudiées.

3.2 Spectroscopie infrarouge en mode ATR

Les spectres d'absorption en mode ATR des PDZ et des hémocyanines ont été obtenus en déposant 2µl d'échantillon sur un cristal en diamant laissés à sécher à l'air libre. Les différents éléments optiques tels que le détecteur, la source et la séparatrice ont été choisis en fonction de la gamme spectrale étudiée (voir la partie 1.4.1). Concernant les expériences de désoxygénation des hémocyanines, un léger flux d'argon est placé au-dessus du film sec d'échantillon pendant environ 20 minutes afin d'éliminer l'oxygène. Pour la réoxygénation, le flux d'argon est retiré et le film de protéine est rééquilibré à l'oxygène atmosphérique. Au total 20 spectres moyennés

sont obtenus avec une accumulation de 256 scans, une résolution de 4 cm^{-1} et une vitesse de balayage de 20 kHz.

Concernant les mesures de la PDZ dans la gamme du lointain infrarouge, au total 5 spectres ont été moyennés et obtenus avec une accumulation de 256 scans, une résolution de 4 cm^{-1} et une vitesse de balayage de 2.5 kHz. La soustraction de l'humidité et le lissage des spectres de 3 à 6 points ont été effectués si nécessaire.

3.3 Spectroscopie Raman

Toutes les mesures réalisées en spectroscopie Raman sont effectuées avec un spectromètre Raman Renishaw Invia Raman Microscope équipée d'une caméra CCD (Charge coupled device) comme détecteur. Toutes les expériences ont été effectuées à une température ambiante avec une résolution de 1 cm^{-1} , une accumulation de 35 à 50 spectres, un temps d'exposition de 10 s. Les longueurs d'onde d'excitation appliquées sont 514 nm pour les protéines d'Adx, AdR, PDZ et les hémocyanines, et 457 nm pour le cytochrome CYP106A2. Ces longueurs d'onde sont atteintes à l'aide d'un laser à argon d'une puissance de 12.5 mW et 220 μW pour les longueurs d'onde d'excitation de 514 nm et 457 nm respectivement, focalisé sur l'échantillon à travers l'objectif d'un microscope 20 x et 50 x. Tous les spectres Raman ont été calibrés à l'aide de la fenêtre silicium comme référence. Les spectres Raman des différentes protéines, peptides et leurs complexes correspondants ont été obtenus en déposant entre 2 à 4 μl d'échantillon sur une fenêtre en CaF_2 dans la gamme spectrale allant de 1800 à 1200 cm^{-1} et une fenêtre en polyéthylène pour la gamme spectrale allant de 450 à 250 cm^{-1} .

En ce qui concerne les expériences d'oxygénation des hémocyanines à différents pH, une cellule construite au sein du laboratoire a été utilisée. Cette dernière est composée d'une fenêtre en CaF_2 sur laquelle l'échantillon est déposé. La cellule est munie de deux orifices d'entrée dont le premier sert à faire passer le flux d'argon et le deuxième permet le passage du faisceau laser via le microscope au niveau de l'échantillon. Pour les expériences de désoxygénation, la cellule contenant l'échantillon est fermée dans un environnement d'argon pendant une période de 6 h. Pour la réoxygénation de l'échantillon, le flux d'argon a été retiré et le film de protéine a été rééquilibré avec l'oxygène atmosphérique pendant 20 min. Les spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* ont été lissés en utilisant 3 points.

4 Références bibliographiques

1. Austin, R. (2011) *Alien vision: Exploring the Electromagnetic Spectrum with Imaging Technology* 2nd ed ed., SPIE, Bellingham, Washington.
2. Hammes, G. G. (2006) *Spectroscopy for the Biological Sciences.*, John Wiley & Sons, Inc, USA.
3. Hans-Ulrich Gremlich, G. H. (2003) *Handbook of Spectroscopy*, Wiley-VCH GmbH and Co. KGaA, Weinheim.
4. Siebert, F., and Hildebrandt, P. (2008) *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
5. Larkin, P. (2011) *IR and Raman Spectroscopy : principles and spectral interpretation*, 1st edition ed., Elsevier, Oxford, UK.
6. Chalmers, J. M., and Griffiths, P. (2002) *Handbook of vibrational spectroscopy*, Vol. 1-5, Wiley.
7. Siegfried, W. (2003) *IR and Raman Spectroscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, Germany.
8. Smith, G. D., and Palmer, R. A. (2002) *Fast Time-resolved Mid-infrared Spectroscopy Using an Interferometer*, In *Time-resolved spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd.
9. Hollas, J. M. (2004) *Modern spectroscopy*, John Wiley & Sons.
10. Trumpower, B. L. (1990) The Protonmotive Q-Cycle - Energy Transduction by Coupling of Proton Translocation to Electron-Transfer by the Cytochrome-Bc1 Complex, *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.
11. Crofts, A. R. (2004) The cytochrome bc(1) complex: Function in the context of structure, *Annu. Rev. Physiol.* 66, 689-733.
12. Wille, G., Ritter, M., Friedemann, R., Mantele, W., and Hubner, G. (2003) Redox-triggered FTIR difference spectra of FAD in aqueous solution and bound to flavoproteins, *Biochemistry* 42, 14814-14821.
13. Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mantele, W., and Friedrich, T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain, *Biochemistry* 39, 10884-10891.
14. Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., von Donk, W., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., and Mantele, W. (2002) Vibrational modes of tyrosines in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*: FTIR and electrochemical studies on Tyr-D-4-labeled and on Tyr280His and Tyr35Phe mutant enzymes, *Biochemistry* 41, 9116-9125.
15. Tamm, L. K., and Tatulian, S. A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Q. Rev. Biophys.* 30, 365-429.
16. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Bba-Bioenergetics* 1767, 1073-1101.
17. Kong, J., and Yu, S. (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 39, 549-559.

18. Byler, M., and Susi, H. (1986) Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvoluted FTIR spectra, *Biopolymers* 25, 469-487.
19. Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., and Chapman, D. (1993) Determination of Protein Secondary Structure by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy - a Critical-Assessment, *Biochemistry* 32, 389-394.
20. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1073-1101.
21. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994) Subcellular Biochemistry: Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes, (Hilderson, H. J., and Ralston, G. B., Eds.), pp 23:405-450, Plenum, New York.
22. Tatulian, S. A. (2013) Structural Characterization of Membrane Proteins and Peptides by FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy, In *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols* (Springer, Ed.), Springer, New York.
23. Srour, B. (2015) Emerging roles for natural and artificial lipids in shaping the catalytic function, stability and oligomeric state of membrane proteins., In *Chemistry (Easton)*, Université de Strasbourg, Strasbourg.
24. Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., and Mantele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c, *Eur. J. Biochem.* 187, 565-572.
25. Baymann, F., Moss, D. A., and Mantele, W. (1991) An Electrochemical Assay for the Characterization of Redox Proteins from Biological Electron-Transfer Chains, *Anal. Biochem.* 199, 269-274.
26. Voicescu, M., Rother, D., Bardischewsky, F., Friedrich, C. G., and Hellwig, P. (2011) A Combined Fluorescence Spectroscopic and Electrochemical Approach for the Study of Thioredoxins, *Biochemistry* 50, 17-24.
27. Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., and Mantele, W. (1996) Carboxyl group protonation upon reduction of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: Direct evidence by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett.* 385, 53-57.
28. Jin, W., Wollenberger, U., Bernhardt, R., Stocklein, W. F. M., and Scheller, F. W. (1998) Direct electron transfer of adrenodoxin - a [2Fe-2S] protein - and its mutants at modified gold electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 47, 75-79.
29. Wolpert, M., and Hellwig, P. (2006) Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500 cm⁻¹, *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 64, 987-1001.
30. Zscherp, C., and Barth, A. (2001) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein reaction mechanisms, *Biochemistry* 40, 1875-1883.
31. Goormaghtigh, E., Raussens, V., and Ruyschaert, J. M. (1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 1422, 105-185.
32. Harrick, N. J. (1967) *Internal reflection spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York.
33. Smith, E., and Dent, G. (2005) *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, Jhon Wiley and Sons: Ltd, England.

34. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., and Brown, C. W. (2003) *Introductory Raman spectroscopy (Second edition)*, Elsevier.
35. Fabian, H., and Anzenbacher, P. (1993) New Developments in Raman-Spectroscopy of Biological-Systems, *Vib. Spectrosc* 4, 125-148.
36. Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D., and Bernhardt, R. (1992) Expression of Bovine Adrenodoxin in Escherichia-Coli and Site-Directed Mutagenesis of (2-Fe-2s) Cluster Ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 1131-1138.
37. Sagara, Y., Wada, A., Takata, Y., Waterman, M. R., Sekimizu, K., and Horiuchi, T. (1993) Direct Expression of Adrenodoxin Reductase in Escherichia-Coli and the Functional-Characterization, *Biol. Pharm. Bull.* 16, 627-630.
38. Lisurek, M., Kang, M. J., Hartmann, R. W., and Bernhardt, R. (2004) Identification of monohydroxy progesterones produced by CYP106A2 using comparative HPLC and electrospray ionisation collision-induced dissociation mass spectrometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 677-682.
39. Yegres, M. (2014) Probing the effect of conformational changes in protein complexes by vibrational spectroscopy: bioenergetics and allostery, p 275, University of Strasbourg.
40. Charbonnier, S., Stier, G., Orfanoudakis, G., Kieffer, B., Atkinson, R. A., and Trave, G. (2008) Defining the minimal interacting regions of the tight junction protein MAGI-1 and HPV16 E6 oncoprotein for solution structure studies, *Protein Expression Purif.* 60, 64-73.
41. Fournane, S., Charbonnier, S., Chapelle, A., Kieffer, B., Orfanoudakis, G., Trave, G., Masson, M., and Nomine, Y. (2011) Surface plasmon resonance analysis of the binding of high-risk mucosal HPV E6 oncoproteins to the PDZ1 domain of the tight junction protein MAGI-1, *J. Mol. Recognit.* 24, 511-523.
42. Andrushchenko, V. V., Vogel, H. J., and Prenner, E. J. (2007) Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides, *J. Pept. Sci.* 13, 37-43.
43. Roux, S., Zekri, E., Rousseau, B., Paternostre, M., Cintrat, J. C., and Fay, N. (2008) Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches, *J. Pept. Sci.* 14, 354-359.
44. Hubler, R., Fertl, B., Hellmann, N., and Decker, H. (1998) On the stability of the 24-meric hemocyanin from Eurypelma californicum, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1383, 327-339.
45. Martin, A. G., Depoix, F., Stohr, M., Meissner, U., Hagner-Holler, S., Hammouti, K., Burmester, T., Heyd, J., Wriggers, W., and Markl, J. (2007) Limulus polyphemus hemocyanin: 10 angstrom cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers, *J. Mol. Biol.* 366, 1332-1350.
46. Hellmann, N., Jaenicke, E., and Decker, H. (2001) Two types of urate binding sites on hemocyanin from the crayfish *Astacus leptodactylus*: an ITC study, *Biophys. Chem.* 90, 279-299.

**3 - ETUDE DE L'INTERACTION DE
L'ADRENODOXINE, DE
L'ADRENODOXINE REDUCTASE ET DU
CYTOCHROME CYP106A2**

Liste des figures

Figure 1 : En (A) spectres Raman de l'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx D113Y, Adx T54S; D113Y et AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm. En (B) schéma du cluster fer-soufre indiquant la position des modes bridging et terminaux du cluster [2Fe-2S].	72
Figure 2 : Spectres Raman de l'Adx WT et du complexe Adx WT/AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm.	74
Figure 3 : Spectres Raman du ^{56}Fe Adx (4-108), ^{54}Fe Adx (4-108), complexe ^{56}Fe Adx (4-108)/AdR et complexe ^{54}Fe Adx (4-108)/AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm.	76
Figure 4 : Déconvolution de la bande située entre 430 et 360 cm^{-1} de ^{56}Fe Adx (4-108) (A), du complexe ^{56}Fe Adx (4-108) /AdR (B), de ^{54}Fe Adx (4-108) (C) et du complexe ^{54}Fe Adx (4-108) /AdR (D).	78
Figure 5 : Spectres Raman des différents complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S; D113Y/AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm.	79
Figure 6 : Spectres différentiels (forme oxydée- forme réduite) de l'Adx WT, Adx (4-108), AdXS112W, Adx D113Y, Adx T54S; D113Y et AdR dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm^{-1} avec un potentiel de -600 et 0 mV.	81
Figure 7 : Spectres différentiels (ox-red) de l'Adx WT, de l'AdR et du complexe Adx WT/AdR et addition des spectres de Adx WT+ AdR dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm^{-1} avec un potentiel de -600 et 0 mV.	84
Figure 8 : Spectres différentiels (ox-red) des complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S; D113Y /AdR dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm^{-1} avec un potentiel de -600 et 0 mV.	85
Figure 9 : En (A) spectre Raman du cytochrome CYP106A2 dans la gamme spectrale de 1800 à 450 cm^{-1} obtenu avec une excitation à 457 nm. En (B) schéma de l'hème <i>b</i> .	88
Figure 10 : Spectre Raman du cytochrome CYP106A2 dans la gamme spectrale de 450 à 200 cm^{-1} obtenu avec une excitation à 457 nm.	89

Figure 11 : Spectres Raman du cytochrome CYP106A2, du complexe CYP106A2/Adx WT et d'Adx WT dans la gamme spectrale de 1700 à 450 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 457 nm.....	90
Figure 12 : Spectres Raman des complexes CYP106A2/Adx WT, CYP106A2/Adx (4-108), CYP106A2/Adx S112W, CYP106A2/Adx D113Y et CYP106A2/Adx T54S; D113Y dans la gamme spectrale de 1700 à 450 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 457 nm.....	91
Figure 13 : Spectres Raman de l'AdxWT, du CYP106A2 et des complexes CYP106A2/Adx WT, CYP106A2/Adx (4-108), CYP106A2/Adx S112W, CYP106A2/Adx D113Y et CYP106A2/Adx T54S; D113Y dans la gamme spectrale de 450 à 200 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 457 nm.....	92
Figure 14 : En (A) structure cristallographique du complexe CYP11A1/Adx code PDB : (3N9Y). En (B) un zoom sur la structure avec les différents acides aminés impliqués dans l'interaction.....	93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des bandes de vibrations des spectres Raman d'Adx WT et les différents mutants étudiés. Pour comparaison, les valeurs trouvées dans la littérature sur l'Adx sont reportées dans la dernière colonne. Les différentes valeurs sont représentées en cm^{-1}	73
Tableau 2 : Nombres d'ondes des différentes bandes des spectres Raman des complexes Adx/AdR et les paramètres d'interaction de l'Adx avec l'AdR déterminés à partir de la Résonance Plasmonique de Surface mesuré avec un système Biacore.....	80
Tableau 3 : Tentative d'attribution des bandes sur les spectres différentiels infrarouge (ox-red) d'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx S113Y et Adx T54S; D113Y. L'oxydation est symbolisée par un (+) et la réduction par un (-).....	82
Tableau 4 : Tentative d'attribution des bandes du spectre différentiel infrarouge (ox-red) de l'AdR. L'oxydation est symbolisée par un (+) et la réduction par un (-).....	83
Tableau 5 : Tentative d'attribution des bandes sur les spectres différentiels infrarouge (ox-red) des complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, AdxD113Y/AdR et Adx T54S ; D113Y/AdR. L'oxydation est symbolisée par un (+) et la réduction par un (-).	87

3 – Etude de l'interaction de l'adrénodoxine, de l'adrénodoxine réductase et du cytochrome CYP106A2

Tableau 6 : Attribution des bandes observées en spectroscopie Raman pour le cytochrome CYP106A2 90

Introduction

Les métalloprotéines qui contiennent un cluster fer-soufre telles que l'Adx, les flavoprotéines comme l'AdR et les hémoprotéines comme le cytochrome P450 sont des protéines qui possèdent la propriété de se lier entre elles via le mécanisme de transfert d'électrons.

Ce chapitre est dédié à l'étude de l'interaction de l'adrénodoxine et sa partenaire redox l'adrénodoxine réductase avec le cytochrome P450 via la spectroscopie Raman et la spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie afin d'apporter des informations sur les cofacteurs (Fe-S, FAD et l'hème *b*) ainsi que la structure secondaire des complexes. Ces informations pourront aider à mieux comprendre le mécanisme de transfert d'électrons entre ces protéines. Pour atteindre cet objectif, différentes mutations ont été ciblées dans des régions spécifiques de l'adrénodoxine comme le montre la Figure 14 de l'introduction.

Diverses méthodes d'analyses ont déjà été utilisées afin de caractériser l'interaction entre ces protéines comme décrit précédemment dans l'introduction. A notre connaissance ces interactions n'ont jamais été étudiées par spectroscopies Raman et infrarouge.

Dans un premier temps seront caractérisés les spectres individuels de chaque protéine, puis par la suite les différents complexes seront étudiés afin d'identifier les bandes caractéristiques ainsi que la contribution de chaque protéine.

1 Spectroscopie Raman de l'adrénodoxine et ses mutants

Les spectres Raman de l'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx D113Y et Adx T54S; D113Y sont représentés dans la Figure 1A. Deux excitations à 457 et 514 nm ont été testées au cours de ces expériences. Les spectres d'Adx, AdR et leurs complexes correspondants, ont été obtenus avec une excitation de 514 nm. Le choix de cette excitation est lié à l'obtention d'une meilleure résolution spectrale surtout lors de la formation des complexes.

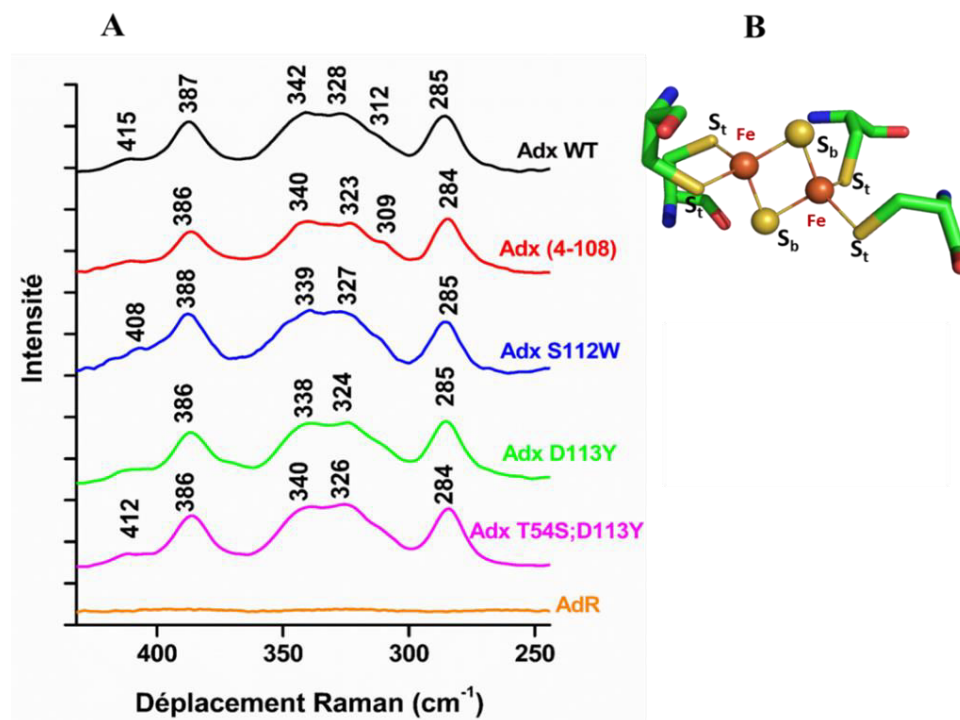


Figure 1 : En (A) spectres Raman de l'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx D113Y, Adx T54S; D113Y et AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm⁻¹ obtenus avec une excitation à 514 nm. En (B) schéma du cluster fer-soufre indiquant la position des modes bridging et terminaux du cluster [2Fe-2S].

Dans le spectre d'Adx WT, quatre bandes intenses à 387, 342, 328 et 285 cm⁻¹ et deux bandes faibles à 415 et 312 cm⁻¹ ont été observées. Les bandes situées à 328 et 342 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations des modes terminaux du cluster Fe-S_t qui sont situés entre les résidus des acides aminés cystéines et le cluster fer-soufre alors que les bandes à 285, 387 et 415 cm⁻¹ correspondent aux vibrations des modes « bridging » qui se trouvent au sein du cluster Fe-S_b (Figure 1 B). La bande située à 312 cm⁻¹ est attribuée aux vibrations Fe-S_t mais également aux vibrations des déformations S-C-C. Le résultat obtenu est en accord avec les études précédentes réalisées en spectroscopie Raman par Spiro *et al* sur l'adrénodoxine et la ferrédoxine sur la base d'un modèle structural ayant comme groupe de symétrie D_{2h}.¹⁻³ Le Tableau 1 regroupe les

attributions des différents modes de vibrations du cluster fer-soufre de l'Adx WT et les différents mutants.^{1, 2, 4, 5}

Modes de vibrations	Références	Adx WT	Adx (4-108)	Adx S112W	Adx D113Y	Adx T54S ; D113Y	Adx littérature ⁵	
Fe-S élongation	B _{3u} ^b	[1,2,5]	415	412	408	412	412	419.4
	A _g ^b	[1,4,5]	387	386	388	386	386	391.3
	B _{1u} ^t / B _{2u} ^t /B _{2g} ^t	[1,2,5]	342	340	339	338	340	340.2
	A _g ^t / B _{3g} ^t	[1,2,5]	328	323	327	324	326	328.4
	B _{3u} ^t /B _{1u} ^b	[1,2,5]	285	284	285	285	284	289.2
déformation (S-C-C)	B _{1g} ^b /A _{1g} ^t / B _{3g} ^t	[1,2,5]	312	309	311	311	311	315

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des bandes de vibrations des spectres Raman d'Adx WT et les différents mutants étudiés. Pour comparaison, les valeurs trouvées dans la littérature sur l'Adx sont reportées dans la dernière colonne. Les différentes valeurs sont représentées en cm⁻¹.

Sur le spectre de la forme tronquée Adx (4-108) (Figure 1A), les vibrations des modes bridging et terminaux du Fe-S observées à 412 et 323 cm⁻¹ sont décalées de 3 à 5 cm⁻¹ vers les bas nombres d'ondes comparé au spectre d'Adx WT. Ce résultat implique que l'absence de la partie C-terminale qui protège le cluster fer-soufre des molécules d'eau a induit un changement dans la géométrie du cluster [2Fe-2S].

Il a été décrit dans la littérature que les angles dièdres de la chaîne latérale de la cystéine, ont une influence sur le couplage entre les vibrations de déformation S-C-C et d'élongation Fe-S.¹ La combinaison de vibrations d'élongation Fe-S avec les vibrations de déformation S-C-C dépend de l'angle dièdre du Fe-S-C-C qui est minimal à 90° et maximal à 180°. Mino *et al* ont montré que les liaisons hydrogènes sont assez fortes pour permettre une perturbation dans les fréquences des vibrations d'élongation Fe-S.⁵

Un déplacement vers des faibles nombres d'onde des modes terminaux du cluster fer-soufre, comme dans notre cas, peut également être attribué à l'augmentation de la force de la liaison hydrogène du ligand au cluster.

Les résultats obtenus sont en accord avec des études précédentes réalisées en RPE et en dichroïsme circulaire sur l'Adx WT et la forme tronquée, qui ont révélé des changements structuraux plus prononcés dans le cas de la forme tronquée comparé à l'Adx WT.⁶

En ce qui concerne le mutant Adx S112W, nous avons observé un déplacement de 415 cm^{-1} à 408 cm^{-1} soit un décalage de 7 cm^{-1} , des vibrations des modes bridging ainsi qu'un déplacement de 3 cm^{-1} des vibrations des modes terminaux de 342 à 339 cm^{-1} en comparaison avec le spectre de l'Adx WT (Figure 1A).

Les autres mutants, dont la mutation se situe à côté de la première région d'interaction pour Adx D113Y et à proximité du cluster fer-soufre pour l'Adx T54S ; D113Y (Figure 14 dans l'introduction) ont montré les mêmes changements mais avec un déplacement moins prononcé au niveau des modes de vibrations Fe-S_t. Enfin, l'adrénodoxine réductase AdR (Figure 1A) n'a montré aucune contribution dans la gamme spectrale étudiée.

1.1 Spectroscopie Raman des complexes Adx/AdR

Après avoir identifié les bandes caractéristiques des différents mutants, les complexes ont été caractérisés par spectroscopie Raman (Figure 2).

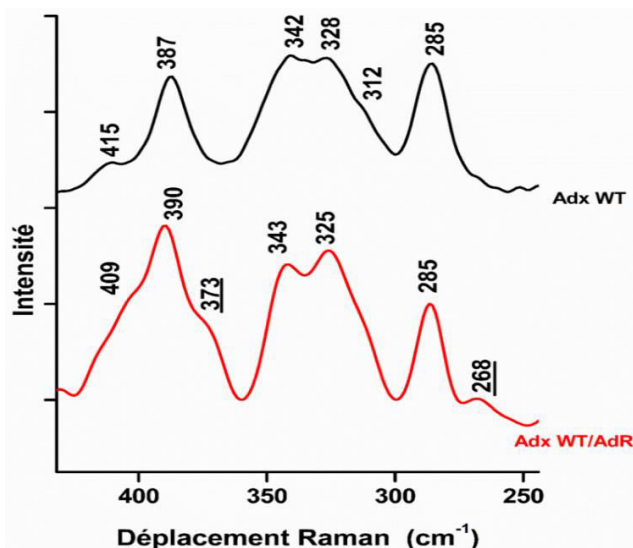


Figure 2 : Spectres Raman de l'Adx WT et du complexe Adx WT/AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm.

Le profil spectral du complexe Adx WT/AdR a montré un déplacement de 1 à 3 cm^{-1} au niveau des modes de vibrations Fe-S_t : de 342 à 343 cm^{-1} et de 328 à 325 cm^{-1} en comparaison avec le spectre d'Adx WT. De plus, le complexe Adx WT/AdR révèle une augmentation de l'intensité

des bandes dans la gamme spectrale située entre 390 et 285 cm^{-1} . Ces changements induits lors de la formation du complexe impliquent des changements conformationnels de l'environnement du cluster fer-soufre ainsi que de la géométrie de ce dernier.⁷⁻⁹

La formation du complexe a engendré l'apparition de deux nouvelles bandes à 268 et 373 cm^{-1} . L'augmentation du nombre de bandes lors de la formation du complexe pourrait être interprétée par une diminution de la symétrie du cluster fer-soufre lors de la complexation suite à des interactions avec l'AdR.²

Les modes de vibrations Fe-S_{b/t} peuvent être influencés par la présence de liaisons hydrogène. En effet, la structure cristallographique du complexe Adx/AdR a montré un nombre important de molécules d'eau et de liaisons hydrogène entre les résidus du cluster [2Fe-2S] de l'Adx et l'anneau isoalloxazine FAD de l'AdR.^{10, 11} Ainsi, la variation des liaisons hydrogène à proximité du cluster [2Fe-2S] va avoir un effet sur les vibrations Fe-S_{b/t} et pourrait expliquer l'apparition des nouvelles bandes à 268 et 373 cm^{-1} . De même les liaisons hydrogène peuvent affecter la géométrie du cluster et résulter en une exaltation de certains modes de vibrations Fe-S_{b/t}.¹²

Yachandra *et al*, ont également décrit que les modes de vibrations Fe-S_{b/t} de la protéine Rieske ont montré des profils d'exaltation différents en raison de la légère différence d'énergie de la bande de transfert de charge du soufre vers le fer.²

Le spectre Raman obtenu après interaction de la forme tronqué Adx (4-108) avec AdR est représenté dans la Figure 3 ci-dessous.

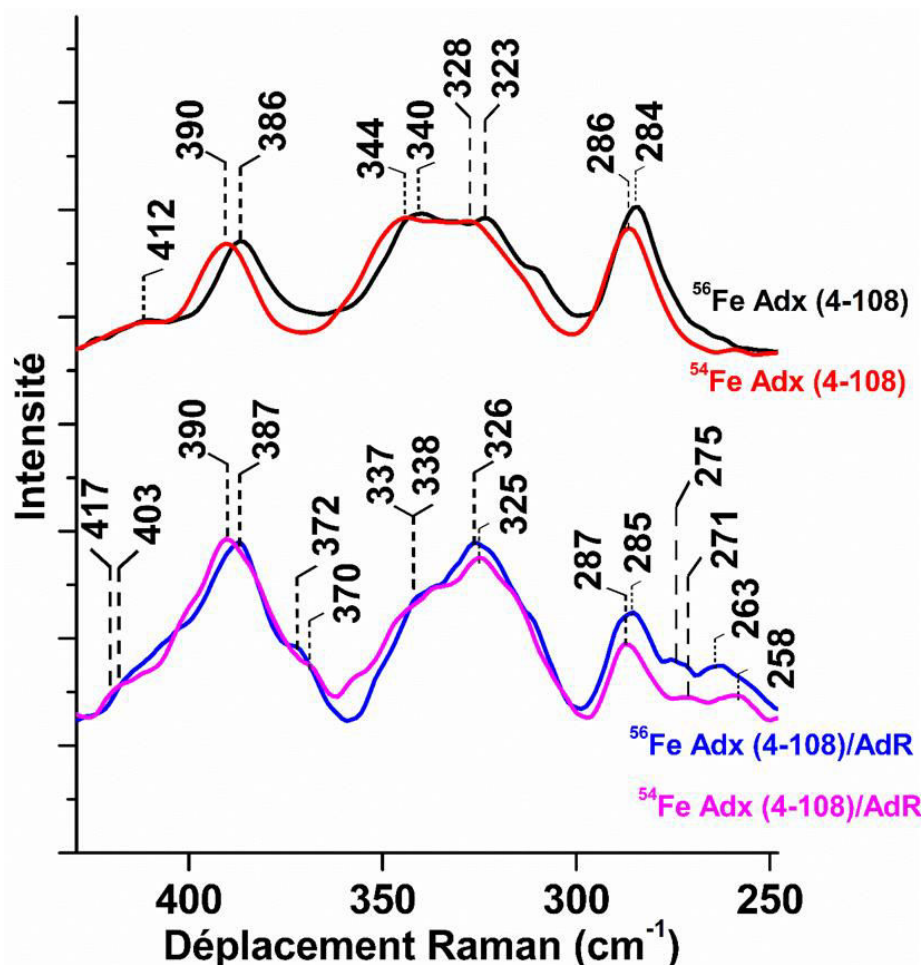


Figure 3 : Spectres Raman du $^{56}\text{Fe Adx (4-108)}$, $^{54}\text{Fe Adx (4-108)}$, complexe $^{56}\text{Fe Adx (4-108)/AdR}$ et complexe $^{54}\text{Fe Adx (4-108)/AdR}$ dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm.

A nouveau, sur le spectre du complexe $^{56}\text{Fe Adx (4-108)/AdR}$, le même comportement spectral a été observé avec un faible déplacement de 2 à 3 cm^{-1} dans les modes de vibrations Fe-S_t : de 340 à 338 cm^{-1} et de 323 à 326 cm^{-1} en comparaison avec le spectre d'Adx (4-108) (Figure 1A). On a également observé un déplacement de 9 cm^{-1} dans les modes de vibrations Fe-S_b : de 412 à 403 cm^{-1} en comparaison avec le spectre d'Adx (4-108).

En analogie avec le complexe Adx WT/AdR, en plus du déplacement observé dans les modes de vibrations $\text{Fe-S}_{b/t}$ lors de la formation du complexe $^{56}\text{Fe Adx (4-108)/AdR}$, une nouvelle bande est apparue à 263 cm^{-1} comme le montre le spectre bleu de la Figure 3. L'apparition de ces bandes est le résultat de changements plus prononcés au niveau de la géométrie du cluster fer-soufre comparé au complexe Adx WT /AdR (Figure 2). En effet, la partie C-terminale qui contient les résidus d'acides aminés dans la position 109 à 128 et qui protège le cluster fer-soufre des molécules d'eau a été supprimée dans la forme tronquée d'Adx (4-108) ce qui signifie

que le cluster est beaucoup plus exposé au solvant que dans l'Adx WT et ceci explique l'apparition de ces nouvelles bandes.¹³

Les deux complexes d'Adx WT/AdR et Adx (4-108)/AdR ont montré des changements structuraux importants au niveau du cluster lors de l'interaction avec l'AdR. Afin de confirmer que les nouvelles bandes observées sur les deux complexes appartiennent aux vibrations du cluster fer-soufre, nous avons procédé à un marquage isotopique du ⁵⁴Fe dans l'Adx (4-108). Le choix du marquage de l'Adx (4-108) est lié à sa haute stabilité comparé à l'Adx WT. Le marquage isotopique est une technique fiable pour confirmer l'attribution d'un groupe fonctionnel spécifique.

Des études précédentes sur la protéine Adx avec un marquage isotopique au niveau de l'atome de soufre (³⁴S), ont produit des déplacements aux niveaux des bandes de vibrations ce qui a permis l'identification de tous les modes de vibrations du (Fe₂S₂).^{2, 14}

Dans notre cas le marquage isotopique du ⁵⁴Fe de l'Adx (4-108) nous a permis de confirmer que les nouvelles bandes observées lors de la formation des complexes appartiennent bien aux vibrations du cluster fer-soufre et non pas à un changement dans les propriétés spectrales de l'AdR, bien qu'aucune contribution spectrale n'ait été observée sur le spectre de l'AdR seul (Figure 1).

En comparant les spectres de la forme non marquée ⁵⁶Fe Adx (4-108) et marquée ⁵⁴Fe Adx (4-108) (Figure 3), un déplacement de 4 à 5 cm⁻¹ a été observé pour tous les modes de vibrations du cluster fer-soufre ce qui confirme les attributions des modes de vibrations Fe-S_{b/t} de la protéine Adx.

Lors de l'interaction de ⁵⁶Fe Adx (4-108), ou de ⁵⁴Fe Adx (4-108) avec AdR, des déplacements au niveau des vibrations Fe-S_{b/t} ont été observés. On peut remarquer que les bandes des modes de bridging comprises entre 430 et 360 cm⁻¹ pour les complexes non-marqué et marqué sont très larges et complexes. Dans le but de mettre en évidence plus précisément l'effet du marquage isotopique dans le complexe, la déconvolution de la bande située entre 430 et 360 cm⁻¹ a été réalisée comme le montre la Figure 4.

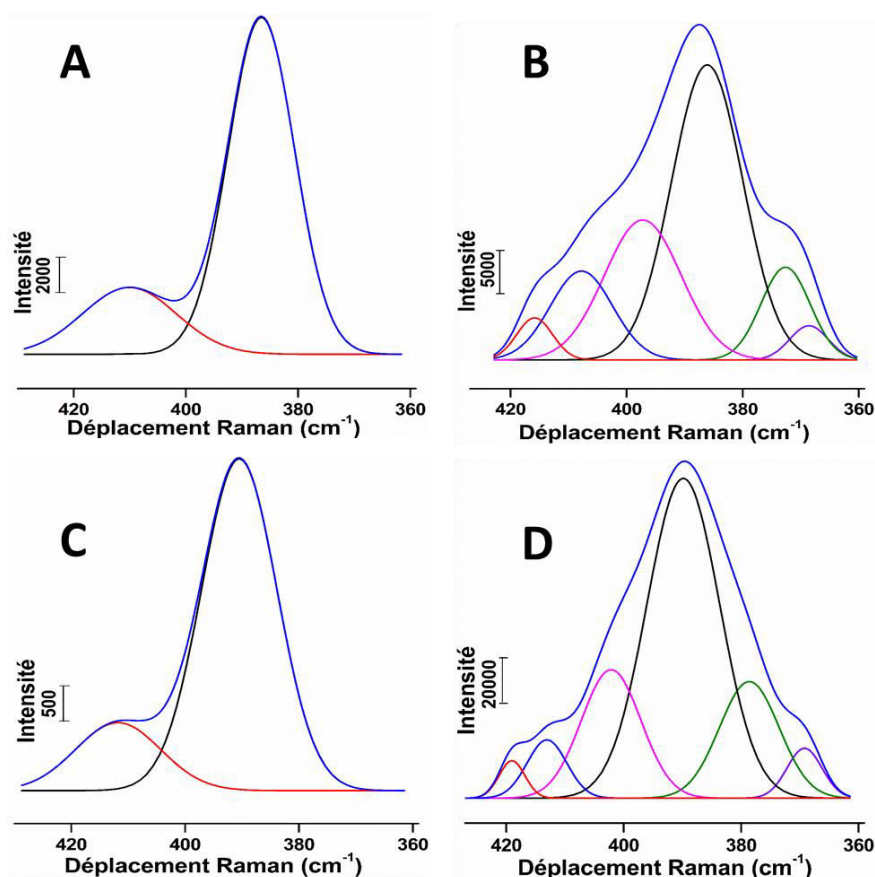


Figure 4 : Déconvolution de la bande située entre 430 et 360 cm⁻¹ de ⁵⁶ Fe Adx (4-108) (A), du complexe ⁵⁶ Fe Adx (4-108) /AdR (B), de ⁵⁴ Fe Adx (4-108) (C) et du complexe ⁵⁴ Fe Adx (4-108) /AdR (D).

La déconvolution de la bande située entre 430 et 360 cm⁻¹ associée aux modes de vibrations bridging du cluster fer-soufre dans la forme non marquée et marquée de l'Adx (4-108) a indiqué le même profil spectral après déconvolution, caractérisé par deux composantes passant de 410 et 386 cm⁻¹ à 412 et 390 cm⁻¹ entre les formes non marquée et marquée respectivement (Figure 4A-C). En outre, lors de la formation des complexes ⁵⁶Fe Adx (4-108) /AdR et ⁵⁴Fe Adx (4-108) /AdR (Figure 4B-D) de nouveaux modes de vibrations bridging ont été observés à 397, 386, 372, 368 cm⁻¹ et 402, 390, 378, 369 cm⁻¹ respectivement en comparaison des spectres de la protéine seule (Figure 4A-C). Ainsi, nous avons pu confirmer avec certitude que les nouvelles bandes observées dans les complexes sont attribuées aux vibrations Fe-S_b de la protéine Adx.

Après avoir confirmé que les vibrations observées lors de la formation des complexes appartiennent aux modes de vibrations Fe-S_{b/t}, nous nous sommes intéressés à l'étude de certaines mutations spécifiques dans des régions précises de l'Adx ayant une certaine influence sur la formation des complexes. Les spectres Raman de ces différents complexes sont représentés ci-dessous (Figure 5).

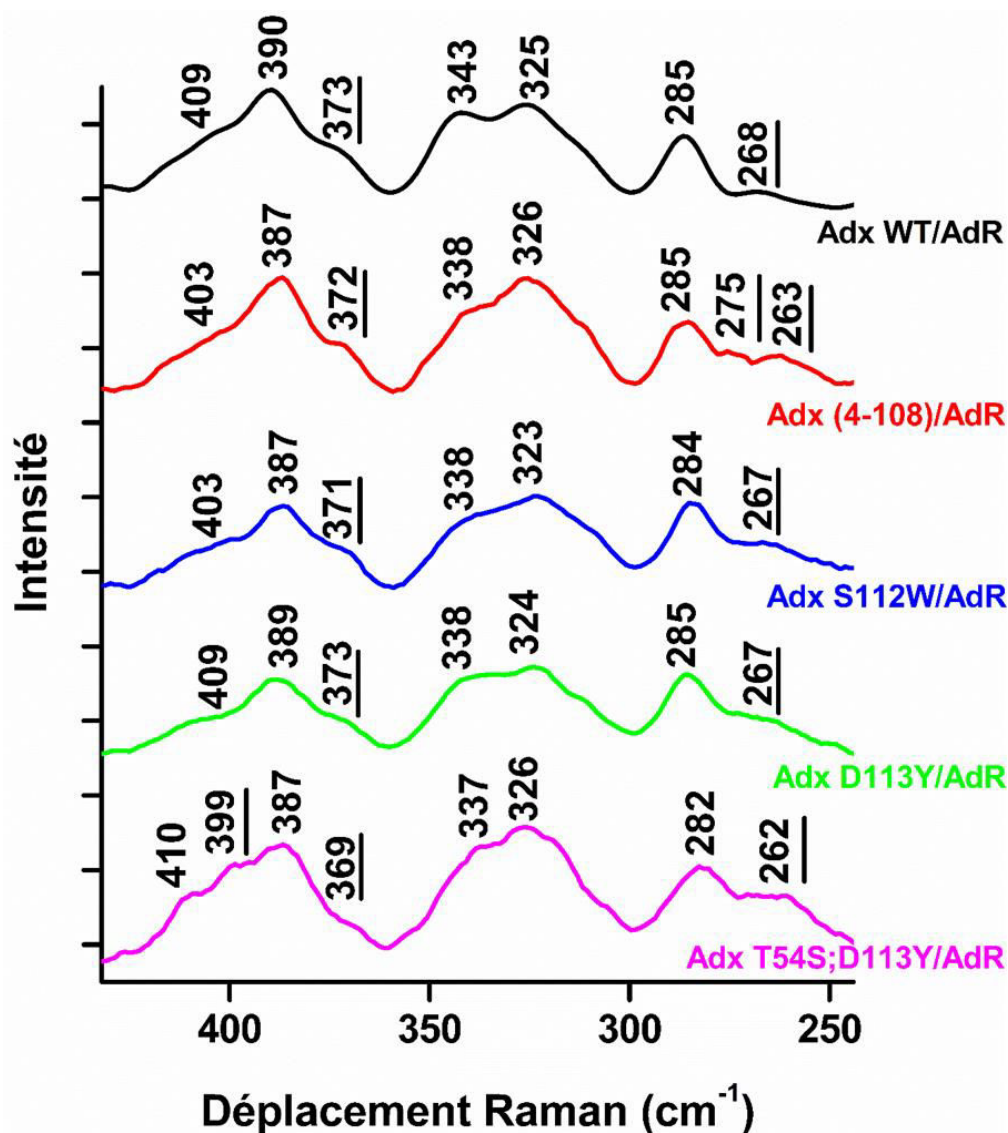


Figure 5 : Spectres Raman des différents complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S; D113Y/AdR dans la gamme spectrale de 430 à 250 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 514 nm.

Les spectres Raman des complexes Adx S112W/AdR et Adx D113Y/AdR sont similaires et présentent les mêmes changements observés que le complexe Adx WT/AdR à l'exception d'un déplacement de 5 cm^{-1} d'une bande de 343 cm^{-1} à 338 cm^{-1} . De plus, l'intensité relative du signal à 338 cm^{-1} dans les complexes Adx S112W/AdR et Adx D113Y/AdR (Figure 5) diminue légèrement comparée à l'intensité relative du signal située à 343 cm^{-1} dans le cas du complexe Adx WT/AdR (Figure 5). Cette variation d'intensité peut être induite par différents degrés d'exaltation des modes de vibrations bridging et terminales du cluster fer-soufre comme décrit précédemment dans la littérature par Yachandra *et al* sur la ferrédoxine² et par Willis et Loehr sur la xanthine oxydase.¹⁵

En ce qui concerne le complexe AdxT54S ; D113Y/AdR (Figure 5), un déplacement évident au niveau des modes de bridging a été observé dans la région située entre 420 et 360 cm^{-1} ainsi qu'une nouvelle bande apparue à 399 cm^{-1} . Cette bande n'a pas été observée dans les autres complexes comme le montre la Figure 5. En effet, la mutation T54S est située à proximité du cluster fer-soufre (Figure 14 dans l'introduction) et de ce fait la géométrie du cluster est encore plus affectée que dans les autres complexes. Le Tableau 2 détaille l'attribution des différentes bandes correspondantes aux différents complexes étudiés.^{1, 4}

Complexes	Déplacement Raman (cm^{-1})			Résonance Plasmonique de Surface Kd [M] ^{16,17,18}
	ν (Fe-S _b)	ν (Fe-S _t)	δ (S-C-C) _{b+t}	
Adx WT/AdR	409/390/373/ - /268	343/325/285	312	8.56×10^{-7}
Adx (4-108)/AdR	403/387/372/275/263	338/326/285	311	5.3×10^{-7}
Adx S112W/AdR	403/387/371/ - /267	338/323/284	309	6.01×10^{-7}
Adx D113Y/AdR	409/389/373/ - /267	338/324/285	312	7.2×10^{-7}
AdxT54S;D113Y/AdR	410/399/387/369/262	337/326/282	306	8.4×10^{-7}

Tableau 2 : Nombres d'ondes des différentes bandes des spectres Raman des complexes Adx/AdR et les paramètres d'interaction de l'Adx avec l'AdR déterminés à partir de la Résonance Plasmonique de Surface mesuré avec un système Biacore. ^{1, 4, 16-18}

Ces différentes protéines et complexes ont également été étudiés dans la gamme spectrale comprise entre 1700 et 1200 cm^{-1} . Les résultats obtenus n'ont montré aucun changement lors de la formation des complexes (Figures S1, S2 et Tableaux S1, S2 en annexe).

1.2 Spectroscopie infrarouge différentielle de l'Adx et ses mutants

Afin de caractériser les changements observés au niveau moléculaire dans l'environnement des cofacteurs (FAD et Fe-S) et du squelette polypeptidique comme les changements d'état de protonation et de conformation au cours de la réaction d'oxydoréduction, une étude par spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie a été effectuée. Les vibrations du cluster fer-soufre ne sont pas observables dans la gamme spectrale étudiée entre 1800 et 1200 cm^{-1} mais se retrouvent à basse fréquence.¹⁹ Cependant, la contribution de la chaîne

peptidique ainsi que des chaînes latérales des acides aminés de l'environnement du cluster [2Fe-2S] peut être observée dans la région spectrale étudiée. La Figure 6 représente les spectres différentiels de l'Adx et de ses différents mutants.

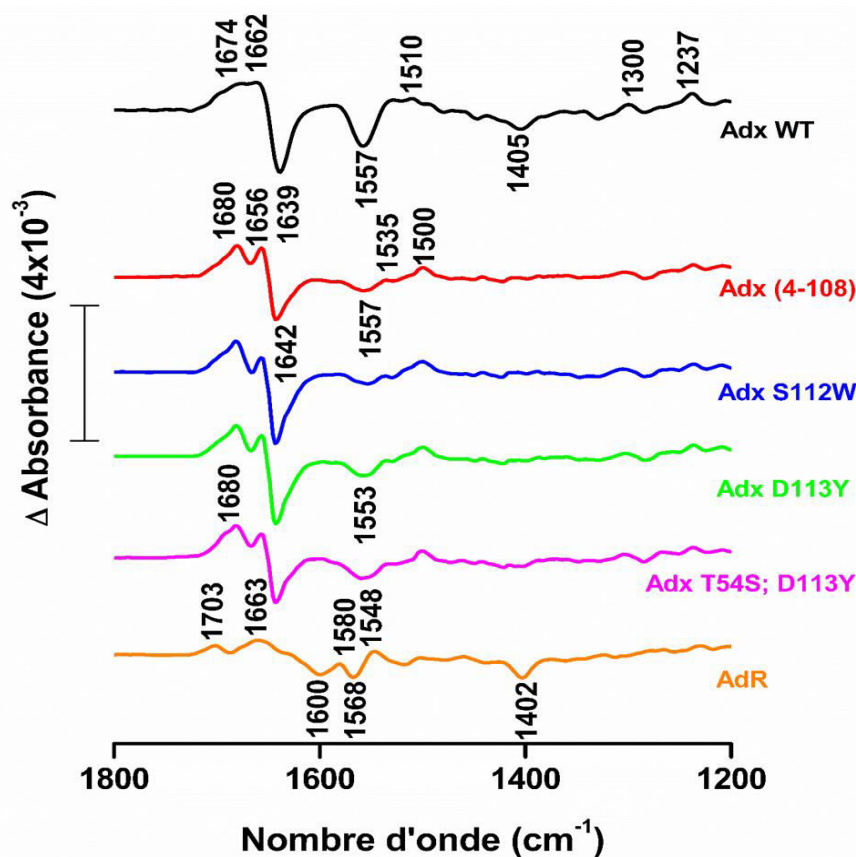


Figure 6 : Spectres différentiels (forme oxydée- forme réduite) de l'Adx WT, Adx (4-108), AdXS112W, Adx D113Y, Adx T54S; D113Y et AdR dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm^{-1} avec un potentiel de -600 et 0 mV.

Les bandes positives correspondent aux changements ayant lieu au cours de l'oxydation et les bandes négatives reflètent les changements se produisant au cours de la réaction de réduction. Le spectre différentiel de l'Adx WT est divisé en trois régions principales : entre 1700-1600 cm^{-1} , 1600-1500 cm^{-1} et 1510 et 1237 cm^{-1} .

La première et la deuxième région correspondent principalement aux bandes nommées amide I et amide II, les contributions majeures du squelette polypeptidique sont observées dans cette région spectrale. La large bande positive située à 1662 cm^{-1} et la bande négative à 1639 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation ν (C=O) du squelette peptidique caractérisant la structure secondaire.^{20, 21} A une certaine position spécifique comme par exemple à 1674 et 1639

cm⁻¹, les vibrations d'élongation ν (C=O) de certains acides aminés tels que l'asparagine, la glutamine et l'arginine ($\nu(\text{CN}_3\text{H}_5^+)^{\text{as/s}}$) peuvent également avoir une contribution.²¹⁻²³

Dans la troisième région la contribution de certains acides aminés est possible, par contre cette région contient un nombre important de chevauchements de bandes et l'attribution de ces dernières n'est possible que via des marquages isotopiques.

Le profil spectral des spectres différentiels de la forme tronquée Adx (4-108) ainsi que des mutants Adx S112W, Adx D113Y et Adx T54S ; D113Y est presque identique. Par contre, ces derniers montrent des changements significatifs en comparaison avec le spectre d'Adx WT reflétant une réorganisation conformationnelle différente lors de la réaction d'oxydoréduction.

Sur le spectre d'Adx (4-108), la bande située à 1680 cm⁻¹ est plus intense comparée à la bande située à 1674 cm⁻¹ dans le cas d'Adx WT, et le ratio amide I / amide II varie avec la diminution de la bande à 1557 cm⁻¹. Ces modifications sont également présentes pour les autres mutants Adx S112W, Adx D113Y et Adx T54S ; D113Y avec un effet plus ou moins prononcé en fonction du mutant étudié. Les tentatives d'attribution d'Adx WT et les différents mutants sont représentées dans le Tableau 3. Ces tentatives sont basées sur l'attribution des bandes à des acides aminés dans des protéines modèles.²⁰⁻²³

AdxWT	Adx(4-108)	AdxS112W	AdxD113Y	AdxT54S;D113Y	Tentative d'attribution
1674	1680 (+)	1682 (+)	1681 (+)	1680 (+)	Asn, Gln $\nu(\text{C}=\text{O})$; Arg $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5^+)^{\text{as}}$
1662 (+)	1656 (+)	1656 (+)	1656 (+)	1656 (+)	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
1639 (-)	1642 (-)	1643 (-)	1642 (-)	1643 (-)	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$, Arg $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5^+)^{\text{s}}$
1557 (-)	1557 (-)	1553(-)	1553 (-)	1558 (-)	Amide II $\delta(\text{N-H})$ / $\nu(\text{C-N})$; Glu/Asp $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$
1405 (-)	/	/	1402 (-)	1404 (-)	Glu, Asp, $\nu(\text{COO}^-)^{\text{s}}$; Amide III $\delta(\text{O}=\text{CN})$

Tableau 3 : Tentative d'attribution des bandes sur les spectres différentiels infrarouge (ox-red) d'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx S113Y et Adx T54S; D113Y. L'oxydation est symbolisée par un (+) et la réduction par un (-).²⁰⁻²³

1.3 Spectroscopie infrarouge différentielle de l'AdR

Le spectre différentiel de l'adrénodoxine réductase est représenté en Figure 6. A nouveau des changements conformationnels de la chaîne polypeptidique ainsi que des changements d'état de protonation des acides aminés sont attendus.

Le spectre est dominé par des contributions issues du cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) qui sont présentes à 1703, 1568, 1548 et 1402 cm^{-1} .²⁴ Par analogie avec des études précédentes sur les flavoprotéines, la bande positive à 1703 cm^{-1} est associée aux modes de vibration d'élongation ν (C=O) de la flavine et la bande négative à 1568 cm^{-1} aux vibrations d'élongation ν (C=N). Les modes de vibrations les plus importants de la flavine sont ceux situés à 1548 et 1402 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations d'élongation ν (C=N) et de déformation δ (N-H) de l'anneau isoalloxazine.^{20, 24} Le Tableau 4 représenté ci-dessous est un récapitulatif des bandes observées sur le spectre différentiel de l'AdR.

Position des bandes (cm^{-1})	Tentative d'attribution
1703 (+)	Asp, Glu, ν (C=O); flavine ν (C4=O)
1663 (+)	Amide I ν (C=O), flavine ν (C=O)
1600 (-)	flavine ν (C4a-C10a)
1580 (+)	Amide II δ (N-H)/ ν (C-N); Asp/Glu ν (COO ⁻) ^{as} ; flavine ν (C4a=N5), ν (C10a=N1)
1568 (-)	Asp, Glu ν (COO ⁻) ^{as} ; Amide II δ (N-H)/ ν (C-N), flavine ν (C=N)
1548 (+)	Amide II, ν (C-N); flavine (C4a=N5), ν (C10a=N1)
1519 (-)	Asp, Glu ν (COO ⁻) ^s , flavine δ (C6-H), δ (C9-H)
1402 (-)	flavine, δ (N5-H); Amide III δ (O=C-N)
1230 (+)	Amide III δ (O=C-N)

Tableau 4 : Tentative d'attribution des bandes du spectre différentiel infrarouge (ox-red) de l'AdR. L'oxydation est symbolisée par un (+) et la réduction par un (-).^{20, 24}

1.4 Spectroscopie Infrarouge différentielle des complexe Adx/AdR

Afin d'étudier l'effet de l'interaction entre Adx et AdR et les changements conformationnels induits lors de la réaction d'oxydoréduction, les spectres différentiels de leurs complexes ont été étudiés.

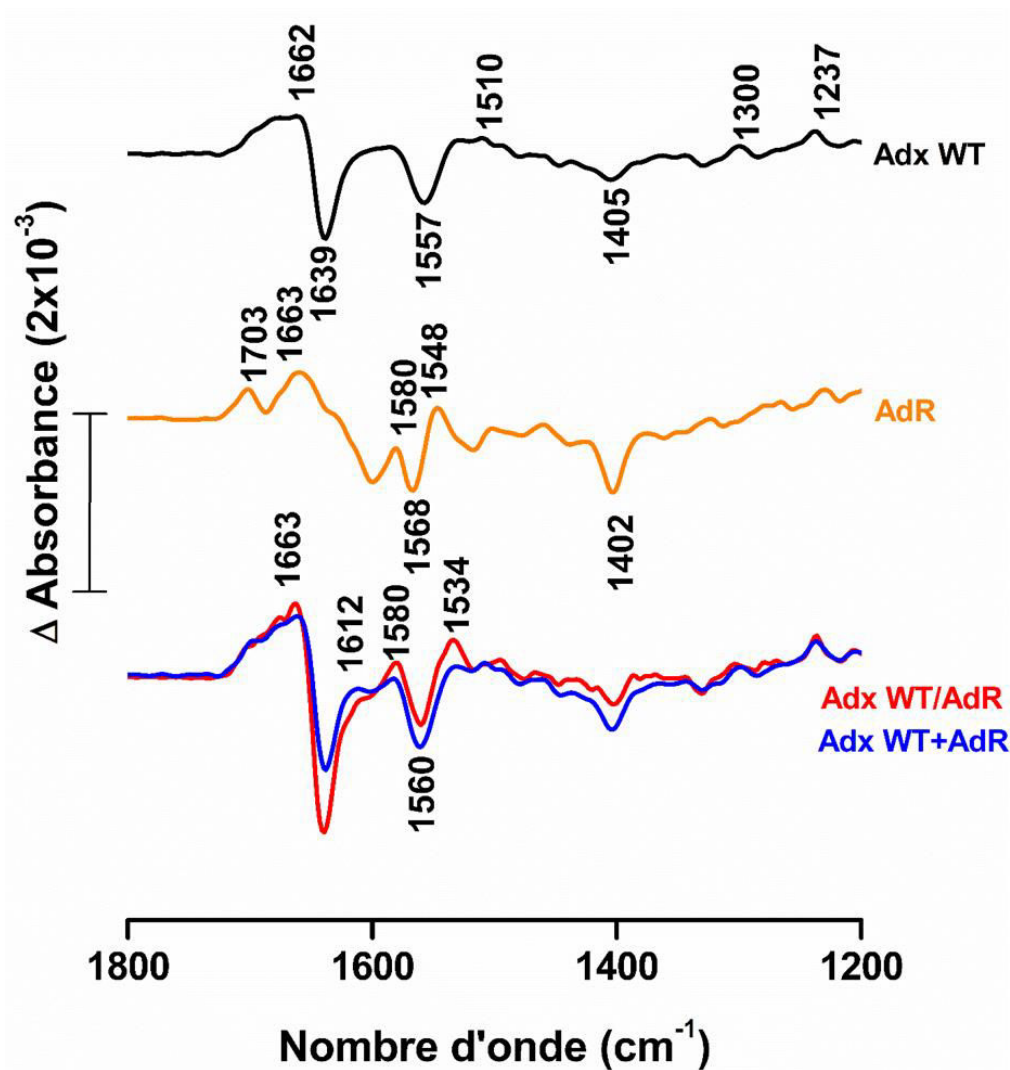


Figure 7 : Spectres différentiels (ox-red) de l'Adx WT, de l'AdR et du complexe Adx WT/AdR et addition des spectres de Adx WT+ AdR dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm^{-1} avec un potentiel de -600 et 0 mV.

Le complexe Adx WT/AdR est dominé par le spectre Adx WT et non par celui de l'AdR comme on peut le voir sur la Figure 7. Afin de mettre en évidence les changements qui se produisent lors de la formation du complexe, l'addition des spectres Adx WT et AdR a été réalisée et comparée au spectre du complexe Adx WT/AdR. Des changements faibles mais clairs se produisent dans la région amide I et II ce qui reflète des changements structuraux lors de la formation du complexe. De plus, l'apparition d'une nouvelle bande dans la région amide I a été observée à 1612 cm^{-1} . La bande à 1548 cm^{-1} qui est attribuée aux vibrations de l'anneau isoalloxazine de la FAD de l'AdR est décalée de 14 cm^{-1} dans le complexe Adx WT/AdR et se retrouve à 1534 cm^{-1} . Ce résultat peut être expliqué sur la base de la structure cristallographique du complexe Adx/AdR, où des liaisons hydrogènes ont été observées entre les résidus liant le

cluster [2Fe-2S] de l'Adx et l'anneau isoalloxazine FAD de l'AdR.¹³ Le résultat obtenu est en accord avec l'observation d'un phénomène similaire en Raman.

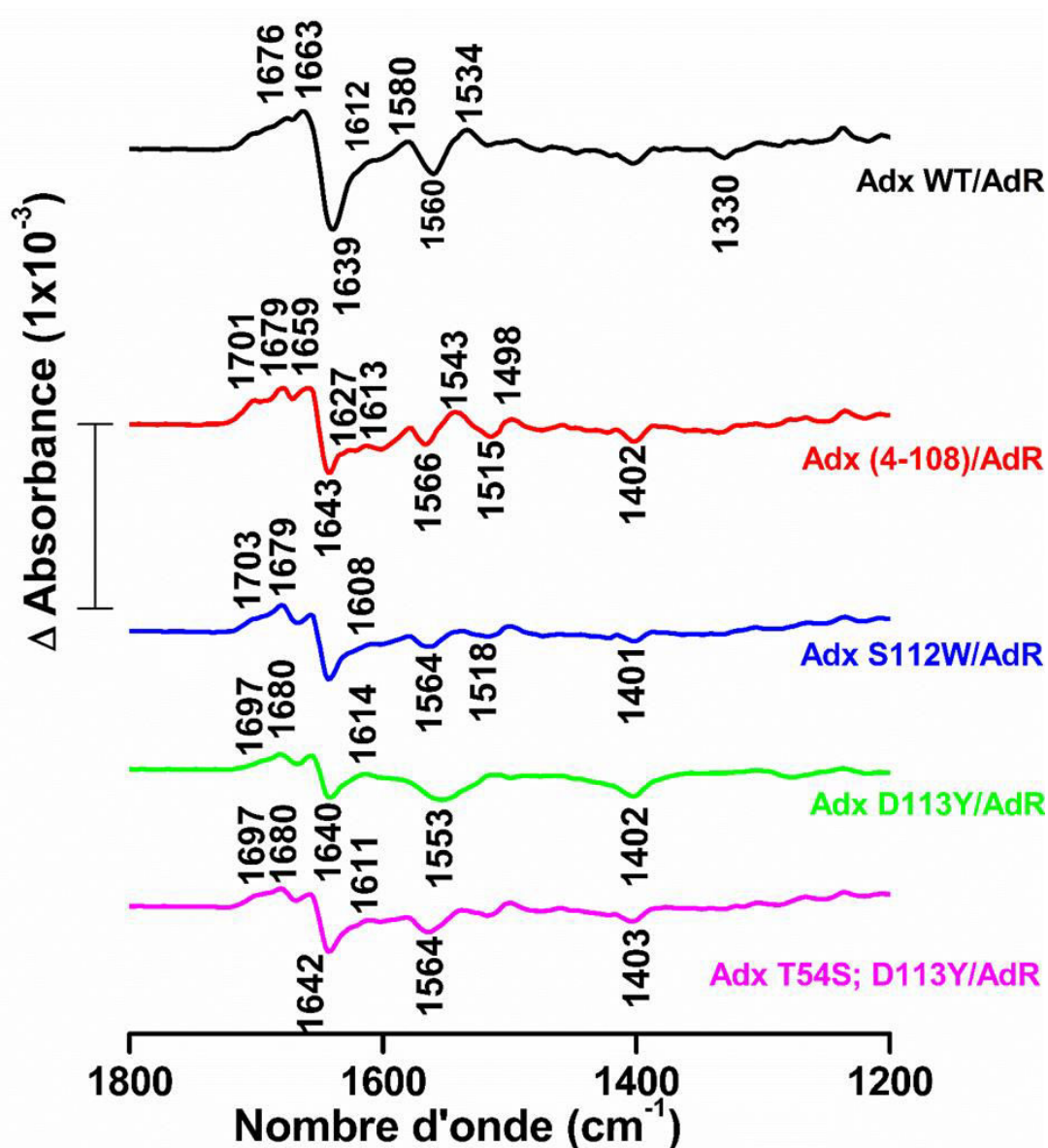


Figure 8 : Spectres différentiels (ox-red) des complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S; D113Y /AdR dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ avec un potentiel de -600 et 0 mV.

Lorsque l'on compare le complexe Adx WT/AdR avec le complexe Adx (4-108)/AdR (Figure 8), plusieurs différences sont notées dans les régions amide I et II. Une nouvelle bande est observée à 1627 cm⁻¹ et la bande située à 1534 cm⁻¹ attribuée au mode de vibrations de la flavine dans le complexe Adx WT/AdR est décalée jusqu'à 1543 cm⁻¹ dans le complexe Adx (4-108)/AdR. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en Raman tenant compte du réarrangement structural de la protéine en raison de la suppression de la partie C-terminale qui

protège le cluster fer-soufre des molécules d'eau²⁵ ainsi que les liaisons hydrogène observées entre les résidus liant le cluster [2Fe-2S] et l'anneau isoalloxazine FAD.¹³

Pour les complexes Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S ; D113Y, l'interaction se reflète par les bandes décrites précédemment dans les régions amide et dans la gamme spectrale comprise entre 1560 et 1543 cm⁻¹. Le complexe Adx D113Y/AdR a montré un changement plus prononcé comparé au complexe Adx S112W/AdR. En effet, Bichet *et al* ont montré que le D113Y fixe la partie C-terminale de l'Adx avec des interactions hydrophobes.²⁶ Ainsi, la flexibilité de cette partie est réduite ce qui conduit à une meilleure interaction de l'Adx D113Y avec l'AdR. L'Adx S112W manque, en effet, de région flexible car sa partie C-terminale a été supprimée.

Ainsi, les résultats obtenus par la spectroscopie Raman et infrarouge nous ont permis d'identifier des changements importants dans le cluster fer- soufre et dans la structure secondaire des différents complexes étudiés. Les tentatives d'attribution des différents complexes sont représentées dans le Tableau 5.²⁰⁻²⁴

AdxWT /AdR	Adx(4-108) /AdR	AdxS112W /AdR	AdxD113Y /AdR	AdxT54S;D113Y /AdR	Tentative d'attribution
/	1701 (+)	1703 (+)	1697 (+)	1697 (+)	Asp, Glu, $\nu(\text{C}=\text{O})$, flavine $\nu(\text{C}_4=\text{O})$
1676 (+)	1679 (+)	1679 (+)	1680 (+)	1680 (+)	Asn, Gln, $\nu(\text{C}=\text{O})$ Arg, $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5^+)^{\text{as}}$
1663 (+)	1659 (+)	1657 (+)	1656 (+)	1658 (+)	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$; flavine $\nu(\text{C}=\text{O})$
1639 (-)	1643 (-)	1643 (-)	1640 (-)	1642 (-)	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
/	1627 (+)	1608 (+)	1614 (+)	1611 (+)	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
1612 (+)	1613 (+)	1602 (-)	1602 (-)	1601 (-)	flavine $\nu(\text{C}_{4a}-\text{C}_{10a})$
1580 (+)	1579 (+)	1580 (+)	/	1581 (+)	Amide II $\delta(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$ +, flavine $\nu(\text{C}_{4a}=\text{N}_5)$, $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$

1560 (-)	1566 (-)	1564 (-)	1553	1564 (-)	Asp, Glu, $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Amide II $\delta(\text{N-H})/$ $\nu(\text{C-N})$, flavine $\nu(\text{C=N})$
1534 (+)	1543 (+)	1537 (+)	/	1537 (+)	Glu/Asp, $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$, Amide II $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$; flavine ($\text{C}_{4\text{a}}=\text{N}_5$), $\nu(\text{C}_{10\text{a}}=\text{N}_1)$
/	1515 (-)	1518 (-)	/	1518 (-)	flavine $\delta(\text{C}_6\text{-H})$, $\delta(\text{C}_9\text{-H})$
/	1474 (-)	1473 (-)	/	1478 (-)	Glu/Asp $\nu(\text{COO}^-)^{\text{s}}$
1403 (-)	1402 (-)	1401 (-)	1402 (-)	1403 (-)	flavine, $\delta(\text{N}_5\text{-H})$

Tableau 5 : Tentative d'attribution des bandes sur les spectres différentiels infrarouge (ox-red) des complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, AdxD113Y/AdR et Adx T54S ; D113Y/AdR. L'oxydation est symbolisée par un (+) et la réduction par un (-).²⁰⁻²⁴

2 Spectroscopie Raman du cytochrome CYP106A2

Comme la structure cristallographique du CYP10A2 n'a pas encore été résolue, nous avons cherché à identifier dans un premier temps la coordination de l'hème et l'état de spin du cofacteur et ensuite l'interaction de cette protéine avec l'Adx et l'AdR. Pour cela, deux gammes spectrales ont été étudiées. La première est comprise entre 1800 et 450 cm^{-1} et la deuxième de 450 à 200 cm^{-1} . La Figure 9 présente le spectre Raman du cytochrome CYP106A2 obtenu avec une excitation à 457 nm.

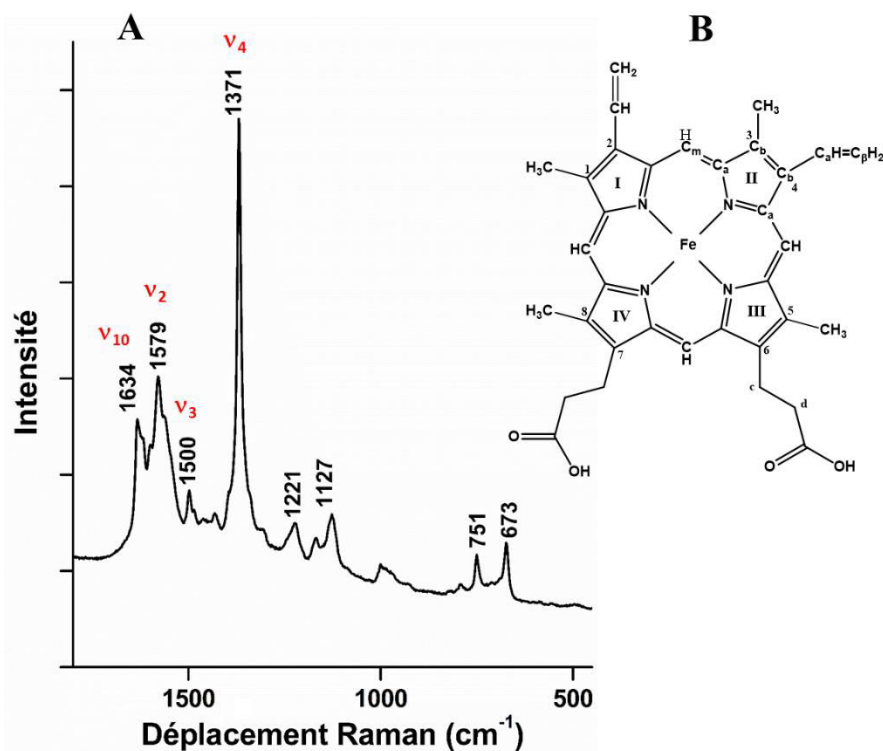


Figure 9 : En (A) spectre Raman du cytochrome CYP106A2 dans la gamme spectrale de 1800 à 450 cm⁻¹ obtenu avec une excitation à 457 nm. En (B) schéma de l'hème *b*.

La principale bande marqueur de l'état d'oxydation de l'hème est observée à 1371 cm⁻¹, fréquence typique pour les hémoprotéines ferreux à bas spin.²⁷ Cette bande se retrouve à 1375 cm⁻¹ pour les hèmes avec un centre Fe (III) haut ou bas spin, proche de 1380 cm⁻¹ pour le Fe (IV) bas spin et proche de 1360 cm⁻¹ pour le Fe (II) à haut ou bas spin. L'hème est constitué d'un macrocycle de porphyrine contenant un atome de fer central coordonné à quatre atomes d'azote. Le cinquième ligand pour le fer est appelé ligand proximal et correspond à la liaison Fe-cystéine qui est à peu près perpendiculaire au plan de l'hème. L'atome de fer peut accepter un sixième ligand externe tel qu'une molécule d'eau ou bien une molécule de dioxygène ou un autre résidu d'acide aminé de la protéine. Ce ligand est appelé ligand distal du fer de l'hème.²⁸

Le spectre Raman du CYP106A2, nous a permis de confirmer grâce à la position des bandes v₁₀ (1634 cm⁻¹), v₂ (1579 cm⁻¹), v₃ (1500 cm⁻¹) et v₄ (1371 cm⁻¹) que l'hème *b* est hexacoordiné et bas spin comme décrit précédemment par Jordan *et al*²⁹. Nos résultats sont également en accord avec les travaux de Sato *et al* réalisés sur le système modèle nommé DOS PAS issu d'*E.coli*.³⁰

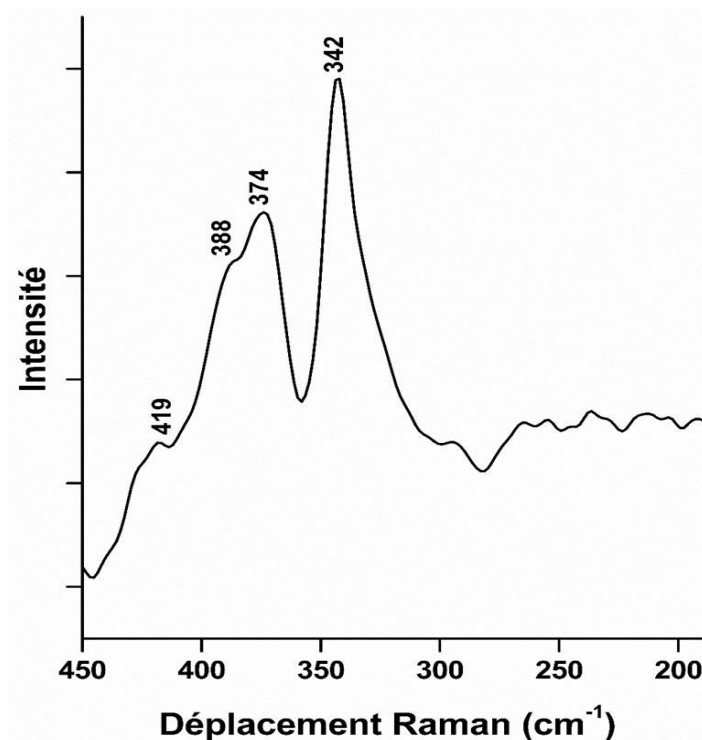


Figure 10 : Spectre Raman du cytochrome CYP106A2 dans la gamme spectrale de 450 à 200 cm^{-1} obtenu avec une excitation à 457 nm.

La Figure 10 montre la deuxième gamme spectrale du spectre Raman du CYP106A2. Ce spectre révèle une bande intense située à 342 cm^{-1} correspondante au mode ν_8 . Ce mode est une combinaison des vibrations d'élongation « breathing » Fe-N (pyrole) et des modes de déformations du pyrole.³¹ D'autres modes caractéristiques de l'hème *b* sont observés et représentés dans le Tableau 6.^{27, 31, 32}

Déplacement Raman (cm^{-1}) CYP106A2	Attribution
1634	ν_{10} (C=C) vinyle, Amide I ν (C=O)
1579	ν_2 (C _b C _b), Amide II δ (N-H)/ ν (C-N), ν (COO ⁻) ^{as}
1500	ν_3 pyrole breathing
1371	ν_4 mode breathing pyrole ν (CN), Amide III δ (O=C-N)
1221	?
1127	ν (mode squelettique), ν_{22} (C _a N)

751	$\delta(C_aNC_a)$
995	Tampon phosphate
673	$\delta(C_bNC_a)$
419	$\delta(C_\beta C_a C_d)$
388	$\delta(C_\beta C_c C_d)$
374	$\delta(C_\beta C_c C_d)$
342	ν_8

Tableau 6 : Attribution des bandes observées en spectroscopie Raman pour le cytochrome CYP106A2.^{27, 31, 32}

2.1 Spectroscopie Raman du complexe CYP106A2/Adx

La Figure 11 montre les spectres Raman du cytochrome CYP106A2, du complexe CYP106A2/Adx WT et de l'Adx WT obtenus avec une excitation à 457 nm. Le spectre d'AdR n'est pas présenté car aucun signal ne se dégage en Raman à cette longueur d'onde d'excitation. Cette absence de signal peut être due à la fluorescence provenant de la flavine, celle-ci absorbant la longueur d'onde excitatrice. La désexcitation de la flavine va entraîner une fluorescence dont l'intensité masque le faible phénomène de diffusion Raman.

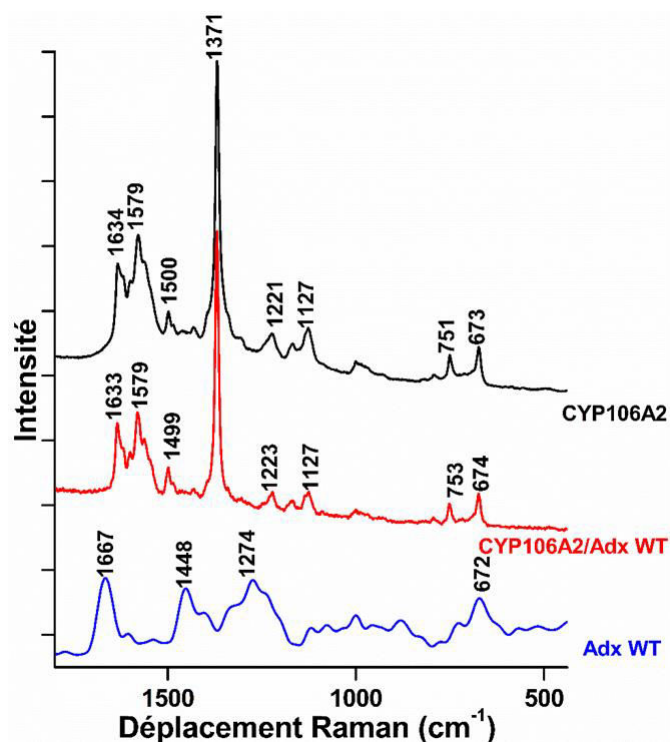


Figure 11 : Spectres Raman du cytochrome CYP106A2, du complexe CYP106A2/Adx WT et d'Adx WT dans la gamme spectrale de 1700 à 450 cm⁻¹ obtenus avec une excitation à 457 nm.

Le spectre du complexe CYP106A2/Adx WT est dominé par le spectre du CYP106A2. Les spectres des différents mutants d'Adx, obtenus avec une excitation à 457 nm, sont représentés dans la Figure S3 en annexe.

Le spectre du complexe n'a pas montré de changements significatifs vis à vis du spectre du cytochrome CYP106A2, ce qui implique que la présence d'Adx n'a pas induit de changement sur les vibrations hémique. La même observation a pu être faite pour les autres complexes représentés sur la Figure 12 ci-dessous.

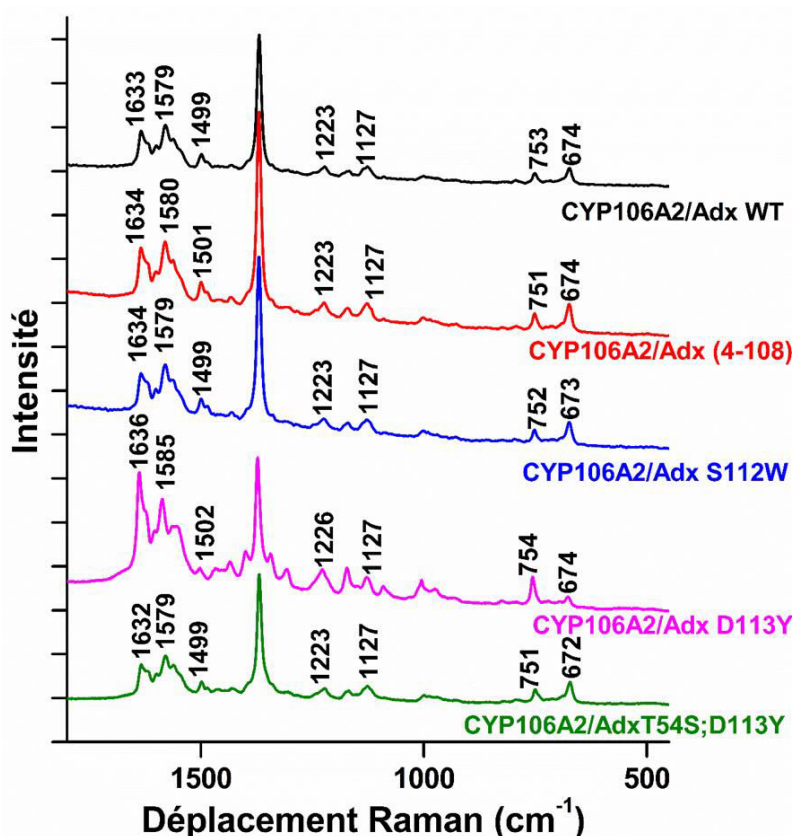


Figure 12 : Spectres Raman des complexes CYP106A2/Adx WT, CYP106A2/Adx (4-108), CYP106A2/Adx S112W, CYP106A2/Adx D113Y et CYP106A2/Adx T54S; D113Y dans la gamme spectrale de 1700 à 450 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 457 nm.

De même à basse fréquence, dans la région spectrale comprise entre 450 et 200 cm^{-1} aucun changement notable n'est observé à l'exception du complexe CYP106A2/Adx T54S; D113Y (Figure 13). En effet, ce complexe présente une bande supplémentaire à 327 cm^{-1} qui est associée aux modes de vibration terminale du cluster Fe-S_4 .

3 – Etude de l'interaction de l'adrénodoxine, de l'adrénodoxine réductase et du cytochrome CYP106A2

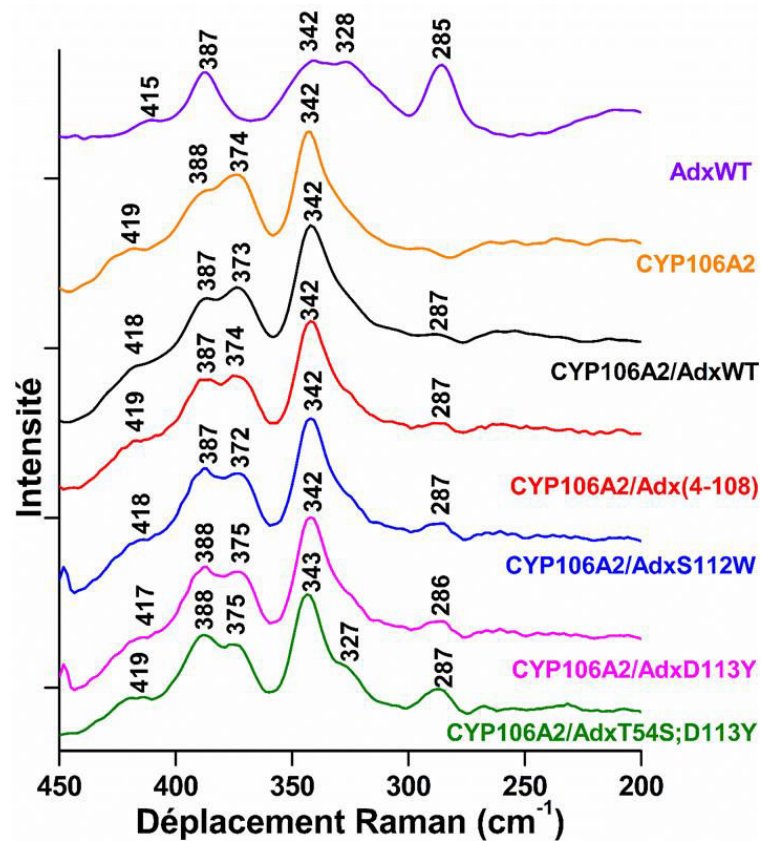


Figure 13 : Spectres Raman de l'AdxWT, du CYP106A2 et des complexes CYP106A2/Adx WT, CYP106A2/Adx (4-108), CYP106A2/Adx S112W, CYP106A2/Adx D113Y et CYP106A2/Adx T54S; D113Y dans la gamme spectrale de 450 à 200 cm^{-1} obtenus avec une excitation à 457 nm.

Comme la structure cristallographique du CYP106A2 n'a pas été résolue, nous nous sommes basés sur la structure cristallographique du cytochrome CYP11A1 pour expliquer l'interaction avec l'Adx comme le montre la Figure 14.

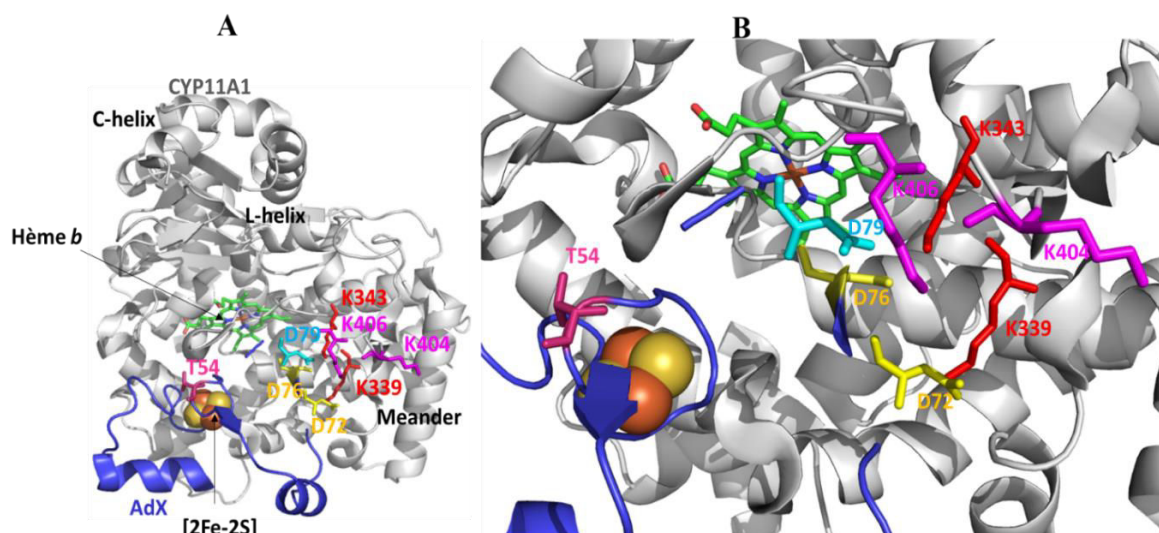


Figure 14 : En (A) structure cristallographique du complexe CYP11A1/Adx code PDB : (3N9Y). En (B) un zoom sur la structure avec les différents acides aminés impliqués dans l'interaction.

Comme précisé précédemment les différents mutants d'Adx, mis en présence du CYP106A2, n'ont pas montré de modification spectrale à l'exception du complexe CYP106A2/AdxT54S; D113Y. Une hypothèse envisageable afin d'expliquer la différenciation du spectre du complexe CYP106A2/AdxT54S; D113Y par rapport aux autres complexes est la proximité de la mutation de l'AdxT54S; D113Y avec le site d'interaction. En effet, l'acide aminé T54 représenté sur la Figure 14 est relativement proche de l'hème, en revanche les mutations des autres Adx étudiés se situent toutes dans des zones éloignées de la zone d'interaction avec l'hème et présentent donc peu de différence vis-à-vis de l'Adx WT.

L'étude d'autres mutations de l'Adx telles que celles des acides aspartiques 76 et 79 (Figure 14) aurait pu permettre de mieux visualiser l'interaction avec CYP106A2. En effet, les travaux de Beckert *et al* ont montré que ces résidus sont cruciaux pour l'interaction avec l'AdR et le CYP11A1³³. De même, Coghlan *et al* ont démontré que la mutation de l'acide aspartique 72 peut provoquer des effets différents au niveau de l'interaction avec la Fd-réductase et le CYP11A1.³⁴

Notons également que nous nous sommes intéressés à la caractérisation par spectroscopie infrarouge différentielle du CYP106A2 et de l'interaction avec l'Adx et l'AdR. Cependant, les spectres obtenus du CYP106A2 se sont avérés non reproductibles ce qui nous a empêchés de continuer cette étude.

3 Conclusion

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont clairement démontré des changements structuraux importants dans le cluster fer-soufre et son environnement dans la protéine Adx WT et dans certains dérivés mutés en interactions avec l'AdR. Ces changements ont été identifiés sur les spectres Raman via l'observation des différences dans les modes de vibrations bridging et terminaux Fe-S_{b/t}. Une réorganisation structurale a eu lieu au niveau des sites d'interaction ainsi qu'à proximité du cluster fer-soufre, ce qui est peut être nécessaire à la mise en place d'un mécanisme de transfert d'électrons efficace. Ce résultat est en lien avec les travaux de Lambeth et *al* qui ont observé une forte diminution de -70 à -100 mV du potentiel d'oxydoréduction pour l'Adx lors de la formation du complexe.^{7,9} La forme tronquée Adx (4-108) ainsi que la mutation du T54S à proximité du cluster fer-soufre ont induit des changements spectraux plus prononcés lors de l'interaction avec l'AdR.

De même, la spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie a montré des changements conformationnels lors de la formation des complexes. Les résultats obtenus ont montré des changements au niveau de la structure secondaire ainsi que dans l'anneau isoalloxazine FAD de l'AdR. D'autres variations de ces modes flavine plus ou moins prononcées ont été observées sur les spectres différentiels en fonction de l'emplacement de la mutation sur l'Adx.

En ce qui concerne le cytochrome CYP106A2, le mode de coordination et l'état de spin ont été déterminés par spectroscopie Raman grâce à la position de certaines bandes caractéristiques. Afin de mieux visualiser l'interaction de ce cytochrome avec les protéines Adx, l'étude de l'effet des mutations des résidus d'acide aminé d'Adx tels que les acides aspartiques 72, 76 et 79 qui se trouvent à proximité du site d'interaction du cytochrome seront nécessaires dans le futur.

4 Références bibliographiques

1. Han, S., Czernuszewicz, R. S., Kimura, T., Adams, M. W. W., and Spiro, T. G. (1989) Fe₂S₂ protein resonance Raman spectra revisited: structural variations among adrenodoxin, ferredoxin, and red paramagnetic protein, *J. Am. Chem. Soc.* *111*, 3505-3511.
2. Yachandra, V. K., Hare, J., Gewirth, A., Czernuszewicz, R. S., Kimura, T., Holm, R. H., and Spiro, T. G. (1983) Resonance Raman spectra of spinach ferredoxin and adrenodoxin and of analog complexes, *J. Am. Chem. Soc.* *105*, 6462-6469.

3. Fu, W., Drozdowski, P. M., Davies, M. D., Sligar, S. G., and Johnson, M. K. (1992) Resonance Raman and magnetic circular dichroism studies of reduced [2Fe-2S] proteins, *J. Biol. Chem.* 267, 15502-15510.
4. Kilpatrick, L. K., Kennedy, M. C., Beinert, H., Czernuszewicz, R. S., Spiro, T. G., and Qiu, D. (1994) Cluster Structure and H-Bonding in Native, Substrate-Bound, and 3Fe Forms of Aconitase as Determined by Resonance Raman Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4053-4061.
5. Mino, Y., Loehr, T. M., Wada, K., Matsubara, H., and Sanders-Loehr, J. (1987) Hydrogen bonding of sulfur ligands in blue copper and iron-sulfur proteins: detection by resonance Raman spectroscopy, *Biochemistry* 26, 8059-8065.
6. Uhlmann, H., Kraft, R., and Bernhardt, R. (1994) C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.* 269, 22557-22564.
7. Lambeth, J. D., Mccaslin, D. R., and Kamin, H. (1976) Adrenodoxin Reductase Adrenodoxin Complex - Catalytic and Thermodynamic Properties, *J. Biol. Chem.* 251, 7545-7550.
8. Lambeth, J. D., Seybert, D. W., and Kamin, H. (1979) Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle, *J. Biol. Chem.* 254, 7255-7264.
9. Lambeth, J. D., Seybert, D. W., and Kamin, H. (1980) Adrenodoxin reductase . adrenodoxin complex. Rapid formation and breakdown of the complex and a slow conformational change in the flavoprotein, *J. Biol. Chem.* 255, 4667-4672.
10. Muller, J. J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., and Heinemann, U. (2001) Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 276, 2786-2789.
11. Shakya, S. K., Gu, W., and Helms, V. (2005) Molecular dynamics simulation of truncated bovine adrenodoxin, *Biopolymers* 78, 9-20.
12. Iwasaki, T., Kounosu, A., Kolling, D. R., Lhee, S., Crofts, A. R., Dikanov, S. A., Uchiyama, T., Kumasaka, T., Ishikawa, H., Kono, M., Imai, T., and Urushiyama, A. (2006) Resonance Raman characterization of archaeal and bacterial Rieske protein variants with modified hydrogen bond network around the [2Fe-2S] center, *Protein Sci.* 15, 2019-2024.
13. Muller, A., Muller, J. J., Muller, Y. A., Uhlmann, H., Bernhardt, R., and Heinemann, U. (1998) New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108), *Structure* 6, 269-280.
14. Argade, P. V., Sassardi, M., Rousseau, D. L., Inubushi, T., Ikeda-Saito, M., and Lapidot, A. (1984) Confirmation of the assignment of the iron-histidine stretching mode in myoglobin, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 6593-6596.
15. Willis, L. J., and Loehr, T. M. (1985) Resonance Raman studies of the flavin and iron-sulfur centers of milk xanthine oxidase, *Biochemistry* 24, 2768-2772.
16. Schiffler, B., Zollner, A., and Bernhardt, R. (2004) Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study, *J. Biol. Chem.* 279, 34269-34276.
17. Ewen, K. M., Kleser, M., and Bernhardt, R. (2011) Adrenodoxin: the archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins, *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 111-125.

18. Schiffler, B., Zollner, A., and Bernhardt, R. (2011) Kinetic and optical biosensor study of adrenodoxin mutant AdxS112W displaying an enhanced interaction towards the cholesterol side chain cleavage enzyme (CYP11A1), *Eur. Biophys. J.* 40, 1275-1282.
19. El Khoury, Y., and Hellwig, P. (2011) A Combined Far-Infrared Spectroscopic and Electrochemical Approach for the Study of Iron–Sulfur Proteins, *Chemphyschem* 12, 2669-2674.
20. Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mantele, W., and Friedrich, T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain, *Biochemistry* 39, 10884-10891.
21. Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., and Mantele, W. (1996) Carboxyl group protonation upon reduction of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett.* 385, 53-57.
22. Wolpert, M., and Hellwig, P. (2006) Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500 cm⁻¹, *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 64, 987-1001.
23. Barth, A., and Zscherp, C. (2002) What vibrations tell about proteins, *Q. Rev. Biophys.* 35, 369-430.
24. Wille, G., Ritter, M., Friedemann, R., Mantele, W., and Hubner, G. (2003) Redox-triggered FTIR difference spectra of FAD in aqueous solution and bound to flavoproteins, *Biochemistry* 42, 14814-14821.
25. Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H. W., and Bernhardt, R. (2001) The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450(scc)) and CYP11B1 (cytochrome P450(11 beta)) - Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin, *J. Biol. Chem.* 276, 36225-36232.
26. Bichet, A., Hannemann, F., Rekowski, M., and Bernhardt, R. (2007) A new application of the yeast two-hybrid system in protein engineering, *Protein Eng. Des. Sel.* 20, 117-123.
27. Spiro, T. G. (1983) Heme Protein-Structure and Dynamics, Studied by Resonance Raman-Spectroscopy, *Abstr Pap Am Chem S* 185, 215-INOR.
28. Denisov, I. G., and Sligar, S. G. (2010) Cytochrome P450 Enzymes, In *Heme Proteins* (Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guillard, R., Eds.), pp 165-192, World Scientific Publishing, Singapore.
29. Jordan, T., Eads, J. C., and Spiro, T. G. (1995) Secondary and tertiary structure of the A-state of cytochrome c from resonance Raman spectroscopy, *Protein Sci.* 4, 716-728.
30. Sato, A., Sasakura, Y., Sugiyama, S., Sagami, I., Shimizu, T., Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2002) Stationary and time-resolved resonance Raman spectra of His77 and Met95 mutants of the isolated heme domain of a direct oxygen sensor from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 277, 32650-32658.
31. Smulevich, G., Hu, S., Rodgers, K. R., Goodin, D. B., Smith, K. M., and Spiro, T. G. (1998) Heme-protein interactions in cytochrome c peroxidase revealed by site-directed mutagenesis and resonance Raman spectra of isotopically labeled hemes, *Biospectroscopy* 2, 365-376.

32. Mak, P. J., Kaluka, D., Manyumwa, M. E., Zhang, H. Q., Deng, T. J., and Kincaid, J. R. (2008) Defining resonance Raman spectral responses to substrate binding by cytochrome P450 from *Pseudomonas putida*, *Biopolymers* 89, 1045-1053.
33. Beckert, V., and Bernhardt, R. (1997) Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes P450_{scc} and P450_{11 beta}, *J. Biol. Chem.* 272, 4883-4888.
34. Coghlan, V. M., and Vickery, L. E. (1991) Site-Specific Mutations in Human Ferredoxin That Affect Binding to Ferredoxin Reductase and Cytochrome-P450_{scc}, *J. Biol. Chem.* 266, 18606-18612.

4 - INTERACTION DE LA PDZ AVEC DES PEPTIDES VIRAUX

Liste des figures

Figure 1 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4 et PDZ3-4 de la protéine Scribble dans l'infrarouge moyen.....	99
Figure 2 : Déconvolution spectrale du massif amide I en 5 bandes de profil Gaussien de la PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et PDZ1.	100
Figure 3 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4 et PDZ3-4 de la protéine Scribble dans l'infrarouge lointain.	102
Figure 4 : Spectres Raman des domaines PDZ3, PDZ4 et PDZ 3-4 de la protéine Scribble obtenus avec une excitation à 514 nm.....	103
Figure 5 : Spectres FTIR-ATR du HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 dans l' infrarouge moyen à gauche et à droite dans l'infrarouge lointain.	105
Figure 6 : Spectres Raman des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 obtenus avec une excitation à 514 nm.	107
Figure 7 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et des complexes PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HPV16E6L, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HPV16E6L dans l'infrarouge moyen.	109
Figure 8 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et des complexes PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HPV16E6L, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6Vet PDZ3-4/HPV16E6L dans l'infrarouge lointain.	112
Figure 9 : Spectres Raman des complexes PDZ3/HPV16E6L, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6L, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax1obtenus avec une excitation à 514 nm.....	113

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pourcentages des structures secondaires des PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et PDZ1 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I. Pour comparaison les pourcentages de la PDZ1 sont également inclus.	101
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des attributions des bandes Raman de la PDZ3, PDZ4, et PDZ3-4. Les différentes valeurs sont données en cm^{-1}	104

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

Tableau 3 : Pourcentages des structures secondaires des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I. 106

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des attributions des bandes des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1. Les différentes valeurs sont données en cm^{-1} 108

Tableau 5 : Composition des structures secondaire des complexes PDZ3/HPV16E6L, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6L, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax1 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I..... 110

Introduction

Les domaines PDZ se lient à des motifs spécifiques de la partie C terminale du peptide, qui comprennent quatre à cinq résidus d'acides aminés. Ces domaines PDZ sont souvent les cibles des peptides issus des protéines virales telles celles du papillomavirus humain (HPV) et du virus T-lymphotrope humain de type1 (HTLV1 Tax1) entraînant une perturbation des processus cellulaires au profit du cycle de vie virale. Ces dernières se lient spécifiquement aux domaines PDZ et favorisent la dégradation de plusieurs membres de la famille PDZ contribuant à la perte de la polarité cellulaire et à l'inhibition de contact entre cellules voisines.

L'étude de l'interaction entre les domaines PDZ et les peptides viraux présente donc un intérêt majeur et permet de fournir des informations importantes dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques antivirales.

Au cours de ces dernières années, les interactions entre les domaines PDZ et les protéines virales ont fait l'objet de nombreux travaux exploitant différentes techniques d'analyses comme décrit précédemment dans l'introduction.

Dans ce chapitre, mon projet de thèse s'est articulé autour de l'interaction des domaines PDZ 3, 4 et PDZ3-4 issus de la protéine Scribble humaine (hScrib) avec deux peptides viraux : le papillomavirus HPV16E6L/V et le T-lymphotrope humain de type1 (HTLV1 Tax1).

L'objectif de ce travail est d'avoir une estimation de la structure et de suivre les changements structuraux induits au niveau de la structure secondaire et tertiaire de ces divers domaines PDZ et peptides, ainsi que d'étudier l'interaction de ces derniers par spectroscopie infrarouge en mode réflexion totale atténuée (ATR) et Raman.

1 Structure des domaines PDZ de la protéine Scribble

1.1 Spectres infrarouge

Les PDZ étudiées ont été produites et marquées avec ^{15}N par le Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire équipe Oncoprotéines, à l'université de Strasbourg. Le marquage a permis de vérifier leur stabilité par RMN.

Comme la bande amide I est constituée à 80% des vibrations d'élongation (C=O), cette dernière sera légèrement influencée par le marquage isotopique avec ^{15}N . En revanche, la bande amide II composée majoritairement à 60% des vibrations de déformation (N-H) sera beaucoup plus impliquée par ce marquage. En effet, ceci est en accord avec les travaux de Noguchi *et al* réalisés sur un système complexe nommé le photosystème II issu du *Thermosynechococcus elongatus* marqué avec ^{15}N . Les résultats obtenus ont montré que la bande amide I a été légèrement décalée de 1 cm^{-1} vers des basses fréquences en raison du faible couplage avec les vibrations de déformation (N-H), alors qu'amide II a montré un déplacement important de 14 cm^{-1} vers les basses fréquences.¹

Lors de notre étude deux gammes spectrales ont été étudiées, l'infrarouge moyen compris entre 1800 et 1360 cm^{-1} et l'infrarouge lointain situé entre 600 et 50 cm^{-1} . La Figure 1 présente les spectres infrarouge en mode ATR des domaines PDZ3, PDZ4 et du tandem PDZ3-4 issue de la protéine Scribble.

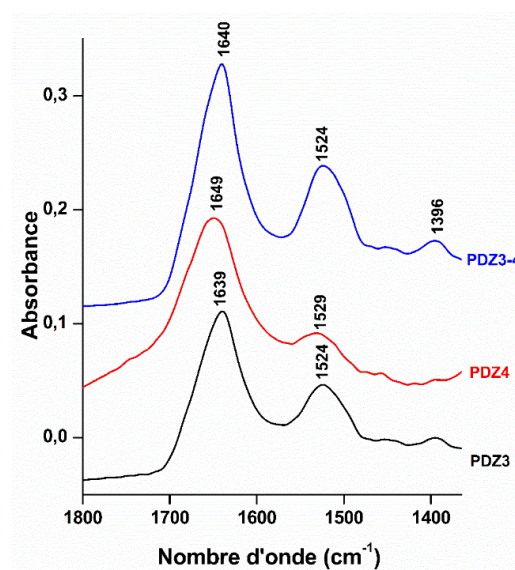


Figure 1 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4 et PDZ3-4 de la protéine Scribble dans l'infrarouge moyen.

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

Ces spectres montrent deux bandes principales : une première située entre 1639 et 1649 cm^{-1} , attribuée aux vibrations d'élongations ν (C=O) de la bande amide I et une deuxième située entre 1524 et 1529 cm^{-1} qui est associée aux vibrations de déformation δ (N-H) et d'élongation ν (C-N) de la bande amide II.² La bande située à 1396 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation (O=C-N) de la bande amide III ainsi que d'autres résidus d'acides aminés.³

Comme la structure cristallographique de la PDZ3 n'est pas encore résolue et que peu d'informations concernant les PDZ3, 4 et 3-4 du Scribble existent dans la littérature, la PDZ1 de MAGI-1 va nous servir de modèle de comparaison, car la structure cristallographique de cette protéine est résolue et beaucoup d'informations notamment en RMN concernant sa caractérisation sont disponibles dans la littérature.

Afin d'obtenir une estimation de la structure secondaire des différents domaines PDZ étudiés les déconvolutions des bandes amide I des différentes PDZ ont été effectuées et sont représentées dans la Figure 2 ci-dessous.

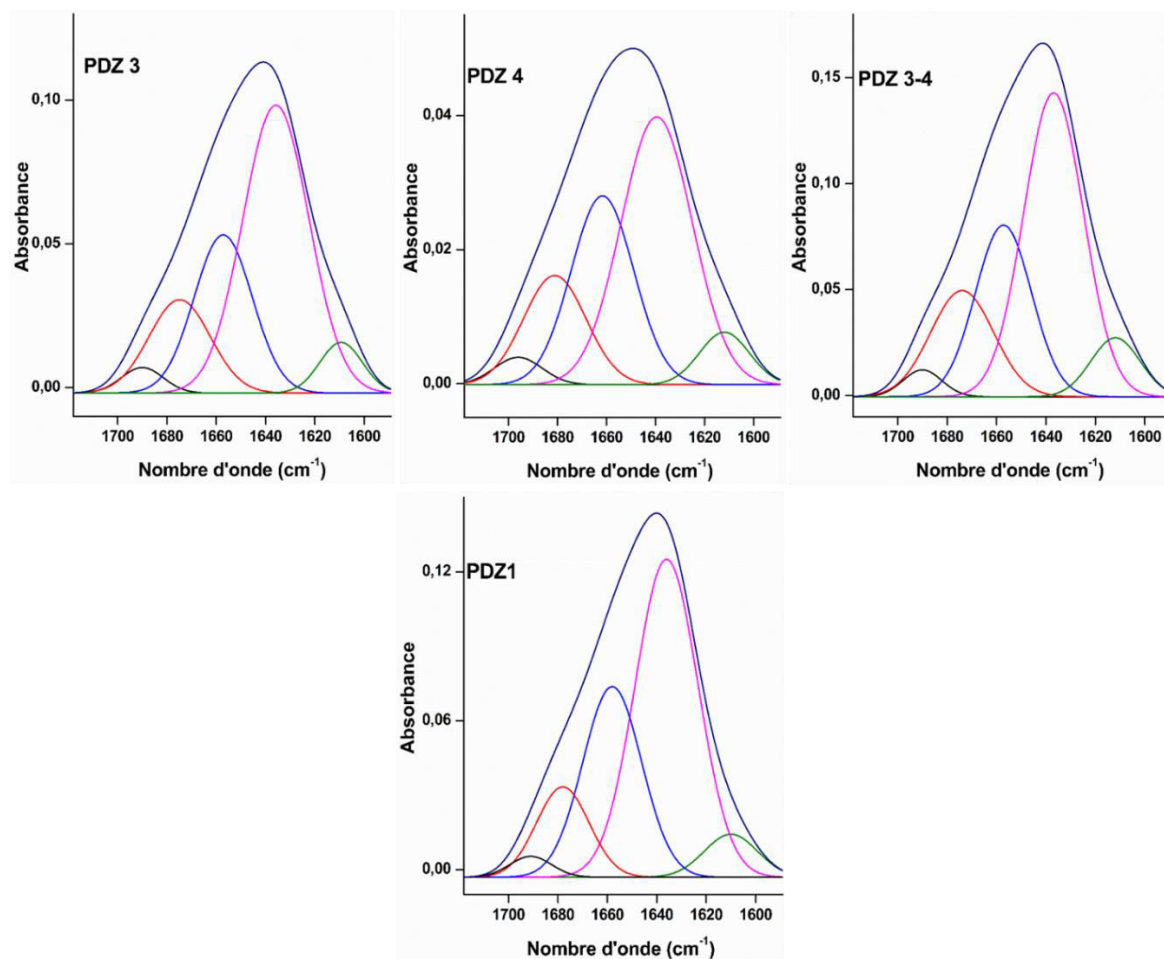


Figure 2 : Déconvolution spectrale du massif amide I en 5 bandes de profil Gaussien de la PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et PDZ1.

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

La bande amide I, centrée entre 1640-1649 cm^{-1} , correspond à la somme de plusieurs contributions. Cinq bandes situées à 1690, 1674, 1657, 1636 et 1612 cm^{-1} ont été utilisées pour décomposer la bande amide I dans la gamme spectrale étudiée. Ces composantes sont attribuées aux groupements peptidiques impliqués dans différents éléments de structures secondaires^{4 5-7}.

Le Tableau 1 détaille l'attribution des différentes bandes contenues dans le massif amide I des quatre PDZ et donne le pourcentage de groupements peptidiques impliqués dans chaque structure secondaire.

Structure secondaire	Position d'amide I et pourcentage estimé (%)			
	PDZ 3	PDZ 4	PDZ 3-4	PDZ 1
Hélices α + structures désordonnées	1657 (25%)	1661 (28%)	1657 (25%)	1658 (29%)
Feuillets- β parallèles	1636 (51%)	1639 (46%)	1637 (47%)	1636 (51%)
Feuillets- β antiparallèles	1690 + 1609 (9%)	1696 + 1612 (9%)	1690 + 1612 (10%)	1691 + 1610 (8%)
β - coudes	1674 (15%)	1681 (17%)	1674 (18%)	1674 (12%)

Tableau 1 : Pourcentages des structures secondaires des PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et PDZ1 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I. Pour comparaison les pourcentages de la PDZ1 sont également inclus.

Les résultats obtenus ont montré des pourcentages de structure identiques à ceux de la PDZ1. La structure secondaire majoritaire de ces quatre PDZ est composée de feuillets β parallèles, les autres structures ont des pourcentages presque identiques. Nos résultats sont en désaccord avec les mesures réalisées en dichroïsme circulaire par le Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire équipe oncoprotéines à l'université de Strasbourg sur la PDZ1 MAGI-1 qui ont déterminé un taux de structure composé de 14 ± 2 % d'hélices α et 32 ± 2 % de feuillets β (résultats non publié). Une des raisons possible de cette différence entre nos résultats est l'instabilité de ces protéines qui se dégradent rapidement. La précision de la déconvolution pourrait être également à l'origine des différences observées.

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

La deuxième gamme spectrale étudiée est le lointain infrarouge. Les spectres présentés ci-dessous dans la Figure 3 présentent trois bandes principales: la bande située à 526- 531 cm^{-1} est attribuée à la bande amide VI qui découle de plusieurs vibrations incluant les vibrations de déformation δ (C=O), les vibrations hors du plan et à l'intérieur du plan du groupement COHN ainsi que d'une faible contribution des vibrations de déformation δ (C-C-N).⁸ La bande située à 418 cm^{-1} peut être associée entre autre aux modes de vibrations δ (N-C α -C β) des résidus d'acides aminés alanines et δ (C β -C γ -C) de la leucine ainsi que d'autres bandes de combinaisons.⁹ Enfin, la bande intense à 165 cm^{-1} correspond aux vibrations des modes collectifs des liaisons hydrogène.¹⁰

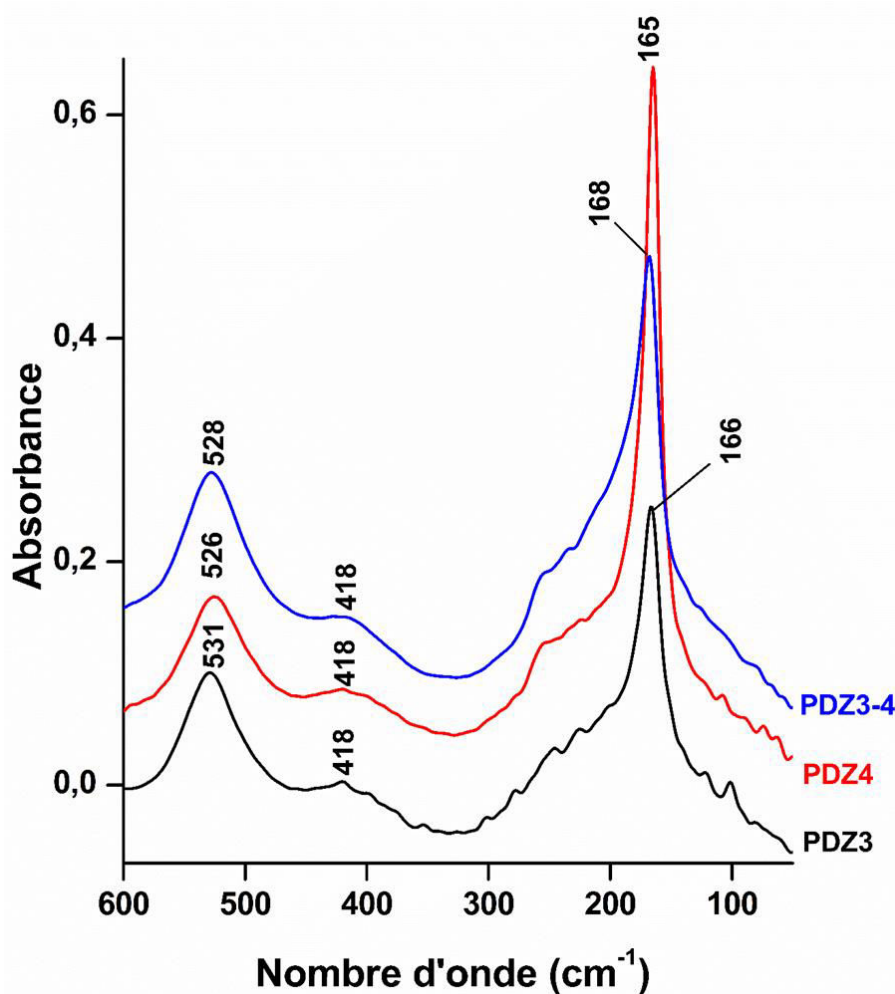


Figure 3 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4 et PDZ3-4 de la protéine Scribble dans l'infrarouge lointain.

1.2 Spectres Raman

Ces protéines ont également été caractérisées par spectroscopie Raman comme le montre la Figure 4.

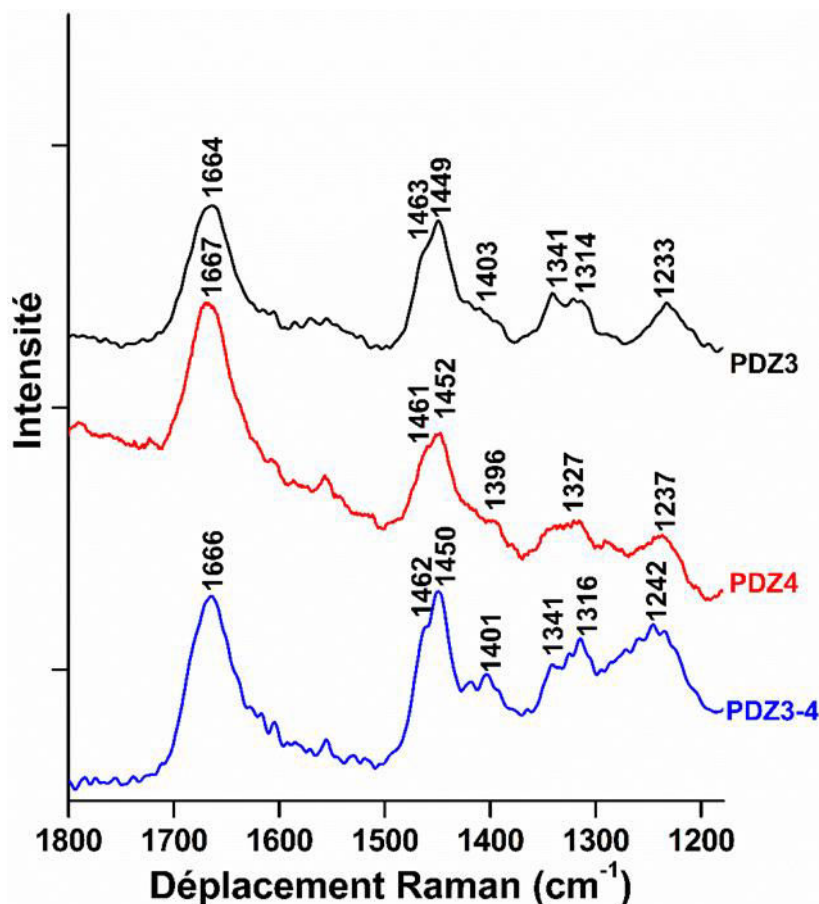


Figure 4 : Spectres Raman des domaines PDZ3, PDZ4 et PDZ 3-4 de la protéine Scribble obtenus avec une excitation à 514 nm.

Ces spectres présentent trois régions principales : la première nommée amide I est associée à la bande intense à 1664-1667 cm^{-1} , la deuxième région située entre 1500 et 1300 cm^{-1} est attribuée aux vibrations des différents résidus d'acides aminés comme l'histidine, l'arginine et l'isoleucine et la région entre 1300 et 1200 cm^{-1} correspond à la bande amide III. Le Tableau 2 regroupe les attributions des différents modes de vibrations des PDZ étudiées. Ces attributions sont basées sur les travaux réalisés par différents groupes sur les acides aminés ainsi que d'autres protéines.¹¹⁻¹⁵

PDZ 3	PDZ 4	PDZ3-4	Tentative d'attribution
1664	1667	1666	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
1463	1461	1462	$\nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH}_3)$, Rocking ($\text{C}\beta$) ^{as} alanine
1449	1452	1450	$\delta(\text{CH}_2)$, ($\text{C}\delta$) ^{as} , ($\text{C}\gamma 1$) ^{as} isoleucine
1403	1396	1401	$\nu(\text{CH}-\text{COO}^-)$ ^s , $\text{C}\beta$ -rock, $\text{Nt}-\text{C}\alpha-\text{H}\alpha$ arginine
1341-1314	1327	1341-1316	$\text{C}\beta-\text{C}\alpha-\text{H}\alpha$ arginine + $\nu(\text{C}=\text{N})$ histidine, $\delta(\text{CH}_2)$, Amide III $\delta(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$, $\delta(\text{C}\alpha-\text{H})$, $\nu(\text{C}\alpha-\text{C})$
1233	1237	1242	Amide III $\delta(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$, $\delta(\text{C}\alpha-\text{H})$, $\nu(\text{C}\alpha-\text{C})$ + $\nu(=\text{C}-\text{N})$ histidine

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des attributions des bandes Raman de la PDZ3, PDZ4, et PDZ3-4. Les différentes valeurs sont données en cm^{-1} .¹¹⁻¹⁵

2 Structure des peptides HPV16E6L/V et HTLV1 Tax1

2.1 Spectres Infrarouge

Deux gammes spectrales ont été étudiées, l'infrarouge moyen entre 1800 et 1360 cm^{-1} et l'infrarouge lointain entre 600 et 50 cm^{-1} .

Deux peptides issus du papillomavirus humain ont été caractérisés, le HPV16E6 (RSSRTRRETQL) qui correspond à la forme Wild type et le (RSSRTRRETQV) représentant la forme mutée. Ces peptides correspondent aux 11 résidus d'acides aminés qui sont localisés dans la partie C-terminale du HPV16E6. Un autre peptide étudié est le HTLV1 Tax1 issu du virus T-lymphotrope humain. La partie C-terminale de ce peptide est composée de 10 résidus d'acides aminés (SEKHFRETEV).

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

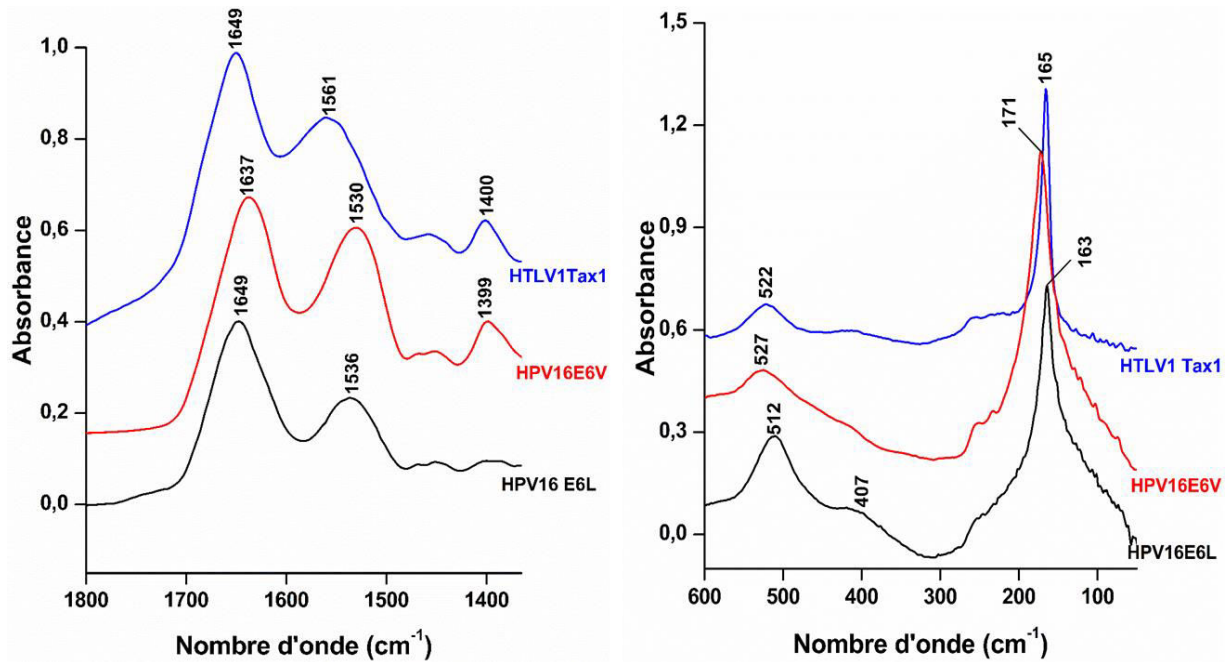


Figure 5 : Spectres FTIR-ATR du HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 dans l'infrarouge moyen à gauche et à droite dans l'infrarouge lointain.

Les spectres d'absorption des peptides sont présentés sur la Figure 5. Le changement d'un seul résidu d'acide aminé peut avoir un impact sur la structure secondaire ainsi que sur l'interaction avec les domaines PDZ. En effet, la mutation du HPV16E6 a induit un décalage de 12 cm^{-1} de la bande amide I vers des basses fréquences de 1649 à 1637 cm^{-1} . Pour le peptide HTLV1 Tax1, la bande amide I se retrouve à 1649 cm^{-1} . De même, un décalage de 6 cm^{-1} de la bande amide II située à 1530 cm^{-1} a été observé dans le cas du mutant. Cette bande se retrouve à 1561 cm^{-1} pour le HTLV1 Tax1 et a un profil spectral différent comparé à celui de HPV16E6. La déconvolution spectrale de la bande amide I de ces peptides a également été établie afin d'obtenir une estimation de la structure secondaire (Tableau 3 et Figure S4 en annexe).

Structure secondaire	Position d'amide I et pourcentage estimé (%)		
	HPV16E6L	HPV16E6V	HTLV1 Tax 1
Hélices α + Structures désordonnées	1660 (28%)	1655 (22%)	1654 (43%)
Feuillets- β parallèles	1640 (42%)	1635 (50%)	1637 (24%)
Feuillets- β antiparallèles	1687 + 1617 (20%)	1687 + 1616 (16%)	1688 + 1618 (15%)
β - coudes	1674 (10%)	1671 (12%)	1672 (18%)

Tableau 3 : Pourcentages des structures secondaires des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I.

La principale variation observée au niveau de la structure secondaire du peptide HPV16E6V, comparé au peptide HPV16E6L, est l'augmentation du pourcentage des feuillets β parallèles (+ 8%) au détriment des groupements peptidiques impliqués dans les structures hélices α plus structures désordonnées (- 6%). Par ailleurs, les autres structures ont des pourcentages presque identiques.

Le peptide HTLV1 Tax1 a un comportement structural différent, il est majoritairement structuré en hélices α plus désordonnées avec un taux de structure de 43%. A l'heure actuelle, les structures secondaires de ces peptides ne sont pas encore déterminées dans la littérature par une autre méthode spectroscopique telle que le dichroïsme circulaire ce qui ne nous permet pas de comparer nos résultats.

Dans la deuxième gamme spectrale étudiée du l'infrarouge lointain, des différences au niveau de la bande amide VI sont observées lors de la comparaison des peptides HPV16E6L et HPV16E6V (Figure 5). En effet, la bande située à 512 cm^{-1} sur le spectre de HPV16E6L est décalée de 15 cm^{-1} et se retrouve à 527 cm^{-1} sur le spectre du peptide muté HPV16E6V. De même, la bande associée aux vibrations des modes collectifs des liaisons hydrogène de ces deux peptides a montré un décalage de 8 cm^{-1} . Ces changements observés au niveau de la structure tertiaire sont en accord avec les changements observés au niveau de la structure secondaire. Le peptide HTLV1 Tax1, présente une bande amide VI à 522 cm^{-1} et une bande qui correspond aux vibrations des modes collectifs des liaisons hydrogène à 165 cm^{-1} .

2.2 Spectres Raman

La Figure 6 présente les spectres Raman des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1.

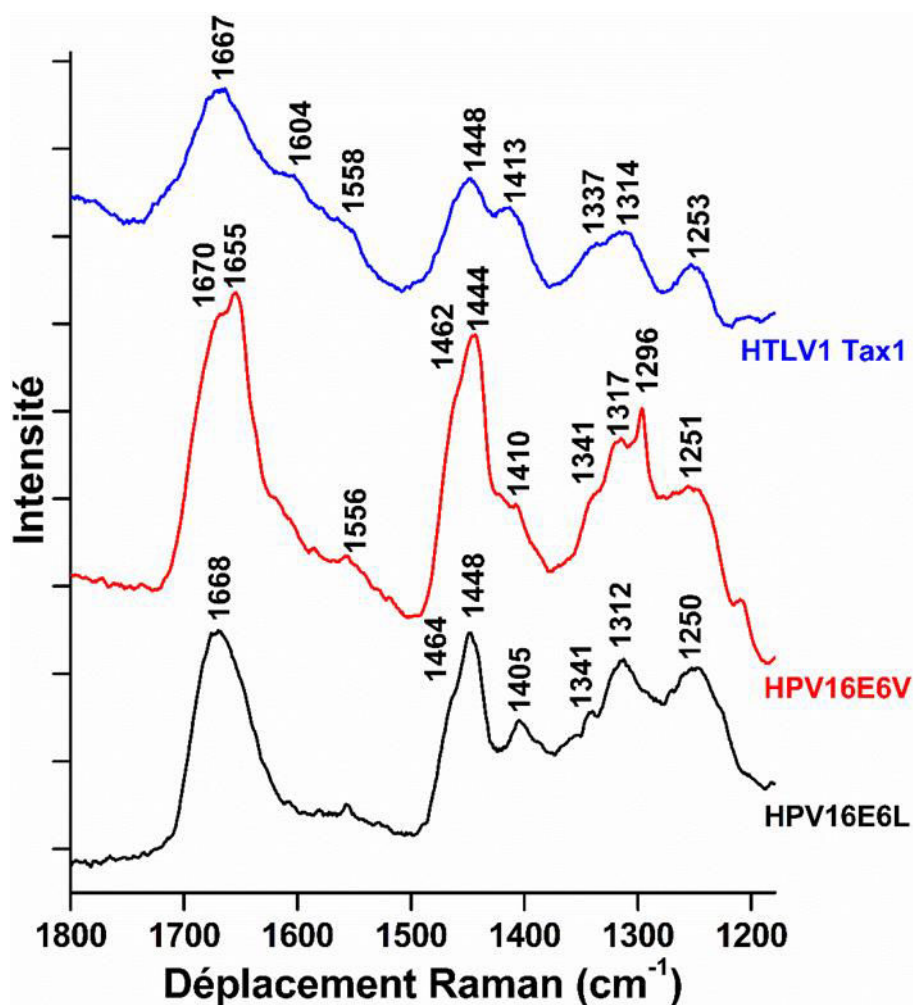


Figure 6 : Spectres Raman des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 obtenus avec une excitation à 514 nm.

Les deux peptides issus du HPV16E6 ont montré des différences notables dans les régions amide I, II et III. La bande amide I du HPV16E6L est située à 1668 cm^{-1} . Cette dernière se retrouve à 1655 cm^{-1} sur le spectre du HPV16E6V avec la présence d'un épaulement à 1670 cm^{-1} qui correspond également au mode amide I. La bande large à 1556 cm^{-1} sur le spectre du HPV16E6V est attribuée à la bande amide II, cette dernière n'est pas observable sur le spectre du HPV16E6L. La région amide III a montré des différences entre ces deux peptides, surtout par l'apparition d'une bande à 1296 cm^{-1} sur le spectre du HPV16E6V.

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

Le HTLV1 Tax1 a une bande large située entre 1667 et 1604 cm^{-1} attribuée aux vibrations de la bande amide I. L'épaule à 1558 cm^{-1} est associée à la bande amide II. Le Tableau 4 regroupe les attributions des bandes présentes sur la figure ci-dessus.^{11-14, 16}

HPV16E6L	HPV16E6V	HTLV1 Tax1	Tentative d'attribution
1668	1670-1655	1667-1604	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
/	1556	1558	Amide II $\nu(\text{C}-\text{N}), \delta(\text{N}-\text{H})$
1464	1462	/	$\nu(\text{CH}_2), \nu(\text{CH}_3)$
1448	1444	1448	$\delta(\text{CH}_2)$ arginine, C_β -bend lysine
1405	1410	1413	$\nu(\text{CH}-\text{COO}^-)^s, \text{C}_\beta$ -rock, $\text{Nt-C}_\alpha\text{-H}_\alpha$ arginine et lysine, ν ring, $\delta(\text{C}-\text{H})$ phenylalanine
1341-1312	1341-1317	1337-1314	$\text{C}_\beta\text{-C}_\alpha\text{-H}_\alpha$ arginine + $\nu(\text{C}=\text{N})$ histidine, $\delta(\text{CH}_2)$, Amide III $\delta(\text{N}-\text{H}), \nu(\text{C}-\text{N}), \nu(\text{C}_\alpha\text{-C}), \nu$ ring phenylalanine, C_β -twist arginine, $\nu(\text{C}_i\text{OO}^-)^s$
/	1296	/	Amide III $\delta(\text{N}-\text{H}), \nu(\text{C}-\text{N}), \delta(\text{C}_\alpha\text{-H}), \nu(\text{C}_\alpha\text{-C})$
1250	1251	1253	Amide III $\delta(\text{N}-\text{H}), \nu(\text{C}-\text{N}), \delta(\text{C}_\alpha\text{-H}), \nu(\text{C}_\alpha\text{-C})$

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des attributions des bandes des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1. Les différentes valeurs sont données en cm^{-1} .^{11-14, 16}

3 Structure des complexes PDZ en interaction avec les peptides viraux

3.1 Spectres infrarouge

Afin d'examiner l'interaction des domaines PDZ avec les peptides viraux deux gammes spectrales ont été étudiées, l'infrarouge moyen entre 1800 et 1360 cm^{-1} et l'infrarouge lointain entre 600 et 50 cm^{-1} (Figure 7).

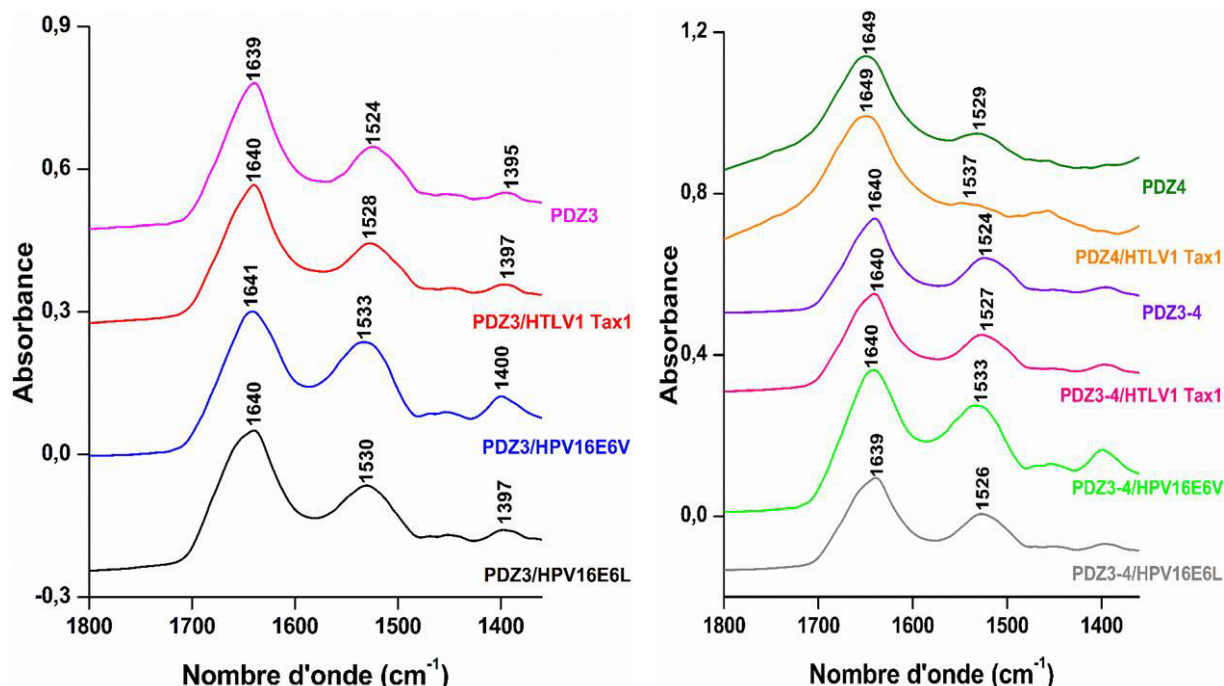


Figure 7 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et des complexes PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HPV16E6L, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HPV16E6L dans l'infrarouge moyen.

L'interaction des PDZ avec les différents peptides a induit des changements au niveau des structures secondaire et tertiaire. La forme des spectres varie de plus légèrement en fonction du complexe étudié. Pour mieux visualiser ces changements, la déconvolution de la bande amide I de ces sept complexes a été établie (Tableau 5 et Figure S5 en annexe).

Position d'amide I et pourcentage estimé (%)				
Complexes	Hélices α + structures désordonnées	Feuillets-β parallèles	Feuillets-β antiparallèles	β-coudes
PDZ3/HPV16E6L	1658 (33%)	1636 (39%)	1690 + 1613 (13%)	1677 (15%)
PDZ3/HPV16E6V	1658 (32%)	1640 (36%)	1691 + 1619 (18%)	1676 (14%)
PDZ3/HTLV1 Tax1	1661 (18%)	1639 (53%)	1690 + 1614 (17%)	1676 (12%)
PDZ4/HTLV1 Tax1	1661 (37%)	1637 (41%)	1696 + 1608 (9%)	1680 (13%)
PDZ3- 4/HPV16E6L	1658 (33%)	1636 (43%)	1687 + 1613 (15%)	1677 (9%)
PDZ3- 4/HPV16E6V	1658 (23%)	1640 (45%)	1692 + 1618 (16%)	1676 (16%)
PDZ3- 4/HTLV1Tax1	1658 (29%)	1637 (46%)	1696 + 1611 (11%)	1679 (14%)

Tableau 5 : Composition des structures secondaire des complexes PDZ3/HPV16E6L, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6L, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax1 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I.

Les différents complexes étudiés ont une structure secondaire dont les composantes majoritaire sont les feuillets β parallèles (36 à 53%). Les deux complexes PDZ3/HPV16E6L et PDZ3/HPV16E6V ont des taux de structure presque identiques. Lors de la formation de ces complexes, on peut noter une augmentation du pourcentage des hélices α plus structures désordonnées de (+ 7 et + 8%) au détriment des groupements peptidiques impliqués dans les structures des feuillets β parallèles (- 12 et - 15%) en comparaison avec la PDZ3 seule (Tableau 1). Une variation de (+ 9%) des feuillets β antiparallèles a également été observée en comparaison avec les pourcentages de la PDZ3 seule. L'interaction de la PDZ3 avec le HTLV1 Tax1 présente une tendance inverse avec une diminution du pourcentage des hélices α plus structures désordonnées (- 7%) au bénéfice des groupements peptidiques impliqués dans les structures des feuillets β parallèles et antiparallèles (+ 2 et + 8% respectivement) en

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

comparaison avec la PDZ3 seule (Tableau 1). Par ailleurs, aucune variation significative n'est observée dans le pourcentage des structures des β coudes.

Luck *et al* ont démontré par des mesures réalisées en résonance plasmonique de surface (SPR), que seul le peptide HTLV1 Tax1 parmi toute une série de peptides étudiés interagit avec les domaines PDZ issus de (MAGI 1-2, MAGI 1-3, Scrib-3, Scrib-4 et Scrib-34).¹⁷ Il a été décrit précédemment que la PDZ3 issue de la protéine Scribble, a une forte affinité pour le peptide HPV16E6L comparé au HPV16E6V. En revanche, MAGI 1-2 se lie fortement au HPV16E6V. Ces différences de « préférence » pour les acides aminés qui sont situés à la position p_0 , site où la mutation a eu lieu, pourraient être en corrélation avec les variations des acides aminés dans la boucle GLGF des domaines PDZ. En effet, la boucle GLGF de la PDZ3 Scribble est occupée par deux résidus d'acide aminé hydrophobes leucine qui sont plus grands que les valines, ceci pourrait contribuer à l'obtention d'une poche beaucoup plus grande et expliquera sa préférence pour la leucine.¹⁷ Or nos résultats ont montré des changements presque identiques dans la structure secondaire des deux complexes PDZ3/HPV16E6L et PDZ3/HPV16E6V et moins de changements dans le complexe PDZ3/HTLV1 Tax 1 comparé au pourcentage de structure de la protéine PDZ3 seule.

Le complexe PDZ4/HTLV1 Tax1 a montré une augmentation de 9% du taux de structure hélices α plus structures désordonnées au détriment des feuilletts β parallèles (-5%) comparé aux pourcentages de la structure secondaire de la PDZ4 seule (Tableau 1). Il a été reporté dans la littérature que la PDZ4 issue de la protéine Scribble, interagit uniquement avec le peptide HTLV1 Tax 1. La structure de la PDZ4 Scribble, a montré que cette protéine possède une surface chargée positivement en particulier autour de la poche de la liaison peptidique comparée à la PDZ3 et la PDZ3-4. De plus, dans la boucle GLGF de la PDZ4 Scribble, le premier résidu d'acide aminé, la glycine, a été remplacée par un résidu volumineux, l'arginine. Cet encombrement stérique pourrait empêcher la liaison d'un peptide présentant une grande chaîne latérale hydrophobe à la position p_0 . Ces deux contraintes de taille et de charge peuvent imposer des propriétés de séquence qui sont uniquement trouvés dans le peptide HTLV1 Tax 1.¹⁷

En ce qui concerne la PDZ3-4, la principale variation observée est au niveau du complexe PDZ3-4/HPV16E6L. L'interaction de cette protéine avec le peptide HPV16E6L a induit une augmentation des hélices α plus structures désordonnée (+ 8%) au détriment des β coudes (- 9%) comparée à la structure secondaire de la PDZ3-4 seule (Tableau 1). Par ailleurs, une légère variation est observée pour le pourcentage de structure des feuilletts β parallèles (- 4%).

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

Ce complexe a montré un comportement structural différent comparé aux autres complexes cités ci-dessus. Les complexes PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax 1, ont présenté peu de variation de taux de structure.

Luck *et al* ont montré que le tandem PDZ3-4 se lie à plusieurs peptides avec une affinité beaucoup plus grande comparé à la PDZ3 et PDZ4 seules. De plus la boucle β_2 - β_3 des différents domaines PDZ montre des effets très différents sur l'affinité et la spécificité de la liaison peptidique¹⁷.

En résumé, les spectres FTIR-ATR des différents complexes nous ont permis d'estimer la structure secondaire de ces derniers ainsi que de voir les changements conformationnels lors de la formation de ces complexes. Cependant, à notre connaissance il n'existe pas d'étude dans la littérature sur la détermination de la structure secondaire des domaines PDZ et les complexes caractérisés au cours de cette thèse.

En plus de la bande amide I, la bande amide II a également montré des changements avec un déplacement des bandes de 2 à 9 cm^{-1} vers des fréquences plus élevées pour les différents complexes étudiés. En effet, cette bande est sensible aux changements qui se produisent au niveau de la structure secondaire.

A côté des changements conformationnels observés au niveau de la structure secondaire, la structure tertiaire a également montré des changements au niveau de la bande amide VI et des modes collectifs des liaisons hydrogène (Figure 8).

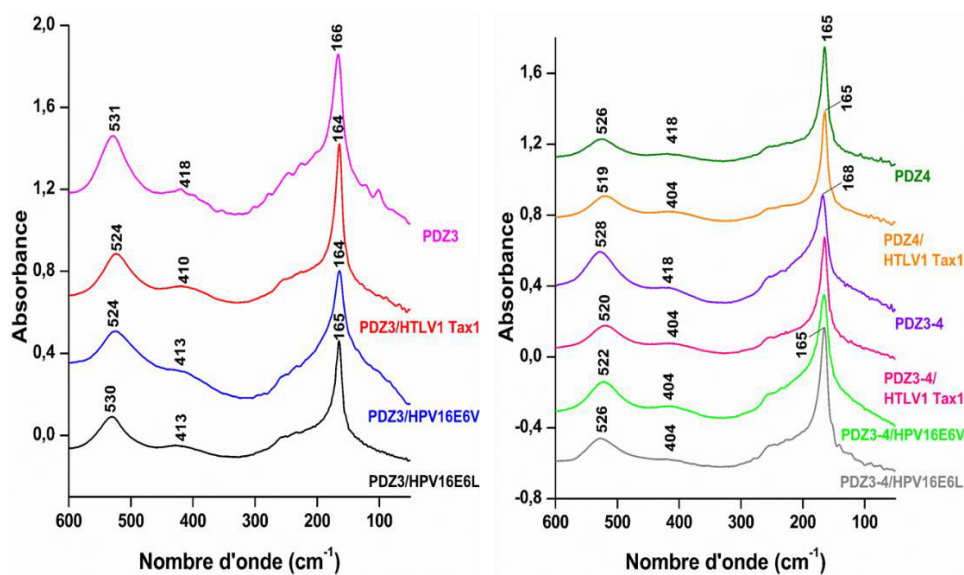


Figure 8 : Spectres FTIR-ATR des domaines PDZ3, PDZ4, PDZ3-4 et des complexes PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HPV16E6L, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HPV16E6L dans l'infrarouge lointain.

La bande amide VI découle de plusieurs vibrations, dont les vibrations de déformation δ (C=O). Les changements observés au niveau de la bande amide I entre ces différents complexes vont avoir un effet direct sur la bande amide VI ce qui explique le décalage de 1 à 8 cm^{-1} vers des fréquences plus basses lors de la formation des différents complexes comparés au spectre de la protéine seule. La bande intense à 164 cm^{-1} correspondant aux vibrations des modes collectifs des liaisons hydrogène ne présente pas de modifications au niveau de la fréquence dans les différents complexes étudiés. Par contre, le profil spectral du complexe PDZ3/HPV16E6V se différencie de ceux des autres complexes. Afin d'expliquer cette observation, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Brubach *et al* qui ont décrit dans le cas de l'eau que la fréquence de cette bande est liée aux mouvements intermoléculaires qui pourraient impliquer des liaisons non-covalentes, tandis que la largeur de cette bande est liée à la cohésion entre l'assemblage intra et intermoléculaire.¹⁰

3.2 Spectres Raman

Pour observer les changements conformationnels lors de la formation des différents complexes, nous avons réalisé leurs spectres Raman (Figure 9).

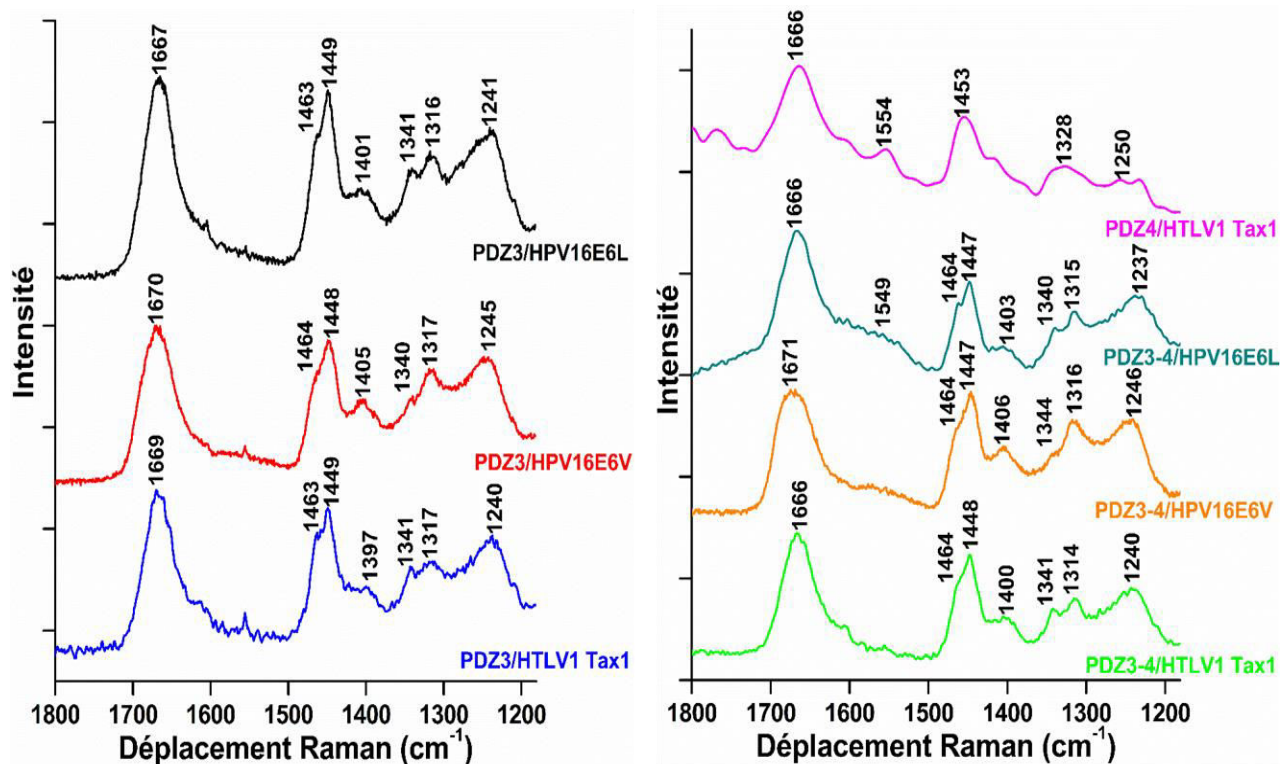


Figure 9 : Spectres Raman des complexes PDZ3/HPV16E6L, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6L, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax1 obtenus avec une excitation à 514 nm.

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

Ces complexes ont montré des différences dans toute la gamme spectrale étudiée. La variation la plus importante est observée au niveau de la bande amide III. Mikhonin *et al* ont décrit précédemment que la bande amide III est sensible aux changements au niveau de la structure secondaire.¹⁸ Les résultats obtenus ont montré des changements identiques aux niveaux des complexes PDZ3/HPV16E6L, PDZ3/HPV16E6L et PDZ3/HTLV1 Tax1 avec des variations de position et d'intensité des bandes dans la région comprise entre 1340 et 1200 cm^{-1} . Ceci est en accord avec les changements observés au niveau de la structure secondaire de ces trois complexes. Peu de variation sont notés au niveau du complexe PDZ4/HTLV1 Tax1 lors de la comparaison à PDZ4 seule. En ce qui concerne les complexes PDZ3-4/HPV16E6L, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax1, ces derniers ont montré des changements identiques aux complexes de la PDZ3.

4 Conclusion

Les résultats obtenus nous ont permis d'avoir une estimation de la structure secondaire des différents PDZ et peptides étudiés. Les complexes étudiés ont été structurés majoritairement en feuillet β parallèles avec un taux de structure variable selon la PDZ et le peptide étudié. Les changements conformationnels observés au niveau de la structure secondaire et tertiaire sont en accord avec les changements observés au niveau des spectres Raman.

Cependant, afin de pouvoir émettre des hypothèses concernant l'origine de ces changements conformationnels, des calculs théoriques sur ces complexes protéiques sont nécessaires. Ce travail est en cours à l'heure actuelle (en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, équipe oncoprotéines, à l'université de Strasbourg)

Toutefois, par manque de données dans la littérature, ces résultats resteront sans confirmation. Afin d'avoir plus de certitudes concernant les résultats obtenus, des optimisations dans le protocole de purification de ces PDZ seront nécessaires dans le futur pour éviter les problèmes de dénaturation de ces protéines.

5 Références Bibliographiques

1. Noguchi, T., and Sugiura, M. (2003) Analysis of flash-induced FTIR difference spectra of the S-state cycle in the photosynthetic water-oxidizing complex by uniform N-15 and C-13 isotope labeling, *Biochemistry* 42, 6035-6042.
2. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1073-1101.
3. Wolpert, M., and Hellwig, P. (2006) Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500 cm(-1), *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 64, 987-1001.
4. Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved Ftir Spectra, *Biopolymers* 25, 469-487.
5. Arrondo, J. L. R., and Goni, F. M. (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 367-405.
6. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994) Subcellular Biochemistry: Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes, (Hilderson, H. J., and Ralston, G. B., Eds.), pp 23:405-450, Plenum, New York.
7. Miyazawa, T. (1967) poly-a- Amino Acids, (Fastman, G. D., Ed.), pp 1:69-101, Marcel Decker, New York.
8. El Khoury, Y., Hielscher, R., Voicescu, M., Gross, J., and Hellwig, P. (2011) On the specificity of the amide VI band for the secondary structure of proteins, *Vib. Spectrosc* 55, 258-266.
9. Trivella, A., Gaillard, T., Stote, R. H., and Hellwig, P. (2010) Far infrared spectra of solid state aliphatic amino acids in different protonation states, *J. Chem. Phys.* 132.
10. Brubach, J. B., Mermet, A., Filabozzi, A., Gerschel, A., and Roy, P. (2005) Signatures of the hydrogen bonding in the infrared bands of water, *J. Chem. Phys.* 122.
11. Maiti, N. C., Apetri, M. M., Zagorski, M. G., Carey, P. R., and Anderson, V. E. (2004) Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: alpha-synuclein, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2399-2408.
12. Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., and Wan, X. (2011) Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 78, 1187-1195.
13. Hernandez, B., Pfluger, F., Adenier, A., Kruglik, S. G., and Ghomi, M. (2010) Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media. VIII. Amino Acids with Aromatic Side Chains: L-Phenylalanine, L-Tyrosine, and L-Tryptophan, *J. Phys. Chem. B* 114, 15319-15330.
14. Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., and Weckhuysen, B. M. (2005) Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment, *Vib. Spectrosc* 39, 114-125.
15. Overman, S. A., and Thomas, G. J. (1998) Amide modes of the alpha-helix: Raman spectroscopy of filamentous virus fd containing peptide C-13 and H-2 labels in coat protein subunits, *Biochemistry* 37, 5654-5665.

4 – Interaction de la PDZ avec des peptides viraux

16. Culka, A., Jehlicka, J., and Edwards, H. G. M. (2010) Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: Outdoor measurements and comparison, *Spectrochim Acta A* 77, 978-983.
17. Luck, K., Fournane, S., Kieffer, B., Masson, M., Nomine, Y., and Trave, G. (2011) Putting into Practice Domain-Linear Motif Interaction Predictions for Exploration of Protein Networks, *PLoS One* 6.
18. Mikhonin, A. V., Bykov, S. V., Myshakina, N. S., and Asher, S. A. (2006) Peptide secondary structure folding reaction coordinate: Correlation between UV Raman amide III frequency, Psi Ramachandran angle, and hydrogen bonding, *J. Phys. Chem. B* 110, 1928-1943.

5 - STABILITE ET ETATS
D'OXYGENATION DES HEMOCYANINES
DE *LIMULUS POLYPHEMUS*, *EURYPELMA*
CALIFORNICUM* ET *ASTACUS
LEPTODACTYLUS

Liste des figures

- Figure 1: Spectres d'absorption des Hcs de *L. polyphemus* et *E. californicum* obtenus à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 à 294K. 119
- Figure 2: Déconvolution de la bande amide I en 5 composantes de profil Gaussien des Hcs de *L. polyphemus* à pH 7, pH 7.5, pH 8.5 et *E. californicum* à pH 7, pH 7.8 et pH 8.5 à température ambiante (294K)..... 120
- Figure 3 : Histogrammes des différents éléments de la structure secondaire des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à pH7, 7.5-7.8 et 8.5 à température ambiante (294 K). La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 122
- Figure 4: Dépendance en température des spectres d'absorption FTIR des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 obtenus aux températures 294, 250, 200, 150, 100, 50 et 20 K. 127
- Figure 5 : Représentation des taux des structures hélices α plus structures désordonnées en noir et feuillet β parallèles en blanc des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* en fonction de très basses températures à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 128
- Figure 6 : Spectres infrarouge différentiels des Hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à pH 8.5 obtenus à de très basses températures allant de 294 à 10 K et à 20 K respectivement. Le cycle du retour allant de 10 et 20 K à 294 K est représenté en pointillé. 129
- Figure 7 : Déconvolution de la bande amide I en 6 composantes de profil Gaussien de l'hémocyanine de *L. polyphemus* à 15 et 75°C à pD 7, 7.5 et 8.5..... 131
- Figure 8 : Déconvolution de la de la bande amide I en 6 composantes de profil Gaussien de l'hémocyanine de l'*E. californicum* à 15 et 75°C à pD 7, 7.8 et 8.5..... 132
- Figure 9 : Spectres ATR-FTIR des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents pH et différents états d'oxygénation. 135
- Figure 10: Histogrammes présentant la variation des éléments de la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* en fonction de l'état d'oxygénation à pH 7,7.5 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 137

Figure 11: Histogrammes présentant la variation des éléments de la structure secondaire de l'hémocyanine de l'*E. californicum* en fonction de l'état d'oxygénation à pH 7, 7.8 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 138

Figure 12: Histogrammes présentant la variation des éléments de la structure secondaire de l'hémocyanine de l'*A. leptodactylus* en fonction de l'état d'oxygénation à pH 7, 7.5 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 139

Figure 13: Spectres différentiels des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 obtenus au cours du processus d'oxygénation (oxy-désoxy) traits en continu et en pointillés (désoxy-réoxy). 141

Figure 14 : Spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à l'état oxygéné, désoxygéné et réoxygéné à pH 7 obtenu avec une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale 1780-360 cm^{-1} avec une correction de la ligne de base.. 142

Figure 15 : Représentation de la bande d'oxygène et tryptophane des spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents pH et états d'oxygénation obtenus à une excitation de 514 nm dans la gamme spectrale 785-724 cm^{-1} sans correction de la ligne de base. 145

Figure 16 : Schéma du site actif de l'hémocyanine de *L. polyphemus* obtenu à l'aide du logiciel Pymol en (A) à l'état oxygéné (code PDB : (1NOL)) et en (B) à l'état désoxygéné (code PDB : (1LLA)) avec les résidus d'acides aminés tryptophane et leur distance du site actif..... 146

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des différentes compositions structurales de la bande amide I des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* obtenues sur cristal ATR et sous vide en cryostat. 118

Tableau 2 : Pourcentages des structures secondaires des Hcs de *L. polyphemus* à pH 7, pH 7.5, pH 8.5 en noir et *E. californicum* à pH 7, pH 7.8 et pH 8.5 en rouge à température ambiante (294 K), obtenus à partir de la déconvolution de la bande amide I. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 121

Tableau 3 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 10 K à pH 8.5. Les pourcentages des expériences de montée en

température de 10 à 294 K sont indiqués en rouge. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 124

Tableau 4 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de l'*E.californicum* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 20K à pH 8.5. Les pourcentages des expériences de montée en température de 20 à 294 K sont indiqués en rouge. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 125

Tableau 5 : Pourcentages des structures secondaires des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* en solution à pD 7, 7.5-7.8 et 8.5 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I en six composantes (1688, 1674, 1658, 1646, 1635 et 1617 cm^{-1}). La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$ 133

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des bandes de vibrations des spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d'oxygénation à pH 7 144

Introduction

Les hémocyanines sont des protéines extracellulaires présentes dans l'hémolymphe de plusieurs espèces d'arthropodes et de mollusques. Leur fonction principale est le transport de l'oxygène.

Ce chapitre est dédié à une étude comparative de la stabilité, en suivant l'évolution des structures secondaires à différents pH et à de très basse température, des hémocyanines issues de deux organismes appartenant à des conditions de vie différentes : le crabe *Limulus polyphemus* (vivant dans des profondeurs allant de -30 à -1000 m) et l'araignée *Eurypelma californicum* (vivant dans le désert caractérisé par des larges fluctuations de température).

Pour répondre à cet objectif, la spectroscopie infrarouge FTIR couplée à un cryostat a été mise en place pour travailler à très basse température, jusqu'à 20 K. En effet aucune donnée dans la littérature n'a été rapportée sur la stabilité de ces hémocyanines à de telles températures.

Le deuxième point qui sera développé dans ce chapitre est l'étude de la structure secondaire et du site actif, en absence et en présence d'oxygène, des hémocyanines du *Limulus polyphemus*, de l'*Eurypelma californicum* et de l'*Astacus leptodactylus* à différents pH. Pour réaliser ces mesures, la spectroscopie infrarouge FTIR en mode ATR et la spectroscopie Raman ont été utilisées.

1 L’effet du vide sur la structure secondaire des protéines

Les données présentées dans cette étude ont été obtenues sous vide à l’aide d’un cryostat à une pression constante de 1×10^{-7} mbar comme décrit dans la partie 1.6.1 du chapitre 2 matériels et méthodes. Afin d’étudier l’effet du vide sur la structure secondaire des hémocyanines à différents pH et différentes températures, la déconvolution de la bande amide I de ces protéines obtenue sous vide à 294 K a été comparée à la déconvolution de la bande amide I de ces mêmes échantillons caractérisés par spectroscopie FTIR en mode ATR sous forme d’un film sec. Les différentes composantes de cette bande qui représentent les éléments de la structure secondaire ont été attribuées de la manière suivante : les hélices α et les structures désordonnées ($1648\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), les feuillets β parallèles ($1625\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$), les feuillets β antiparallèles (représentés sous forme de deux bandes dans la région $1610\text{-}1628$ et $1675\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$) et les β coudes ($1660\text{-}1685\text{ cm}^{-1}$). Ces attributions sont basées sur des études en spectroscopie infrarouge rapportées dans la littérature sur la structure secondaire des protéines.¹⁻⁴ Les structures hélice α et les structures désordonnées ont des absorptions en infrarouge qui se chevauchent dans la gamme spectrale étudiée comme décrit dans la littérature sur d’autres protéines.^{1, 3, 5}

La dérivation moyenne ($f_{\text{ATR}}\text{-}f_{\text{cryostat}} \pm$ la déviation standard) entre ces deux types de mesures a été calculée et moyennée pour chaque élément de la structure secondaire des deux hémocyanines aux trois pH étudiés (Tableau 1).

Structure secondaire (%)	Hémocyanines	pH 8.5		pH 7.5-7.8		pH 7		Dérivation moyenne
		ATR	Cryostat	ATR	Cryostat	ATR	Cryostat	
Hélices α + désordonnées	<i>L. polyphemus</i>	41	43	47	51	52	58	-3 ± 2.5
	<i>E. californicum</i>	37	36	38	40	42	47	
Feuillets- β parallèles	<i>L. polyphemus</i>	29	29	26	24	20	19	2.3 ± 1.9
	<i>E. californicum</i>	16	11	19	15	23	21	
Feuillets- β antiparallèles	<i>L. polyphemus</i>	11	10	12	8	14	12	0.3 ± 2.8
	<i>E. californicum</i>	21	24	15	18	18	17	
β -coudes	<i>L. polyphemus</i>	19	18	15	17	14	11	0.3 ± 2.2
	<i>E. californicum</i>	26	29	28	27	17	15	

Tableau 1 : Comparaison des différentes compositions structurales de la bande amide I des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* obtenues sur cristal ATR et sous vide en cryostat.

Ainsi, bien qu'il pourrait y avoir une légère tendance à l'augmentation des hélices α dans le vide, l'augmentation du taux de cette structure est plus petit que l'erreur typique liée à la déconvolution qui est d'environ ($\pm 3.5\%$). De plus, l'orientation de la protéine sur le cristal ATR pourrait également conduire à des petites différences dans les composantes de la structure secondaire. Ainsi, les résultats obtenus ont clairement démontré que le vide n'a pas affecté de manière significative la structure secondaire des protéines et tous les effets observés seront attribués à des différences de la structure secondaire induite par le pH et la température.

2 L'effet du pH sur la structure des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum*

Trois conditions de pH ont été étudiées : pH 7, pH 7.5 ou 7.8 selon la protéine étudiée et pH 8.5. Le choix de ces valeurs est lié à l'affinité pour l'oxygène de ces deux protéines. L'hémocyanine de *L. polyphemus* présente une forte affinité pour l'oxygène à pH 7 et moins d'affinité à pH 8.5. Par contre, pour l'hémocyanine de l'*E. californicum* le pH a une influence inverse sur l'affinité pour l'oxygène.

La Figure 1 représentée ci-dessous montre les spectres d'absorption de la bande amide I des Hcs *L. polyphemus* et *E. californicum* à différentes valeurs de pH à température ambiante (294 K).

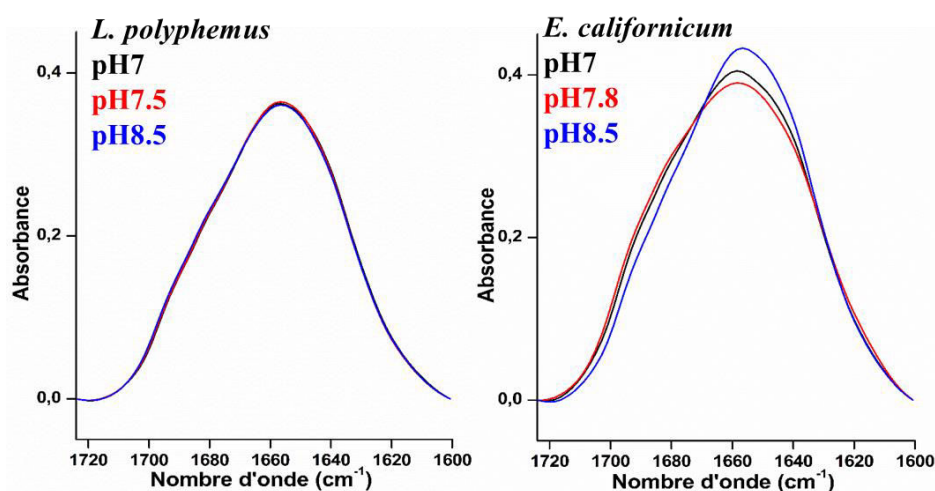


Figure 1: Spectres d'absorption des Hcs de *L. polyphemus* et *E. californicum* obtenus à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 à 294K.

Afin de déterminer les changements au niveau de la structure secondaire en fonction du pH et de la température, la déconvolution de la bande amide I a été effectuée pour les Hcs de *L.*

polyphemus et *E.californicum* à différents pH à température ambiante (294 K) (Figure 2). En effet, la bande amide I est associée aux vibrations d'élongation (C=O) des chaînes polypeptidiques de la protéine et est spécifique de la structure secondaire.^{2, 6}

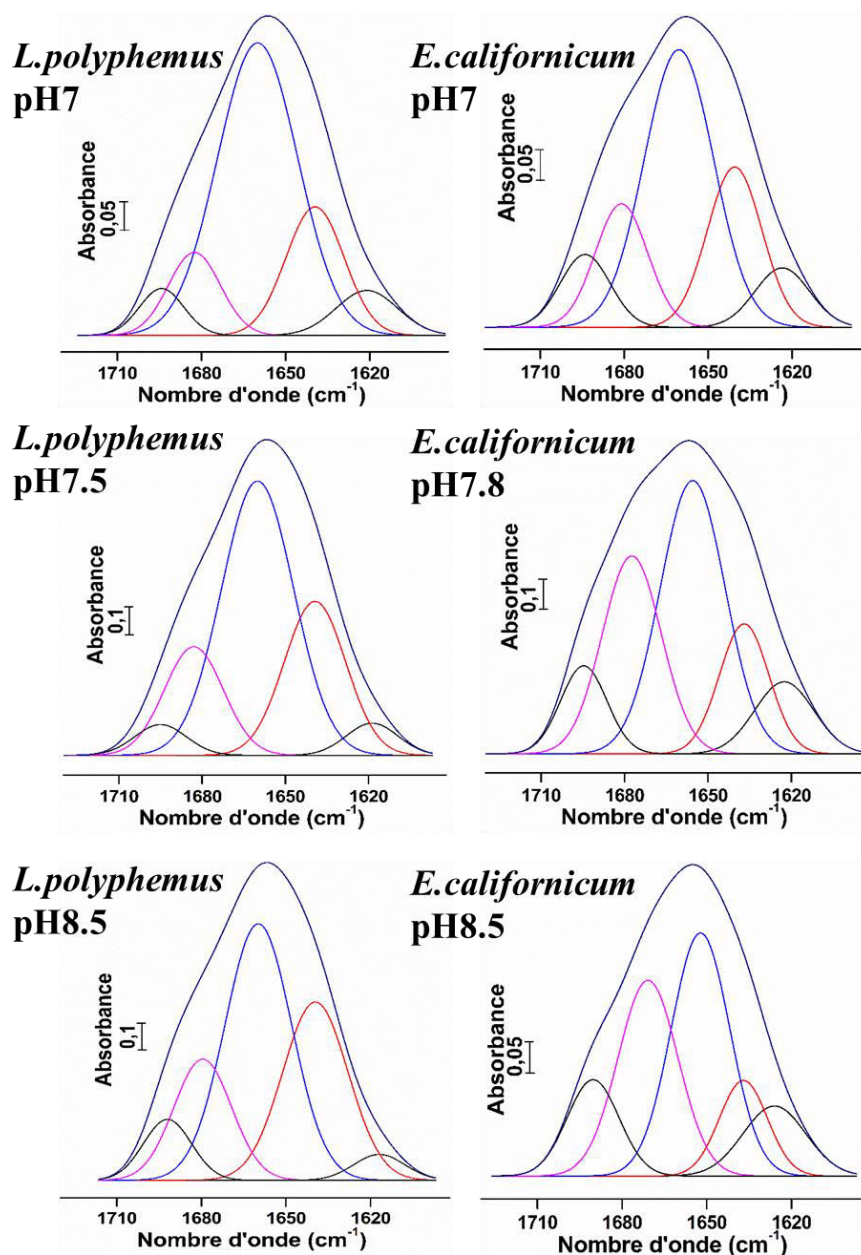


Figure 2: Déconvolution de la bande amide I en 5 composantes de profil Gaussien des Hcs de *L. polyphemus* à pH 7, pH 7.5, pH 8.5 et *E. californicum* à pH 7, pH 7.8 et pH 8.5 à température ambiante (294K).

Pour suivre les changements conformationnels induits en fonction du pH, cinq bandes situées à 1693, 1678, 1658, 1638 et 1621 cm^{-1} ont été utilisées pour décomposer la bande amide I dans la gamme spectrale 1710-1600 cm^{-1} . Le Tableau 2 détaille les différents éléments de la structure secondaire des deux hémocyanines à différents pH à 294 K.

pH Temperature(K)	pH 8.5	pH 7.5-7.8	pH 7
	294	294	294
Structure secondaire (%)			
Hélices α + structure désordonnées	43 (36)	51 (40)	58 (47)
Feuillets- β parallèles	29 (11)	24 (15)	19 (21)
Feuillets- β antiparallèles	10 (24)	8 (18)	12 (17)
β -coudes	18 (29)	17 (27)	11 (15)

Tableau 2 : Pourcentages des structures secondaires des Hcs de *L. polyphemus* à pH 7, pH 7.5, pH 8.5 en noir et *E. californicum* à pH 7, pH 7.8 et pH 8.5 en rouge à température ambiante (294 K), obtenus à partir de la déconvolution de la bande amide I. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Les résultats de la décomposition de la bande amide I pour les deux hémocyanines à différents pH ont montré une structure secondaire composée majoritairement d’hélices α plus structures désordonnées (36-58%) (Figure 2 et Tableau 2). Le taux de structure hélice α dans les deux hémocyanines est en accord avec la structure cristallographique de la sous-unité II du *L. polyphemus* contenant 43% d’hélices α en se basant sur les attributions de la protéine portant le code PDB (1NOL). La bande amide I de ces deux hémocyanines comprend également deux composantes à 1618 et 1694 cm^{-1} caractéristiques des feuillets β orientés d’une manière antiparallèles et une autre composante à 1678 cm^{-1} attribuée aux β coudes.

Le pourcentage total des feuillets β (parallèles, antiparallèles et coudes) de l’hémocyanine de l’*E. californicum* est supérieur de 7 à 11% comparé à l’hémocyanine de *L. polyphemus* à différents pH étudiés. De plus, dans le cas de l’hémocyanine de l’*E. californicum* en allant vers un pH basique la position des bandes d’absorption des hélices α plus structures désordonnées et des β -coudes sont déplacées de 5 à 10 cm^{-1} vers des faibles fréquences. Ce déplacement n’est pas observable dans le cas du *L. polyphemus* (Figure 1).

Comme on peut le voir sur la Figure 1 le profil spectral de la bande amide I de l’hémocyanine de l’*E. californicum* à différents pH a montré des spectres plus ou moins larges aux valeurs de

pH 7 et 7.8, indiquant une contribution plus élevée des éléments de la structure secondaire, principalement des hélices α plus structures désordonnées ($1652\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) et les β coudes ($1671\text{-}1681\text{ cm}^{-1}$). En revanche, le profil amide I de l’hémocyanine de *L. polyphemus* est identique à différent pH étudiés (Figure 1). Les variations observées dans le cas de l’hémocyanine de l’*E. californicum* sont beaucoup plus grandes que celles décrites dans la littérature. Par exemple, Gilde *et al* ont noté un décalage de 6 cm^{-1} entre ces différentes composantes (hélices α plus structures désordonnées et β coudes) en raison du changement de pH.⁷

Nos résultats ont montré que ces deux hémocyanines ont un comportement structural différent vis-à-vis du pH étudié à température ambiante (294 K). Pour l’hémocyanine de *L. polyphemus* en allant vers un pH basique, le pourcentage des hélices α plus structures désordonnées diminue progressivement en faveur de l’augmentation des feuillets β parallèles. Dans le cas de l’hémocyanine de l’*E. californicum*, les hélices α plus structures désordonnées ainsi que les feuillets β parallèles diminuent en faveur de l’augmentation des feuillets β antiparallèles et des β coudes (Tableau 2, Figure 3).

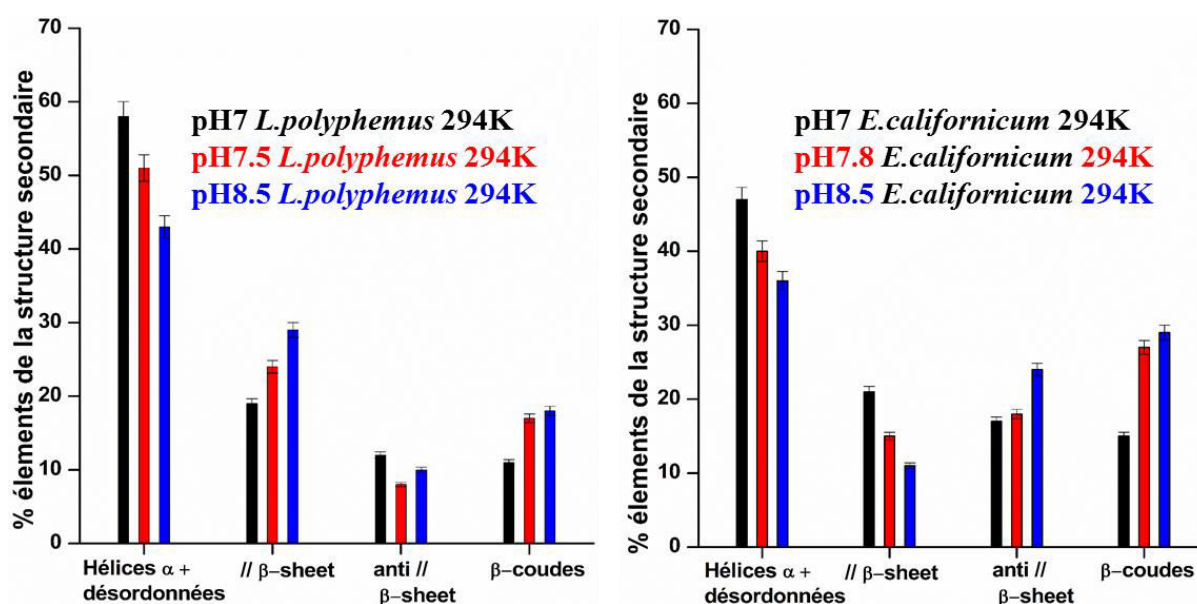


Figure 3 : Histogrammes des différents éléments de la structure secondaire des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à pH7, 7.5-7.8 et 8.5 à température ambiante (294 K). La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Ce comportement structural différent entre ces deux protéines induit par le pH peut avoir une signification biologique et peut être lié à l’environnement des protéines issues d’organismes provenant de deux habitats très différents.⁸ Cette différence est liée à l’effet de Bohr qui décrit

le couplage négatif entre la liaison de l'oxygène à ces protéines respiratoires et la liaison de la protéine à des protons. En général, les hémocyanines ont un effet de Bohr normal comme par exemple l'*E. californicum*. *L. polyphemus* en revanche est l'une des rares hémocyanines avec un effet de Bohr inverse pour les valeurs de pH allant de 7 à 9, ceci implique que les hémocyanines issues des différentes espèces ne montrent pas la même dépendance vis-à-vis du pH.^{9, 10}

3 L'effet de très basses températures sur la structure des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum*

Afin de comprendre l'effet de très basses températures liées aux conditions de vie des organismes dont les hémocyanines sont issues, sur la structure de ces protéines nous avons mesuré les spectres d'absorption des deux hémocyanines en fonction de la température à différents pH.

La déconvolution de la bande amide I a montré des différences notables entre les hémocyanines *L. polyphemus* et *E. californicum*. Dans le cas de l'hémocyanine de *L. polyphemus* un changement dans la structure secondaire s'est produit lors de l'exposition de cette protéine à de très basses températures allant de 294 à 10 K à différents pH (Tableau 3 pour pH 8.5 et Tableau S3, S4 en annexe pour pH 7 et 7.5 respectivement). Ce changement de structure se présente sous la forme d'une diminution progressive de la structure secondaire majoritaire l'hélice α plus structure désordonnée en faveur de l'augmentation des feuillets β parallèles aux trois pH étudiés. A chaque température étudiée, on observe de plus le même comportement structural noté précédemment sous l'effet du pH à température ambiante (294 K).

En ce qui concerne l'hémocyanine de l'*E. californicum*, aucun changement important de structure secondaire n'est observé et cela est confirmé par les données de déconvolution de l'amide I de cette protéine à différentes températures (Tableau 4 pour pH 8.5 et Tableau S5, S6 en annexe pour pH 7 et 7.8 respectivement).

Température (K)	1660-1664 cm ⁻¹	1639-1642 cm ⁻¹	1679-1685 cm ⁻¹	1616-1624/1693-1695 cm ⁻¹
	Hélices α + désordonnée	Feuillets- β parallèles	β -coudes	Feuillets- β antiparallèles
294	43 (51)	29 (30)	18 (7)	10 (12)
250	45 (42)	31 (31)	17 (18)	7 (9)
200	47 (45)	28 (29)	17 (15)	8 (11)
150	40 (39)	22 (22)	22 (26)	16 (13)
100	45 (48)	33 (31)	14 (11)	8 (10)
80	34 (31)	32 (34)	24 (24)	10 (11)
50	35 (35)	37 (36)	18 (19)	10 (10)
40	35 (34)	39 (37)	16 (18)	10 (11)
30	34 (34)	38 (37)	19 (18)	9 (11)
20	33 (34)	38 (37)	20 (14)	9 (15)
10	31 (31)	42 (42)	17 (17)	10 (10)

Tableau 3 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 10 K à pH 8.5. Les pourcentages des expériences de montée en température de 10 à 294 K sont indiqués en rouge. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Température (K)	1652-1661 cm ⁻¹	1637-1640 cm ⁻¹	1671- 1682 cm ⁻¹	1621-1628 /1690-1695 cm ⁻¹
	Hélices α + désordonnée	Feuillets- β parallèles	β -coudes	Feuillets- β antiparallèles
294	36 (38)	11 (10)	29 (29)	24 (23)
250	42 (38)	16 (19)	24 (19)	18 (24)
200	38 (42)	17 (17)	23 (19)	22 (22)
150	40 (40)	18 (20)	25 (23)	17 (17)
100	40 (39)	19 (19)	25 (26)	16 (16)
50	34 (35)	17 (18)	29 (28)	20 (19)
20	36 (36)	19 (19)	27 (27)	18 (18)

Tableau 4 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de l'*E.californicum* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 20K à pH 8.5. Les pourcentages des expériences de montée en température de 20 à 294 K sont indiqués en rouge. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Le comportement des deux hémocyanines sous l'effet de très basses températures a montré une ressemblance notable en terme de taux de structure hélice α plus structure désordonnée (33-41%) aux différents pH étudiés. Ce pourcentage de structure calculé est en accord avec le taux de structure trouvé en cristallographie code PDB (1NOL).

De plus, dans le cas de l'hémocyanine de *L. polyphemus*, l'augmentation des feuillets β parallèles au détriment des hélices α plus structures désordonnées est probablement liée à une diminution de la structure désordonnée et donc ne concerne pas la perte de la structure ordonnée en hélice α .

Des expériences ont été réalisées par le Pr. Nadja Hellmann à l'institut de Biophysique Moléculaire à l'université de Mayence sur la liaison à l'oxygène de l'hémocyanine de *L.polyphemus* suite à l'exposition à de très basses températures, pour soutenir notre hypothèse concernant la perte de la structure désordonnée. Les résultats ont montré que la liaison à l'oxygène est encore présente dans l'hémocyanine de *L.polyphemus* malgré les très basses

températures ce qui peut indiquer que le site actif dans la sous unité II de l'hémocyanine de *L. polyphemus*, structurée principalement en hélice α , est resté intact.

L'hypothèse envisageable pour expliquer la stabilité de ces deux hémocyanines pourrait être liée à l'utilisation d'échantillon sous forme de film avec une concentration élevée de protéine (> à 100 mg/ml). Toutefois, dans le cas par exemple de la myoglobine et de l'anticorps monoclonal 1 (mAb1) sous l'effet de très basses températures en solution, un dépliement de la structure a été observé.^{11, 12}

De plus, dans les conditions physiologiques mais aussi dans le tampon utilisé pour l'étude des protéines isolées, la température va avoir un effet sur le pH. Il peut être possible que les changements structuraux observés pour l'hémocyanine de *L. polyphemus* à très basses températures soient dus directement à l'effet de la température mais aussi au changement de pH dû à la température. Par exemple, des mesures effectuées par Kolhe *et al* sur le tampon Tris-HCl ont montré une augmentation de pH de ~ 1.2 unité dans la gamme de température de + 25 à - 30 °C.¹³ Cependant, cet effet sur le pH du tampon peut varier selon la protéine présente dans le milieu et selon sa concentration. Par exemple, Smith *et al* ont estimé une variation du pH dans le tampon Tris d'environ + 2.3 unité, alors qu'en présence de 40 mg/ml d'albumine, cette variation de pH diminue à + 0.1.¹⁴

Dans notre étude, nous avons utilisé des concentrations élevées en protéine et donc une stabilisation du pH similaire à celle de la littérature peut être attendue. Ainsi, nous pouvons confirmer que les changements structuraux observés proviennent uniquement des changements de température et non pas des variations de pH dues aux changements de température.

Un autre changement structural important observé sous l'effet des basses températures est au niveau de la bande amide II. Cette bande caractéristique de la structure tertiaire, située aux alentours de 1536-1547 cm^{-1} , est associée aux vibrations d'élongations ν (C=N) et déformations δ (N-H). Pour les deux hémocyanines, la bande amide II est déplacée de 9 cm^{-1} vers les hauts nombres d'onde avec la diminution de la température de 294 à 20 K à toutes les valeurs de pH étudiées (Figure 4).

Ce changement structural peut être expliqué par l'effet des liaisons hydrogène. En effet, l'exposition des groupements N-H à des molécules d'eau va mener à la formation de liaisons hydrogènes ($\text{NH}\cdots\text{OH}_2$). Celles-ci tendent à augmenter la constante de force de la bande de vibration N-H et induisent un déplacement de la bande amide II vers les hauts nombre d'onde.¹⁵

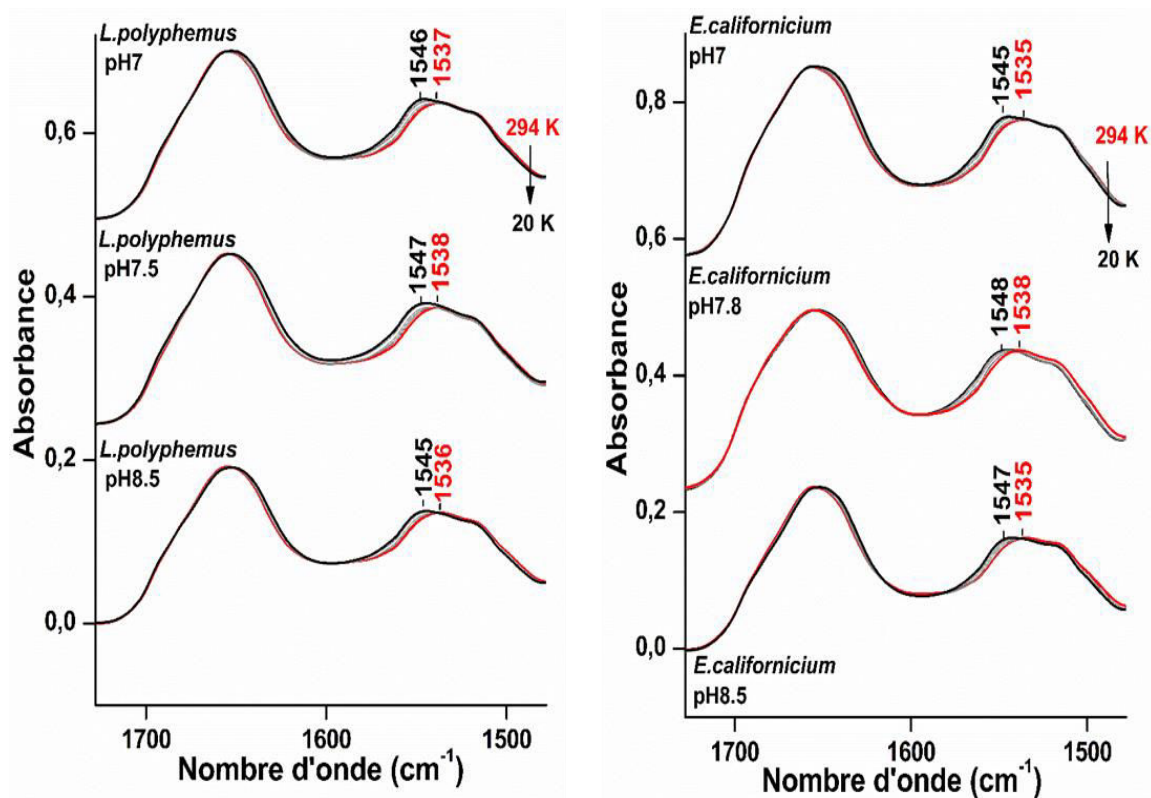


Figure 4: Dépendance en température des spectres d'absorption FTIR des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 obtenus aux températures 294, 250, 200, 150, 100, 50 et 20 K.

3.1 La transition de la structure secondaire sous l'effet de très basses températures

La Figure 5 représente les pourcentages d'hélices α plus structures désordonnées ainsi que des feuillets β parallèles à de très basses températures. Pour l'hémocyanine de *L. polyphemus* entre les températures de 100 et 50 K, une transition de la structure secondaire prend place. Cette transition implique une diminution progressive de la contribution des hélices α plus les structures désordonnées et une augmentation simultanée des feuillets β parallèles.

En revanche l'hémocyanine de l'*E. californicum* n'a montré aucune transition de la structure secondaire pour toutes les valeurs de pH étudiées (Figure 5). Ainsi, l'ensemble de la structure de la protéine est maintenu stable au cours de l'exposition à de très basses températures.

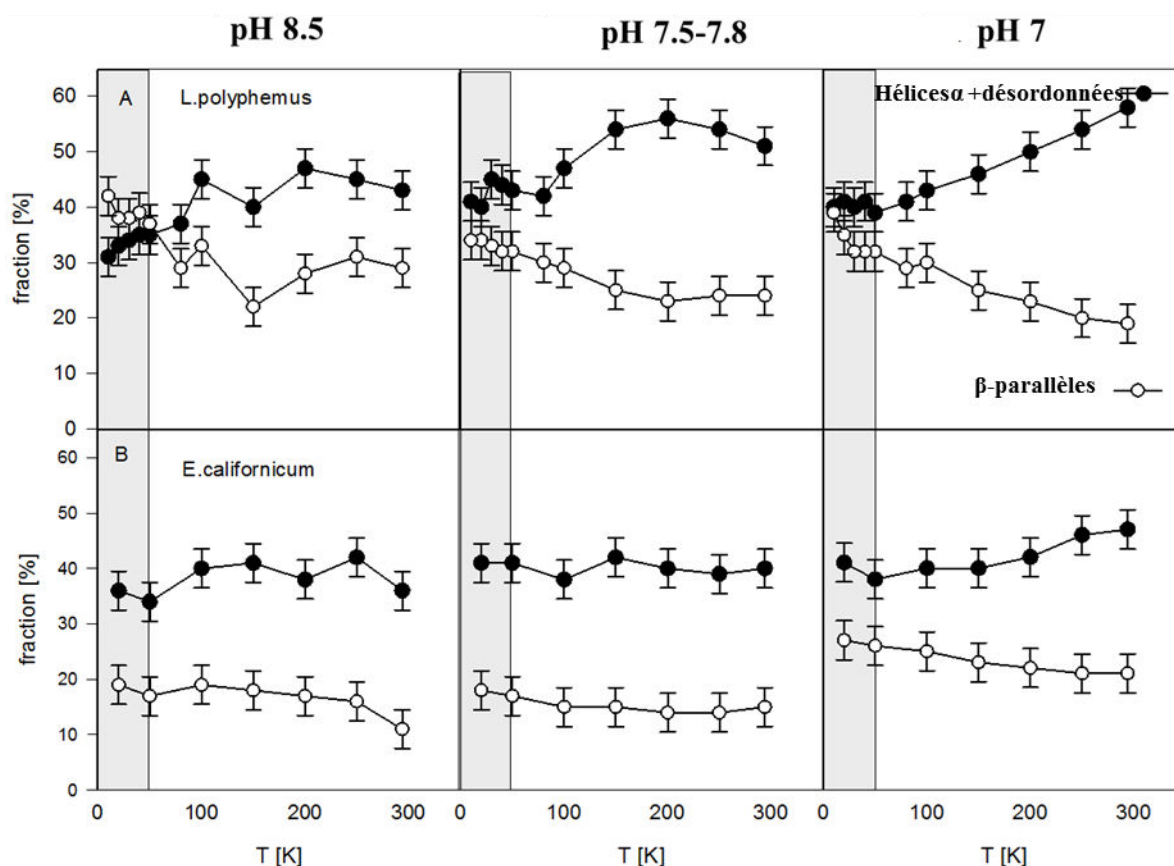


Figure 5 : Représentation des taux des structures hélices α plus structures désordonnées en noir et feuillets β parallèles en blanc des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* en fonction de très basses températures à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

3.2 Réversibilité des changements structuraux des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* observés sous l’effet de très basses températures

Afin d’illustrer les changements conformationnels observés lors de l’exposition de ces deux protéines à de très basses températures à pH 8.5, ainsi que de vérifier la réversibilité, des mesures allant de 10 à 294 K ont été réalisées. Les spectres infrarouge différentiels en fonction de la température ont été calculés par la suite et sont représentés en Figure 6.

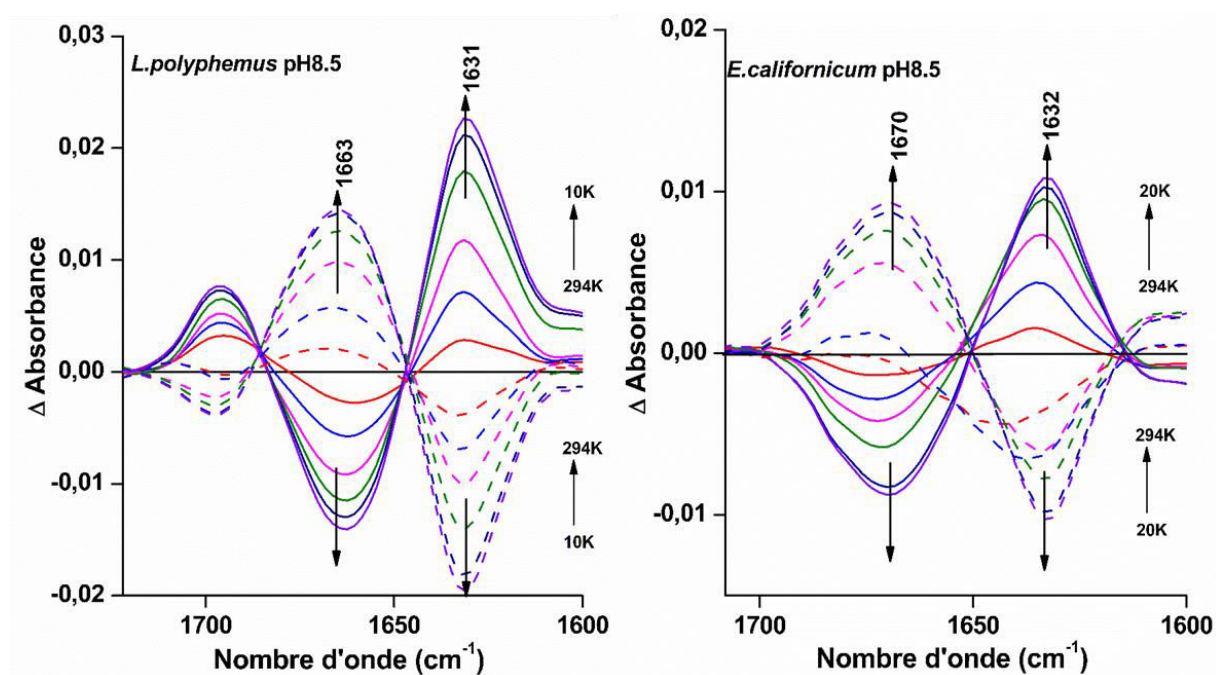


Figure 6 : Spectres infrarouge différentiels des Hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à pH 8.5 obtenus à de très basses températures allant de 294 à 10 K et à 20 K respectivement. Le cycle du retour allant de 10 et 20 K à 294 K est représenté en pointillé.

Pour l'hémocyanine de *L. polyphemus*, les spectres infrarouges différentiels calculés pour le cycle de la congélation de 294 à 10 K ont été obtenus par la soustraction du spectre à 294 K aux spectres obtenus à basses températures. Les spectres sont représentés du bas à 294 K vers le haut à 10 K en suivant la bande positive à 1631 cm^{-1} .

Pour le cycle de retour à température ambiante allant de 10 à 294 K, les spectres aux basses températures ont été soustraits du spectre à 294 K. Les spectres sont représentés en pointillés du bas à 10 K vers le haut à 294 K en suivant la bande négative à 1631 cm^{-1} . La même méthode a été utilisée pour calculer les spectres différentiels de l'hémocyanine de l'*E. californicum*.

En ce qui concerne l'hémocyanine de *L. polyphemus*, ces spectres différentiels ont montré une bande positive à 1631 cm^{-1} qui indique l'augmentation des feuillettes β parallèles et une bande négative à 1663 cm^{-1} qui confirme la diminution des hélices α plus structures désordonnées sous l'effet de la diminution de la température (Figure 6). Les spectres différentiels de la même protéine calculés à partir des expériences de montées en température ont montré une bande négative à 1631 cm^{-1} et une bande positive à 1663 cm^{-1} (spectres en pointillés sur la Figure 6) ce qui démontre la réversibilité des changements structuraux.

Pour l'hémocyanine de l'*E. californicum* les spectres différentiels à pH 8.5 montrent un pic négatif à 1670 cm^{-1} associé aux β coudes diminuant à basses températures et un pic positif à

1632 cm⁻¹ indiquant l'augmentation des feuillettes β parallèles. La structure de cette protéine montre des changements presque réversibles vis-à-vis de l'abaissement de la température jusqu'à 20 K. Cette réversibilité concernant les changements structuraux observés pour l'hémocyanine de *L. polyphemus* et *E. californicum* sous l'effet de très basses températures à pH 8.5 est également confirmée par les données de la déconvolution représentées dans Tableau 3 et Tableau 4.

3.3 L'effet des hautes températures sur la structure des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum*

Nous nous sommes intéressés dans cette partie à examiner la stabilité des deux hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* sous l'effet des hautes températures allant de 15 à 75°C. Des spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés à 15, 25, 35, 45, 55, 65 et 75°C en solution à différentes valeurs de pD (7, 7.5-7.8 et 8.5) (Figure S6 en annexe) en utilisant la cellule de transmission décrite précédemment dans la partie 1.6 de Matériels et Méthodes. La plage de température étudiée monte jusqu'à 75°C, ces protéines peuvent être étudiées à de si haute température en raison de leur stabilité. En effet Ikadieva *et al* et Sterner *et al* ont montré que l'extrême thermostabilité de ces hémocyanines est liée à la stabilité intrinsèque élevée de leurs sous-unités. Des mesures en calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sur les hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* ont présenté des températures de transition de 93 et 92 °C respectivement.^{8, 16}

Des études précédentes ont montré que la fonction de l'hémocyanine est conservée malgré les variations de pH provenant de l'effet des hautes températures. En effet, Sterner *et al* ont observé par diffusion de la lumière que la diminution du pH de 7.6 à 6.2 dans la gamme de température allant de 20 à 85°C n'est pas accompagnée d'une dénaturation de l'hémocyanine de l'*E. californicum*.⁸ De plus Decker *et al*, ont démontré via des mesures d'ultracentrifugation analytique que l'hémocyanine de l'*E. californicum* conserve sa coopérativité à l'oxygène dans la gamme de pH comprise entre 5 et 9.¹⁷ Ainsi, les résultats de nos expériences dédiées à l'étude des hémocyanines sous l'effet des hautes températures à différents pD pourront être expliqués par les variations de températures.

La déconvolution de la bande amide I des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* à 15 et 75°C à pD 7, 7.5-7.8 et 8.5 est représentée sur la Figure 7 et la Figure 8, respectivement.

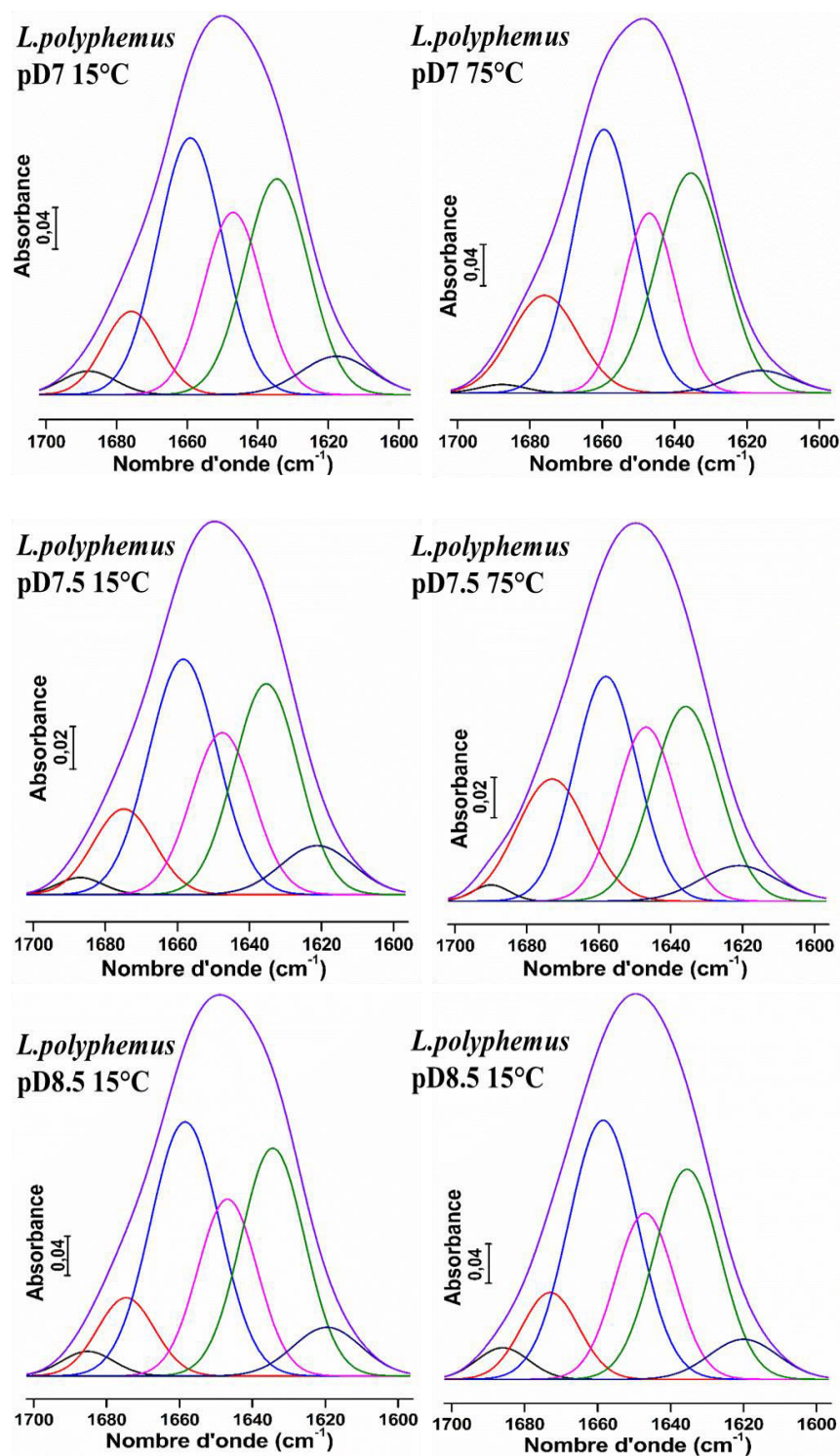


Figure 7 : Déconvolution de la bande amide I en 6 composantes de profil Gaussien de l'hémocyanine de *L. polyphemus* à 15 et 75°C à pD 7, 7.5 et 8.5.

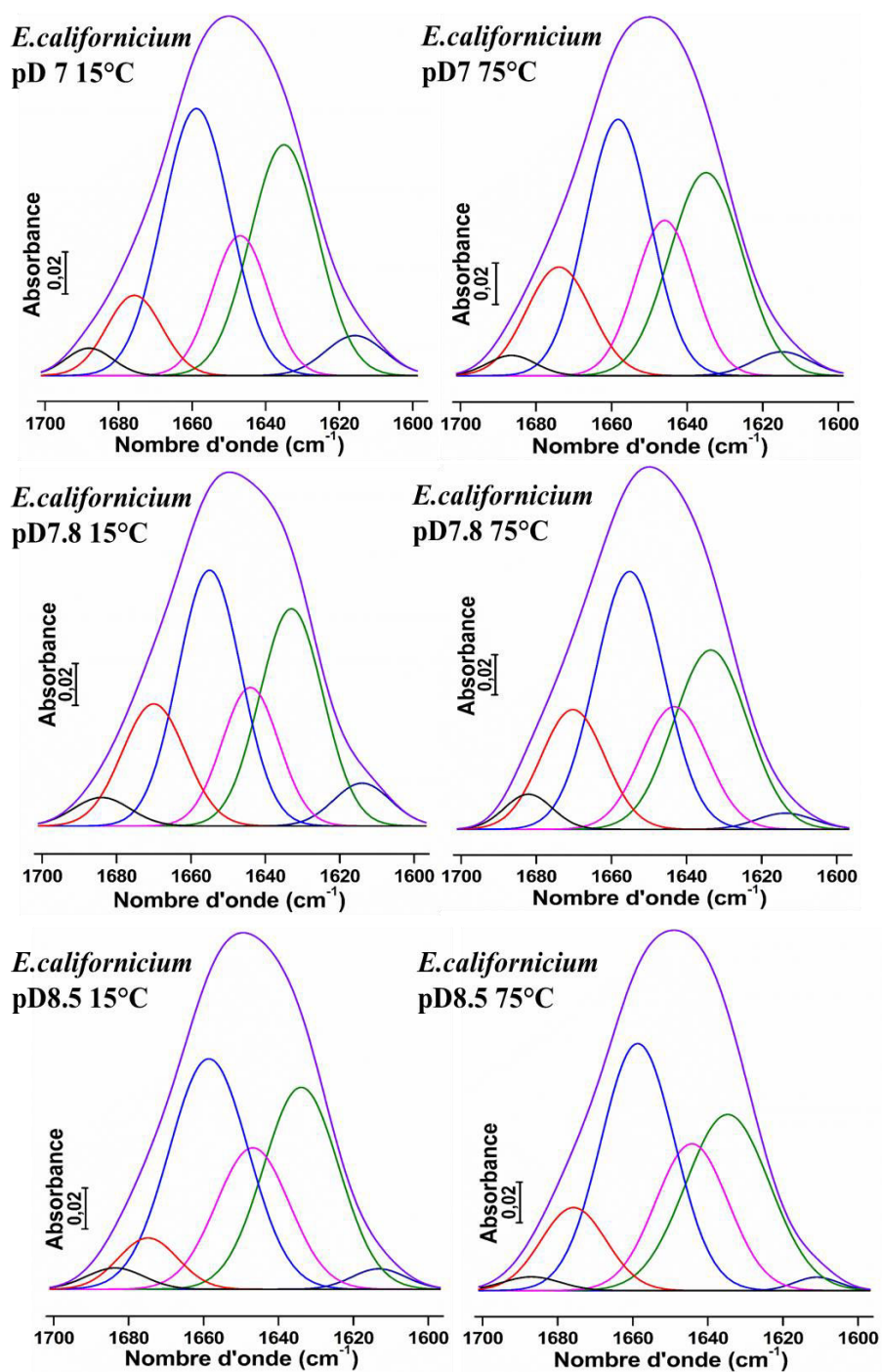


Figure 8 : Déconvolution de la de la bande amide I en 6 composantes de profil Gaussien de l'hémocyanine de l'*E. californicum* à 15 et 75°C à pD 7, 7.8 et 8.5.

Le Tableau 5 détaille les différents éléments de la structure secondaire des deux hémocyanines à 15 et 75°C à différents pD.

Structure secondaire (%)	Hémocyanines	pD 8.5		pD 7.5-7.8		pD 7	
		15°C	75°C	15°C	75°C	15°C	75°C
Hélices α	<i>L.polyphemus</i>	34	35	32	29	34	33
	<i>E.californicum</i>	37	36	33	36	36	33
Feuillets- β parallèles	<i>L.polyphemus</i>	28	27	27	26	27	30
	<i>E.californicum</i>	31	29	28	27	31	30
Feuillets- β antiparallèles	<i>L.polyphemus</i>	9	9	10	7	9	4
	<i>E.californicum</i>	5	3	7	5	8	5
β -coudes	<i>L.polyphemus</i>	9	10	11	17	9	13
	<i>E.californicum</i>	6	11	16	16	9	14
Structure désordonnées	<i>L.polyphemus</i>	20	19	20	21	21	20
	<i>E.californicum</i>	21	21	16	16	16	18

Tableau 5 : Pourcentages des structures secondaires des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* en solution à pD 7, 7.5-7.8 et 8.5 obtenus à l'aide de la déconvolution de la bande amide I en six composantes (1688, 1674, 1658, 1646, 1635 et 1617 cm^{-1}). La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Les résultats obtenus ont montré que les deux structures secondaires majoritaires des deux hémocyanines en solution à différents pD (7, 7.5-7.8 et 8.5) à 15 et 75°C sont les hélices α (33-37%) et les feuillets β parallèles (26-31%). De plus, le taux des différents éléments de structure secondaire des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* est resté stable sous l'effet des hautes températures ce qui indique une haute thermostabilité de ces protéines.

4 L'effet de l'oxygénation sur la structure secondaire des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents pH

Le deuxième point qui sera développé dans cette partie est l'oxygénation. Au cours de cette étude, nous avons suivi par spectroscopie infrarouge en mode ATR la stabilité des trois hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 en présence et absence d'oxygène afin d'examiner les changements induits sur la structure secondaire de ces protéines. Les spectres ATR-FTIR ont été enregistrés dans la gamme spectrale allant de 1750 à 1450 cm^{-1} et en Figure 9 sont présentées les régions correspondant aux modes amide I et amide II.

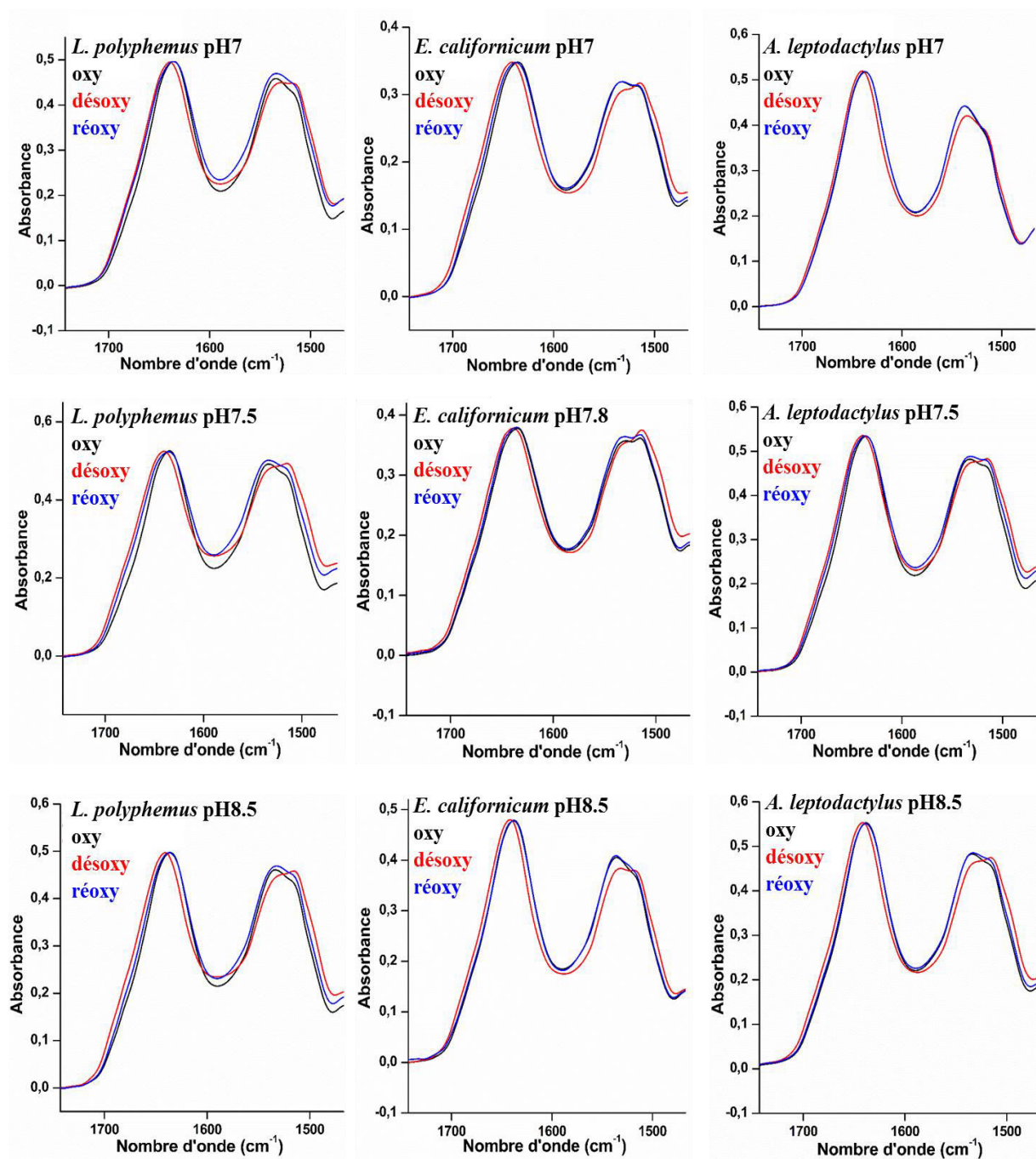


Figure 9 : Spectres ATR-FTIR des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents pH et différents états d'oxygénation.

Au cours de ce projet, nous nous sommes focalisés uniquement sur l'étude de la bande amide I qui est attribuée aux vibrations d'élongations (C=O) de la chaîne polypeptidique et est spécifique de la structure secondaire de la protéine. Ainsi, cette bande sera utilisée pour suivre les changements conformationnels en fonction de l'état d'oxygénation.

La bande amide II située aux alentours de 1535 cm^{-1} est décalée de 20 cm^{-1} vers les faibles nombres d'onde lors de la désoxygénation. En effet, cette bande est sensible aux changements qui se produisent au niveau de la structure secondaire.

La comparaison du profil de la bande amide I obtenue à différents états d'oxygénation et de pH pour les trois hémocyanines a montré des changements bien distincts notamment à l'état désoxygénée (Figure 9 spectres rouges). En effet, la bande amide I centrée aux alentours de 1647 cm^{-1} a le même profil spectral à l'état oxygéné et réoxygéné à toutes les valeurs de pH étudiées (spectres noirs et bleus). Cependant, la bande amide I de la forme désoxygénée de ces trois protéines est observée aux alentours de 1650 cm^{-1} . De plus, les éléments de la structure secondaire obtenus par la déconvolution de la bande amide I sont également déplacés vers des fréquences plus élevées en allant vers un pH basique. Pour quantifier les changements de la structure secondaire liés à la présence et l'absence d'oxygène à différentes valeurs de pH, la décomposition de la bande amide I en cinq bandes situées à 1687, 1669, 1648, 1628 et 1613 cm^{-1} a été réalisée. Les Figure 10, Figure 11 et Figure 12 détaillent l'évolution des différents éléments de la structure secondaire des trois hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d'oxygénation et de pH (Tableau S7 en annexe).

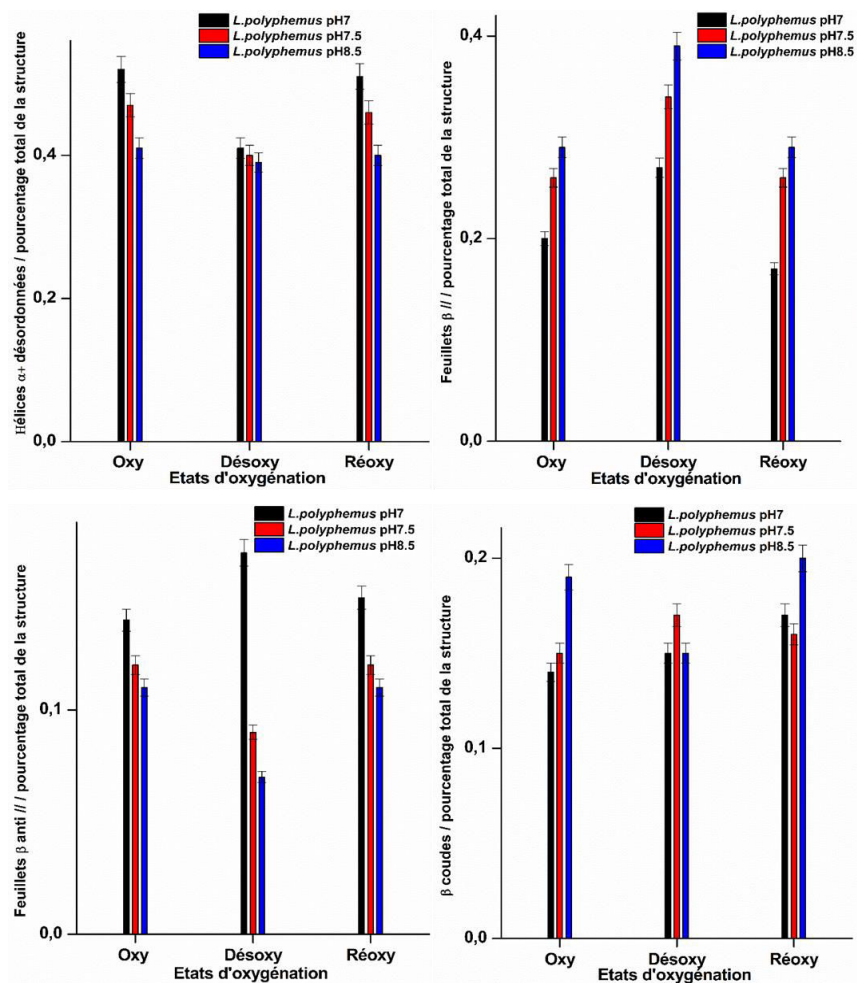


Figure 10: Histogrammes présentant la variation des éléments de la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* en fonction de l'état d'oxygénation à pH 7, 7.5 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

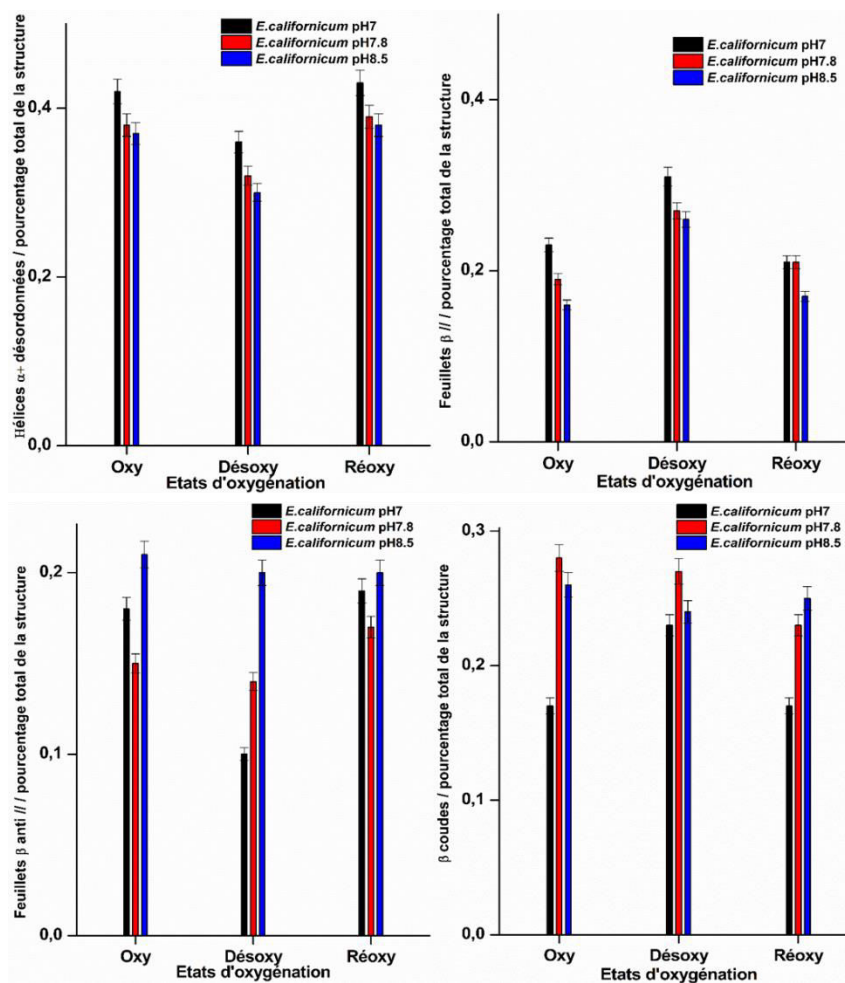


Figure 11: Histogrammes présentant la variation des éléments de la structure secondaire de l'hémocyanine de l'*E. californicum* en fonction de l'état d'oxygénation à pH 7, 7.8 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

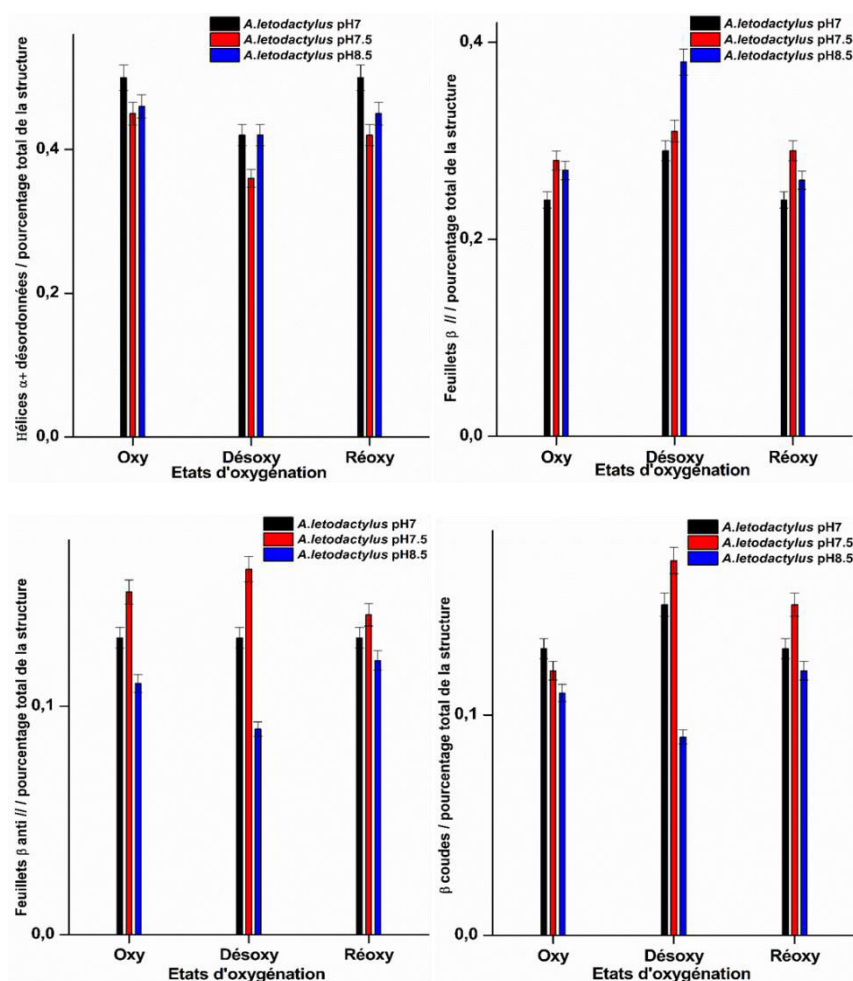


Figure 12: Histogrammes présentant la variation des éléments de la structure secondaire de l'hémocyanine de l'*A. leptodactylus* en fonction de l'état d'oxygénation à pH 7, 7.5 et 8.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Les trois hémocyanines à l'état oxygéné sont principalement structurées en hélices α plus structures désordonnées (37-52%) pour toutes les valeurs de pH étudiées. La comparaison de la structure secondaire de ces trois hémocyanines a révélé des changements conformationnels différents à l'état désoxygéné aux trois valeurs de pH étudiées. Des comportements différents sont observés pour les structures feuillets β parallèles, β coudées et les feuillets β antiparallèles en fonction du pH et de l'état d'oxygénation. Par conséquent, pour simplifier l'interprétation des résultats, nous avons additionné toutes les composantes β pour discuter des changements structuraux en fonction de deux structures principales : l'hélice α plus structures désordonnées et la structure β totale. En effet, la désoxygénation de ces trois hémocyanines induit une légère diminution des hélices α plus structures désordonnées (30-42%) et l'augmentation de la structure totale β (+ 4-11%) à tous les pH étudiés (Tableau S7 en annexe). Ce changement conformationnel sur la structure des trois hémocyanines est plus prononcé à pH 7 et 7.5 pour *L. polyphemus* et *A. leptodactylus*. Pour l'hémocyanine de l'*E. californicum* les changements

structuraux observés sont similaires à toutes les valeurs de pH étudiées. Ces changements conformationnels, induits pour les trois hémocyanines à l'état désoxygéné peuvent être appuyé par d'autres études effectuées sur l'hémocyanine *E. californicum* à l'état désoxygéné.

En effet, des études réalisées par diffraction des rayons X sur le site actif de l'hémocyanine à l'état désoxygéné ont montré que la géométrie de ce site change avec la désoxygénation en fonction du pH. Cela est suggéré comme le résultat d'une contrainte sur le site actif induit par des changements conformationnels au niveau de la protéine.¹⁸

De plus, d'autres études par diffraction des rayons X aux petits angles ont montré que la forme oxygénée de l'hémocyanine de l'*E. californicum* était beaucoup moins compact qu'à l'état désoxygéné, ce qui peut indiquer des changements au niveau de la structure quaternaire de la protéine.¹⁹

Les résultats des taux de structures secondaires des trois hémocyanines à l'état réoxygénée sont presque identiques à ceux obtenus pour les protéines à l'état oxygéné pour les différentes valeurs de pH étudiées (Figure 10, Figure 11 et Figure 12 et Tableau S7 en annexe).

4.1 Réversibilité de la structure secondaire des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* vis-à-vis de l'oxygénation

Afin d'obtenir un aperçu supplémentaire sur les changements conformationnels survenus dans les hémocyanines de *L. polyphemus*, l'*E. californicum* et l'*A. leptodactylus* à l'état oxygéné et réoxygéné, nous avons calculé les spectres différentiels à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 comme le montre la Figure 13.

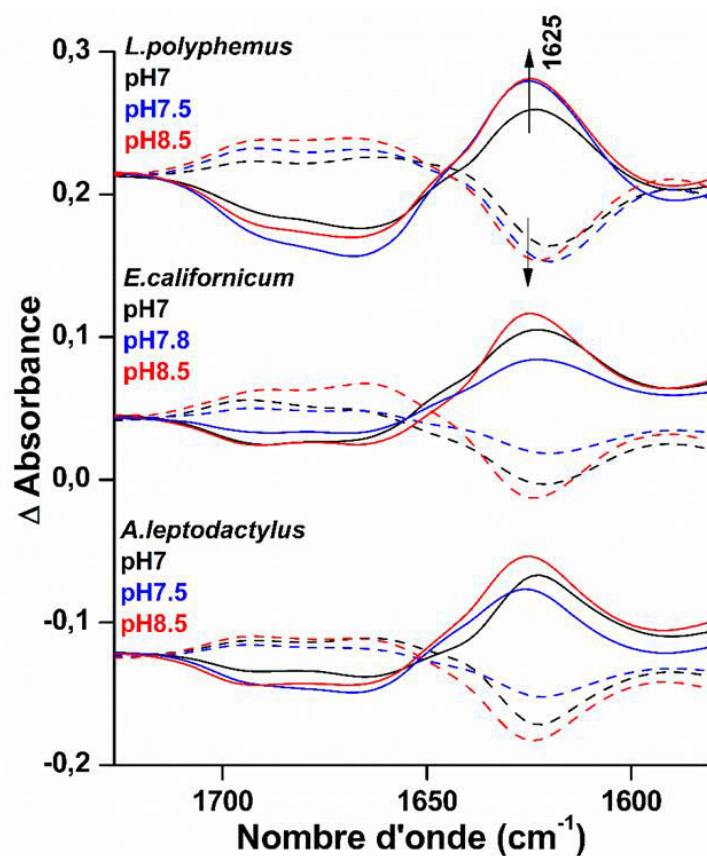


Figure 13: Spectres différentiels des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à pH 7, 7.5-7.8 et 8.5 obtenus au cours du processus d'oxygénation (oxy-désoxy) traits en continu et en pointillés (désoxy-réoxy).

Ces spectres ont été obtenus en soustrayant les spectres des protéines sous forme désoxygénée des spectres de la forme oxygénée. Les spectres en pointillés représentent la soustraction de la forme réoxygénée des spectres de la forme désoxygénée à différentes valeurs de pH pour les trois hémocyanines.

Les spectres différentiels calculés pour les trois protéines à l'état désoxygéné sont dominés par une bande négative large (traits continus Figure 13) située entre 1717 et 1646 cm^{-1} . Cette bande

est complexe, elle contient les contributions des feuillettes β antiparallèles, des β coudes et des hélices α plus structures désordonnées. Au cours de la désoxygénation, cette bande diminue en faveur de l’augmentation de la bande positive située à 1625 cm^{-1} qui est attribuée aux feuillettes β parallèles. A l’état désoxygéné des trois hémocyanines, les bandes associées aux éléments de la structure secondaire sont déplacées de 2 à 10 cm^{-1} vers les hauts nombre d’onde. De plus, les pourcentages des structures feuillettes β antiparallèles, β coudes et les hélices α plus structures désordonnées diminuent à l’état désoxygéné en faveur de l’augmentation du pourcentage des feuillettes β parallèles comme le montre le résultat de la déconvolution représenté dans le Tableau S7 en annexe. Lors de la réoxygénation, les spectres différentiels ont montré une réversibilité presque totale aux différents états d’oxygénation et de pH pour les trois hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus*.

4.2 Etude par spectroscopie Raman

Comme nous avons observé précédemment des changements au niveau de la structure secondaire au cours du processus d’oxygénation, nous nous sommes également focalisés sur l’étude de l’influence de l’oxygène sur le site actif via l’étude des bandes de vibrations d’élongation (O-O) à l’aide de la spectroscopie Raman.

Ci-dessous, un des exemples des spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d’oxygénation à pH 7 (Figure 14). Les spectres Raman de ces hémocyanines à pH 7.5-7.8 et 8.5 sont représentés dans les Figures S7 et S8 en annexe.

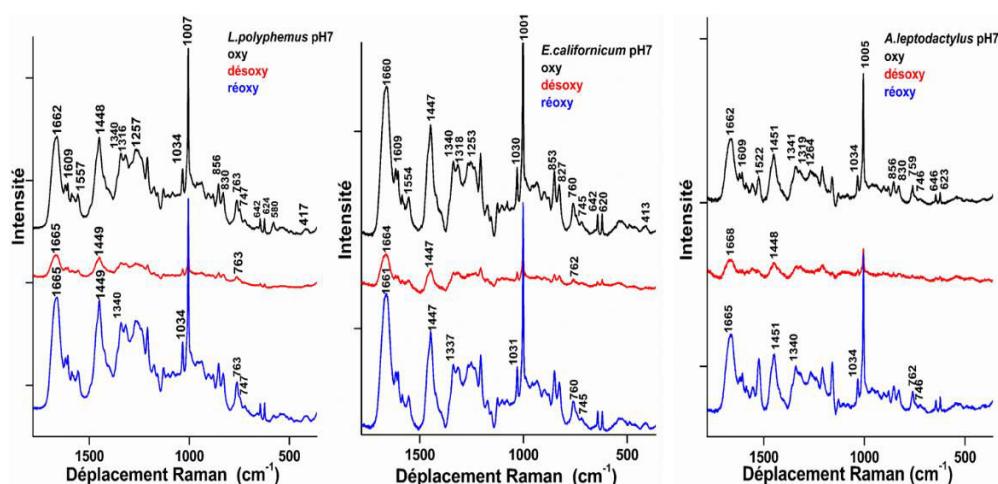


Figure 14 : Spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à l’état oxygéné, désoxygéné et réoxygéné à pH 7 obtenu avec une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale 1780-360 cm^{-1} avec une correction de la ligne de base.

Le spectre Raman de la forme oxygénée des trois hémocyanines est composé de deux régions principales. La première située de 1780 à 999 cm^{-1} est dominée par des bandes intenses localisées à 1660-1662, 1447-1451 et 1001-1007 cm^{-1} qui correspondent au mode amide I, un mélange des modes de vibration des histidines et arginines et de la phénylalanine, respectivement. Les bandes moins intenses de cette région sont généralement attribuées à la tyrosine, amide II ainsi que d’autres vibrations des résidus d’acides aminés.

La deuxième région, allant de 999 à 360 cm^{-1} , contient des bandes de faible intensité attribuées à des vibrations issues de divers résidus d’acides aminés comme l’histidine, la glycine, l’isoleucine et la tyrosine. Cette région contient également les vibrations d’élongations ν (O-O) de la bande d’oxygène.

Au cours de la désoxygénation, une diminution importante de l’intensité a été observée sur toute la gamme spectrale comme le montre la Figure 14 pour les trois hémocyanines. Cette diminution d’intensité des bandes est expliquée par le changement observé en spectroscopie UV-Visible entre la forme oxygénée et désoxygénée. A l’état désoxygéné, les orbitales moléculaires d sont occupées, ceci implique qu’il y a pas de transition d-d, pas de mobilité électronique et donc pas d’absorption dans le visible ainsi que de très faible signaux observé en spectroscopie Raman.

Lors de la réoxygénation, les bandes redeviennent intenses et sont identiques à celles des spectres de l’état oxygéné. Le Tableau 6 détaille l’attribution des différentes bandes observées sur le spectre Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d’oxygénation à pH 7.

pH 7				
Hémocyanines	Oxygéné	Désoxygéné	Réoxygéné	Tentative d’attribution (cm^{-1})
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1662/1660/1662	1665/1664/1668	1665/1661/1665	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$ + tampon
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1609/1609/1609	1608/1608/1609	1609/1604/1606	phénylalanine
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1557/1554/1558	1556/1551/-/	1557/1558/1554	$\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$, Trp
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	- / - /1522	-/-/	-/-/1525	?

<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1448/1447/1451	1449/1447/1448	1449/1447/1451	$\delta(\text{CH}_2)$ histidine + $\nu(\text{N-C-N})^{\text{as}}$ arginine, $\delta(\text{CH}_2)$ glycine +tampon
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1340/1340/1341	1344/1338/1340	1340/1337/1340	$\beta(\text{CH}_2)$ histidine, (CH) isoleucine,
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1316/1318/1319	1316/1317/1317	1319/1313/1317	ν de l'anneau phénylalanine, $\nu(\text{C=N})$ histidine , $\nu(\text{C-N})$
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1257/1253/1264	1252/-/-	1260/1250/1266	Amide III δ (O=C-N), Tyr, His, Asp et ($\text{C}_\delta^{\text{as}}$ rock), $\delta(\text{C}^\beta)$, ($\text{H}_\alpha\text{-C}_\alpha\text{-C}_\gamma$) isoleucine
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1034/1030/1034	1034/1030/1034	1034/1031/1034	Tampon
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	1007/1001/1005	1005/1002/1004	1007/1002/1004	δ de l'anneau phénylalanine
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	856/853/856	853/850/-	856/851/854	Tyr, $\nu(\text{=C-C})$, δ de l'anneau histidine
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	830/830/830	830/826/-	830/830/830	($\text{C}_\beta\text{-C}_{\gamma 1}$) isoleucine , Tyr
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	763/760/762	763/762/-	763/760/762	Tryptophane
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	747/745/746	-/-/-	747/745/746	$\nu(\text{O-O})$
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	642/642/646	643/641/-	645/640/645	Tyr
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	624/620/623	624/620/-	620/619/623	Phénylalanine
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	580/-/-	-/-/-	579/-/-	?
<i>L.p/ E.c/A.l</i>	417/413/-	-/-/-	414/ 412/-	?

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des bandes de vibrations des spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d'oxygénation à pH 7.²⁰⁻²³

La Figure 15 ci-dessous montre les changements des bandes de vibrations de l'oxygène et des résidus d'acides aminés tryptophanes qui se produisent au niveau du site actif lors du processus d'oxygénation. Il est important de noter que les lignes de base de ces spectres Raman n'ont pas

été corrigées afin d’éviter une surestimation de l’intensité de ces bandes. Ces spectres Raman ont présenté deux bandes situées aux alentours de 760 et 745 cm^{-1} , attribuées respectivement aux vibrations des résidus d’acides aminés tryptophane et d’elongation $\nu(\text{O-O})$ de l’oxygène des sites actifs.^{20, 21}

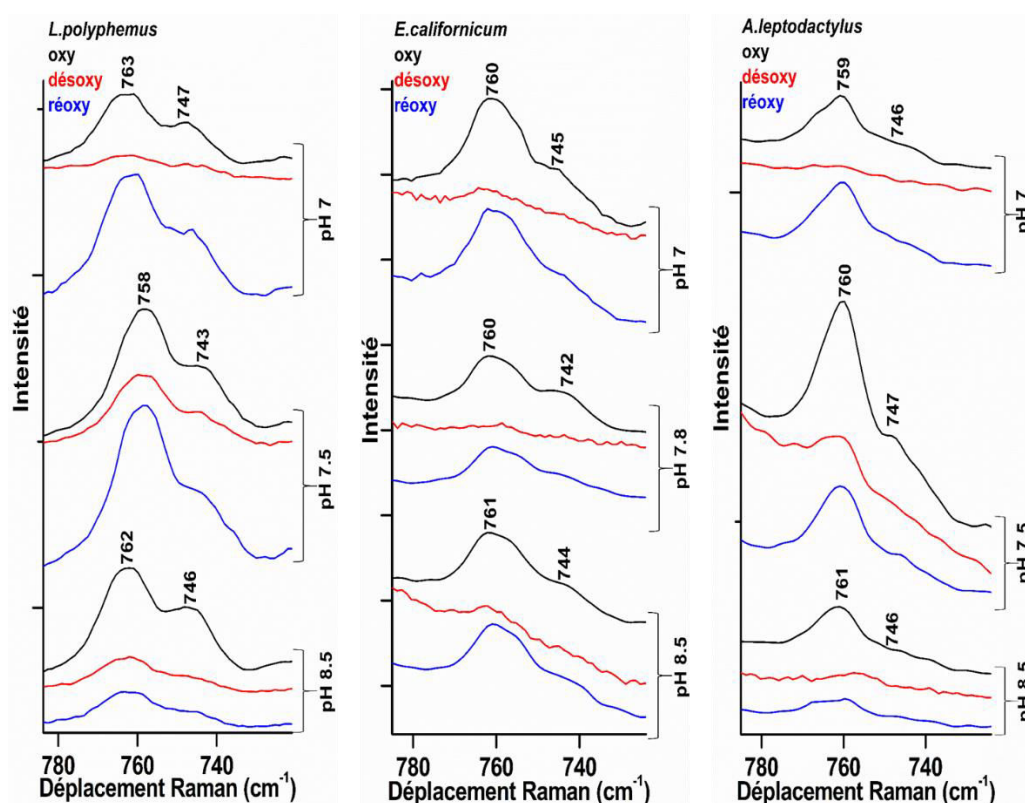


Figure 15 : Représentation de la bande d’oxygène et tryptophane des spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents pH et états d’oxygénation obtenus à une excitation de 514 nm dans la gamme spectrale 785-724 cm^{-1} sans correction de la ligne de base.

Les spectres Raman de l’état désoxygéné de ces trois protéines à pH 7 ont montré un comportement similaire caractérisé par une diminution importante de l’intensité des bandes. Mais, à pH intermédiaire (7.5-7.8) les hémocyanines de *L. polyphemus* et *A. leptodactylus* paraissent moins affecté par la désoxygénation comparé à l’hémocyanine de *E. californicum*. Cependant, à pH 8.5, le spectre Raman de l’hémocyanine de *L. polyphemus* à l’état désoxygéné est plus intense comparé à ceux obtenus des hémocyanines de l’*E. californicum* et l’*A. leptodactylus*.

Similairement, des différences dans ces deux bandes Raman sont observées pour les hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à l’état réoxygéné. A pH 7 un profil similaire est obtenu pour ces deux bandes entre l’état oxygéné et réoxygéné. A pH intermédiaire, la réoxygénation des Hcs du *L. polyphemus* et *E. californicum* donne des spectres

Raman semblables à ceux obtenus dans la forme oxygénée, par contre le spectre Raman de l’hémocyanine de l’*A.leptodactylus* est moins intense que le spectre à l’état oxygéné. A pH 8.5, seul le spectre Raman de Hc de l’*E.californicum* à l’état réoxygéné présente un profil similaire à celui obtenu à l’état oxygéné, les spectres du *L. polyphemus*, et *A. leptodactylus* sont moins intenses comparé à ceux obtenus pour les deux espèces à l’état oxygéné.

Ces trois hémocyanines ont montré des signatures Raman différentes à l’état désoxygéné et réoxygéné à différentes valeurs de pH. L’enlèvement de l’oxygène des sites actifs des Hcs du *L. polyphemus* et *A. leptodactylus* semble être affecté par le pH à 7.5 et 8.5, alors que l’hémocyanine de l’*E.californicum* est beaucoup moins influencé par le pH. Les résultats obtenus dans cette étude ne sont pas reproductibles au contraire de ceux obtenus par spectroscopie infrarouge, cela peut être dû à des problèmes liée à la cellule, qui est en cours d’amélioration. En effet, le problème rencontré au cours de ses expériences de désoxygénation étudiées par spectroscopie Raman est la non étanchéité de la cellule de mesure qui ne nous a pas permis d’avoir un état désoxygéné stable.

Les différences observées sur les spectres Raman des trois protéines aux différents états d’oxygénation et de pH pourraient être expliquées par le changement de l’environnement des sites actifs en présence et absence de l’oxygène. En effet, des séquences homologues de 68 à 79% ont été identifiées pour les Hcs de *L. polyphemus* et *E. californicum* notamment au niveau de la sous unité II.²⁴ Le schéma de la Figure 16 présente la structure cristallographique du site actif situé dans la sous unité II de l’hémocyanine de *L. polyphemus* à l’état oxygéné et désoxygéné.

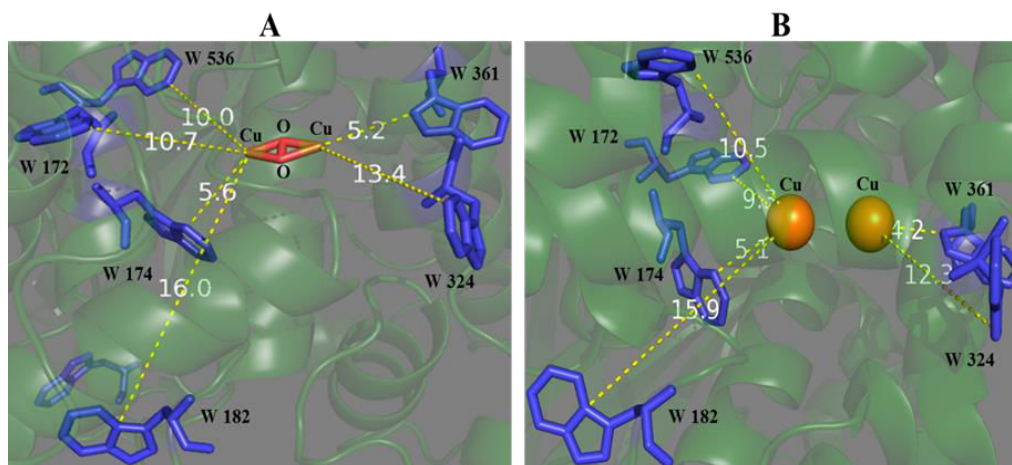


Figure 16 : Schéma du site actif de l’hémocyanine de *L. polyphemus* obtenu à l’aide du logiciel Pymol en (A) à l’état oxygéné (code PDB : (1NOL)) et en (B) à l’état désoxygéné (code PDB : (1LLA)) avec les résidus d’acides aminés tryptophane et leur distance du site actif.

Comme le montre la Figure 16, le site actif est entouré d'un nombre important de résidus d'acides aminés tryptophanes situés à des distances variables. Ces distances entre les résidus tryptophane et les deux atomes de cuivre sont similaires dans l'ensemble à l'état oxygéné et désoxygéné sauf dans le cas des tryptophane 172, 324 et 361 positionnés à des distances moindre d'environ 1Å des atomes de cuivre à l'état désoxygéné comparé à leurs positions à l'état oxygéné. Ainsi ces variations de distances des acides aminés tryptophanes autour du site actif entre l'état oxygéné et désoxygéné peuvent induire des changements de géométrie de ce site actif en fonction de l'état d'oxygénation et du pH.¹⁸

5 Conclusion

Nos résultats mettent en évidence une forte stabilité des Hcs de *L. polyphemus* et *E. californicum* sous l'effet de très basses températures et du pH. Une structure secondaire composée majoritairement d'hélices α plus structures désordonnées, de 40 à 60%, a été révélée à différents pH et à très basses températures.

De plus, la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* est plus affectée par les très basses températures comparée à celle de l'*E. californicum*. De faibles différences dans la structure secondaire de ces deux protéines sont notées lorsqu'elles sont exposées à des basses températures de 20 K. En raison de la réversibilité de la structure de ces deux hémocyanines ainsi que du maintien de la liaison d'oxygène à des basses températures, ces observations nous ont permis de classer ces deux protéines comme très stables malgré la complexité de leur structure quaternaire.

De même, cette stabilité a été observée par la spectroscopie FTIR en mode ATR dans le cas des trois hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d'oxygénation et pH. La désoxygénation de ces trois hémocyanines a induit une légère diminution de la structure majoritaire en hélice α plus structure désordonnée au profit de l'augmentation de la structure β totale à tous les pH étudiés. De plus, ces trois hémocyanines ont montré une réversibilité presque totale en présence et absence d'oxygène à différentes valeurs de pH.

Enfin, en spectroscopie Raman des changements au niveau du site actif de ces trois hémocyanines à l'état désoxygéné et réoxygéné à différent pH ont été mis en évidence.

6 Références bibliographiques

1. Barth, A., and Zscherp, C. (2002) What vibrations tell about proteins, *Q. Rev. Biophys.* 35, 369-430.
2. Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995) The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein-Structure, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95-120.
3. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
4. Goormaghtigh, E., Cabiliaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994) Subcellular Biochemistry: Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes, (Hilderson, H. J., and Ralston, G. B., Eds.), pp 23:405-450, Plenum, New York.
5. Tatulian, S. A. (2013) Structural Characterization of Membrane Proteins and Peptides by FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy, In *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols* (Springer, Ed.), Springer, New York.
6. Yesilyurt, B. T., Gielens, C., and Meersman, F. (2008) Thermal stability of homologous functional units of Helix pomatia hemocyanin does not correlate with carbohydrate content, *FEBS J.* 275, 3625-3632.
7. Gilde, F., Maniti, O., Guillot, R., Mano, J. F., Logeart-Avramoglou, D., Sailhan, F., and Picart, C. (2012) Secondary Structure of rhBMP-2 in a Protective Biopolymeric Carrier Material, *Biomacromolecules* 13, 3620-3626.
8. Sterner, R., Vogl, T., Hinz, H. J., Penz, F., Hoff, R., Foll, R., and Decker, H. (1995) Extreme Thermostability of Tarantula Hemocyanin, *FEBS Lett.* 364, 9-12.
9. Sullivan, B., Bonaventura, J., and Bonaventura, C. (1974) Functional Differences in the Multiple Hemocyanins of the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus* L, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 2558-2562.
10. Brenowitz, M., Bonaventura, C., and Bonaventura, J. (1984) Self-association and oxygen-binding characteristics of the isolated subunits of *Limulus polyphemus* hemocyanin, *Arch. Biochem. Biophys.* 230, 238-249.
11. Meersman, F., Smeller, L., and Heremans, K. (2002) Comparative Fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin, *Biophys. J.* 82, 2635-2644.
12. Lazar, K. L., Patapoff, T. W., and Sharma, V. K. (2010) Cold denaturation of monoclonal antibodies, *Mabs* 2, 42-52.
13. Kolhe, P., Amend, E., and Singh, S. K. (2010) Impact of Freezing on pH of Buffered Solutions and Consequences for Monoclonal Antibody Aggregation, *Biotechnol. Progr.* 26, 727-733.
14. Williamssmith, D. L., Bray, R. C., Barber, M. J., Tsopanakis, A. D., and Vincent, S. P. (1977) Changes in Apparent Ph on Freezing Aqueous Buffer Solutions and Their Relevance to Biochemical Electron-Paramagnetic-Resonance Spectroscopy, *Biochem. J* 167, 593-600.
15. Manas, E. S., Getahun, Z., Wright, W. W., DeGrado, W. F., and Vanderkooi, J. M. (2000) Infrared spectra of amide groups in alpha-helical proteins: Evidence for hydrogen bonding between helices and water, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9883-9890.

16. Idakieva, K., Raynova, Y., Meersman, F., and Gielens, C. (2013) Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin, *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 164, 201-209.
17. Decker, H., and Savel, A. (1990) Invertebrate Dioxygen Carriers (Preaux, G., and Lonite, R., Eds.), pp 393-395, Leuven University Press, Leuven.
18. Hirota, S., Kawahara, T., Beltramini, M., Di Muro, P., Magliozzo, R. S., Peisach, J., Powers, L. S., Tanaka, N., Nagao, S., and Bubacco, L. (2008) Molecular Basis of the Bohr Effect in Arthropod Hemocyanin, *J. Biol. Chem.* 283, 31941-31948.
19. Decker, H., Hartmann, H., Sterner, R., Schwarz, E., and Pilz, I. (1996) Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin, *FEBS Lett.* 393, 226-230.
20. Larrabee, J. A., and Spiro, T. G. (1980) Structural Studies of the Hemocyanin Active-Site .2. Resonance Raman-Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4217-4223.
21. Freedman, T. B., Loehr, J. S., and Loehr, T. M. (1976) Resonance Raman Study of Copper Protein, Hemocyanin - New Evidence for Structure of Oxygen-Binding Site, *J. Am. Chem. Soc.* 98, 2809-2815.
22. Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., and Wan, X. (2011) Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 78, 1187-1195.
23. Hernandez, B., Pfluger, F., Adenier, A., Kruglik, S. G., and Ghomi, M. (2010) Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media. VIII. Amino Acids with Aromatic Side Chains: L-Phenylalanine, L-Tyrosine, and L-Tryptophan, *J. Phys. Chem. B* 114, 15319-15330.
24. Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Schweikardt, T., Decker, H., and Burmester, T. (2000) Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum* - Structure and intramolecular evolution of the subunits, *J. Biol. Chem.* 275, 39339-39344.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Cette thèse est composée de trois parties principales qui sont axées sur l'étude de l'interaction entre l'adrénodoxine, l'adrénodoxine réductase et le cytochrome CYP106A2, les domaines PDZ avec les peptides viraux ainsi que la stabilité des protéines respiratoires hémocyanines.

Dans la première partie, l'étude par spectroscopie Raman et infrarouge a montré des changements conformationnels importants dans la géométrie du cluster fer soufre de la protéine Adx lors de son interaction avec l'AdR. La forme tronquée Adx (4-108) ainsi que la mutation de l'Adx T54S à proximité du cluster fer-soufre ont induit des changements spectraux plus prononcés lors de l'interaction avec AdR. La spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie a montré des changements conformationnels au niveau de la structure secondaire ainsi que l'anneau isoalloxazine FAD de l'AdR. Ces changements ont été plus ou moins prononcés en fonction de l'emplacement du mutant Adx étudié. En ce qui concerne le CYP106A2, la spectroscopie Raman nous a permis de confirmer grâce à la position de certaines bandes caractéristiques que l'hème *b* est hexacoordiné et à l'état bas spin. L'interaction du CYP106A2 avec les différentes protéines d'Adx n'a pas montré de modification spectrale à l'exception du complexe CYP106A2/AdxT54S; D113Y. Afin de mieux visualiser l'interaction de ce cytochrome avec les protéines Adx, des études de mutation des résidus d'acides aminés d'Adx tels que les résidus acide aspartique 72, 76 et 79 qui se trouvent à proximité du site d'interaction du cytochrome seront nécessaires dans le futur.

La deuxième partie concernant l'interaction des domaines PDZ avec les protéines virales étudiées par spectroscopie infrarouge (moyen et lointain) en mode ATR, a montré que la structure secondaire des différents complexes caractérisés est composée majoritairement de feuillets β parallèles. Des changements conformationnels au niveau de la structure secondaire et tertiaire de ces complexes ont été observés. La spectroscopie Raman a montré des différences dans toute la gamme spectrale étudiée. La variation la plus importante était observée au niveau de la bande amide III. Cependant, afin de pouvoir émettre des hypothèses concernant l'origine de ces changements, des calculs théoriques sur ces complexes protéiques sont nécessaires. Ce travail est en cours à l'heure actuelle (en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, équipe Oncoprotéines à l'université de Strasbourg).

La troisième partie a été consacrée à une étude comparative de la stabilité des deux hémocyanines sous l'effet du pH et de basses températures. Les hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* ont montré un comportement structural différent vis-à-vis du pH étudié à température ambiante (294 K). Ce comportement structural différent induit par le pH

Conclusion générale

entre ces deux protéines peut avoir une signification biologique et est probablement lié à l'environnement de la protéine dont elle a besoin pour s'adapter étant donné que les organismes dont elles sont issues proviennent de deux habitats très différents.

Le deuxième paramètre mis en évidence est la température. La structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* est plus affectée par les très basses températures comparée à l'*E. californicum*. De faibles différences dans la structure secondaire de ces deux protéines sont notées lorsqu'elles sont exposées à des basses températures de 20 K.

Une transition de la structure secondaire comprise entre 100 et 50 K pour l'hémocyanine de *L. polyphemus* a été observée à toutes les valeurs de pH étudiées. Cette dernière implique une diminution progressive des hélices α plus structures désordonnées et une augmentation simultanée des feuillets β parallèles sous l'effet de basses températures. En revanche l'hémocyanine de l'*E. californicum* n'a montré aucune transition de la structure secondaire pour toutes les valeurs de pH étudiées.

Avec la réversibilité de ces deux hémocyanines ainsi que le maintien de la liaison d'oxygène même à basses températures, ces observations nous ont permis de classer ces deux protéines comme très stables malgré la complexité de leurs structures quaternaires.

De même, cette stabilité a été observée par spectroscopie FTIR en mode ATR pour les trois hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à différents états d'oxygénation et pH. La désoxygénation de ces trois hémocyanines a induit une légère diminution des hélices α plus structures désordonnées, structures majoritaires au profit de l'augmentation de la structure totale β à toutes les valeurs de pH étudiées.

De plus, la spectroscopie Raman a montré des changements différents au niveau du site actif de ces trois hémocyanines sous l'effet de l'oxygénation à différents pH. Seule l'hémocyanine de l'*E. californicum* a présenté une réversibilité dans toute la gamme de pH étudiée. En revanche, celle de *L. polyphemus* et *A. leptodactylus* ont montré des comportements différents vis-à-vis de l'état d'oxygénation et du pH.

Une des perspectives de ce projet serait d'étudier la stabilité de ces sous-unités séparément par spectroscopie infrarouge ainsi que l'influence de l'oxygène par spectroscopie Raman.

ANNEXES

3 - Etude de l'interaction d'adrénodoxine, d'adrénodoxine reductase et du cytochrome CYP106A2

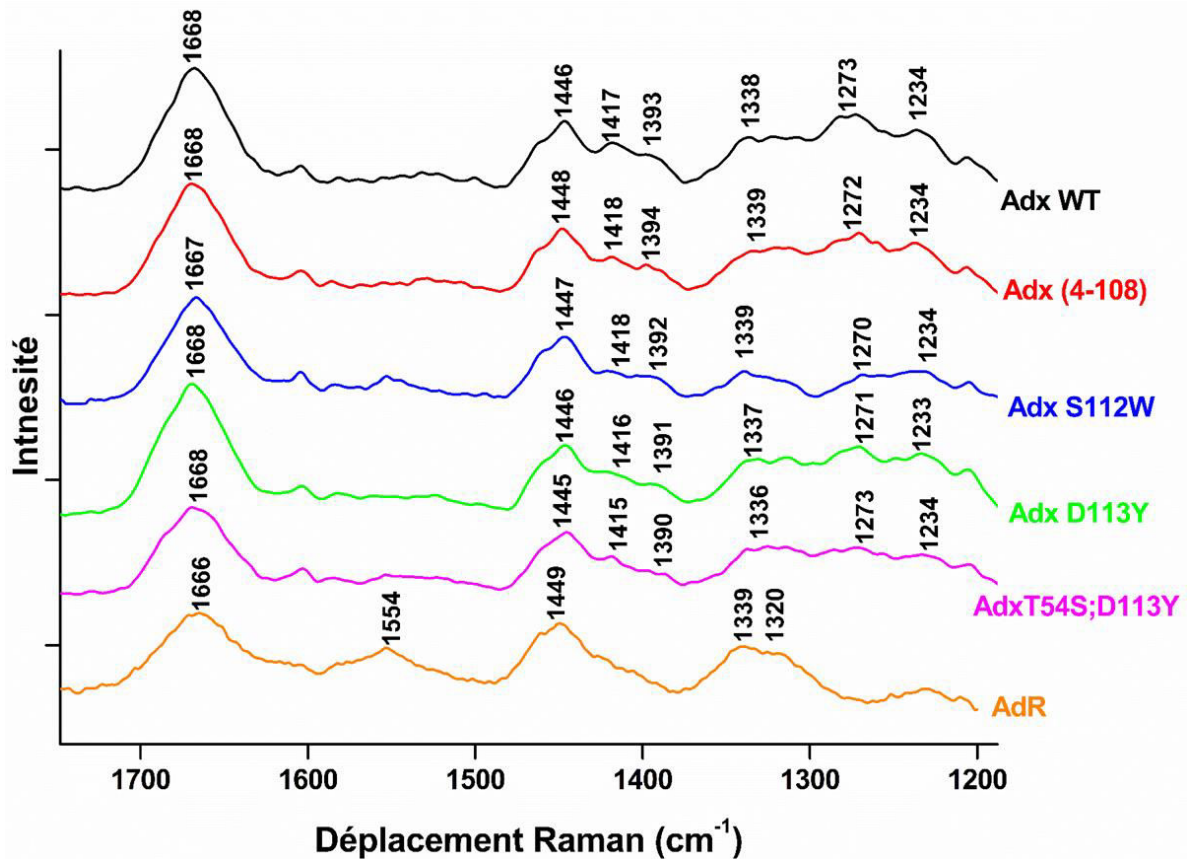


Figure S1 : Spectres Raman de l'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx D113Y, Adx T54S;D113Y et de l'AdR obtenus avec une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale de 1700 à 1200 cm⁻¹.

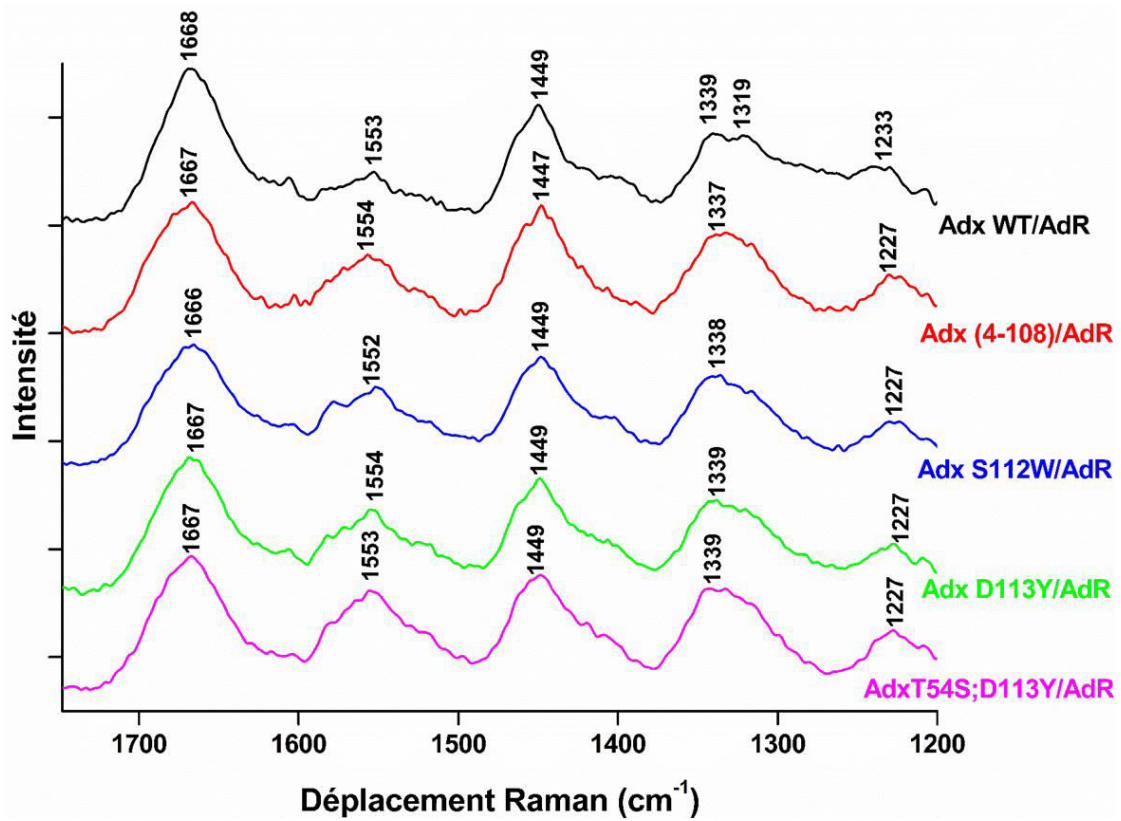


Figure S2 : Spectres Raman des complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S;D113Y/AdR obtenus avec une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale de 1700 à 1200 cm^{-1} .

Adx WT	Adx (4-108)	Adx S112W	Adx D113Y	AdxT54S ; D113Y	AdR	Tentative d'attribution
1668	1668	1667	1668	1668	1666	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
/	/	/	/	/	1554	$\nu(\text{C}_{10\text{a}}=\text{N}_1)$ $\nu(\text{anneau I de l'isoalloxazine})$
1446	1448	1447	1446	1445	1449	$\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{anneau I et II de l'isoalloxazine})$, C β -bend tyrosine, C β -scissor et C δ asym isoleucine
1393	1394	1392	1391	1390	/	C β -C α -H α , $\nu(\text{COO}^-)^s$ isoleucine
1338	1339	1339	1337	1336	1339	$\delta(\text{CH}_3^{\text{II}})$, $\nu(\text{N}_3\text{-H}) +$ $\nu(\text{N}_5\text{-C}_{5\text{a}})$, $\nu(\text{anneau I, II et III de l'isoalloxazine})$
/	/	/	/	/	1320	$\delta(\text{CH}_3^{\text{II}})$, $\nu(\text{N}_5\text{-C}_{5\text{a}}) +$ $\nu(\text{C}=\text{N}) +$ $\nu(\text{C-N})$ histidine
1273	1272	1270	1271	1273	/	C β -twist tryptophane + Amide III $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C}_\alpha\text{-C})$
1234	1234	1234	1233	1234	/	$\delta=\text{C-H} +$ $\nu(=\text{C-N})$, $\nu(\text{N-C-N}) + \delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$ $\nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-H})$ histidine + Amide III $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C}_\alpha\text{-C})$

Tableau S1 : Attribution des spectres Raman d'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx D113Y, Adx T54S; D113Y et AdR obtenus avec une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale de 1700 à 1200 cm^{-1} .

Adx WT/AdR	Adx (4-108)/AdR	Adx S112W/AdR	Adx D113Y/AdR	Adx T54SD113Y/AdR	Tentative d'attribution
1668	1667	1666	1667	1667	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
1553	1554	1552	1554	1553	$\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$ $\nu(\text{anneau I de l'isoalloxazine})$
1449	1447	1449	1449	1449	$\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{anneau I et II de l'isoalloxazine})$, $\text{C}\beta\text{-bend}$ tyrosine , $\text{C}\beta\text{-scissor}$ et $\text{C}\delta$ asym isoleucine
1339	1337	1338	1339	1339	$\delta(\text{CH}_3^{\text{II}})$, $\nu(\text{N}_3\text{-H}) + \nu(\text{N}_5\text{-C}_{5a})$, $\nu(\text{anneau I, II et III de l'isoalloxazine})$
1319	1319	1319	1319	1319	$\delta(\text{CH}_3^{\text{II}})$, $\nu(\text{N}_5\text{-C}_{5a}) + \nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C-N})$ histidine + Amide III $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{CN})$, $\nu(\text{C}_\alpha\text{-C})$
1233	1227	1227	1227	1227	$\delta = \text{C-H} + \nu(=\text{C-N})$, $\nu(\text{N-C-N}) + \delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$ $\nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-H})$ histidine

Tableau S2 : Attribution des spectres Raman des complexes Adx WT/AdR, Adx (4-108)/AdR, Adx S112W/AdR, Adx D113Y/AdR et Adx T54S; D113Y/AdR obtenus avec une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale de 1700 à 1200 cm^{-1} .

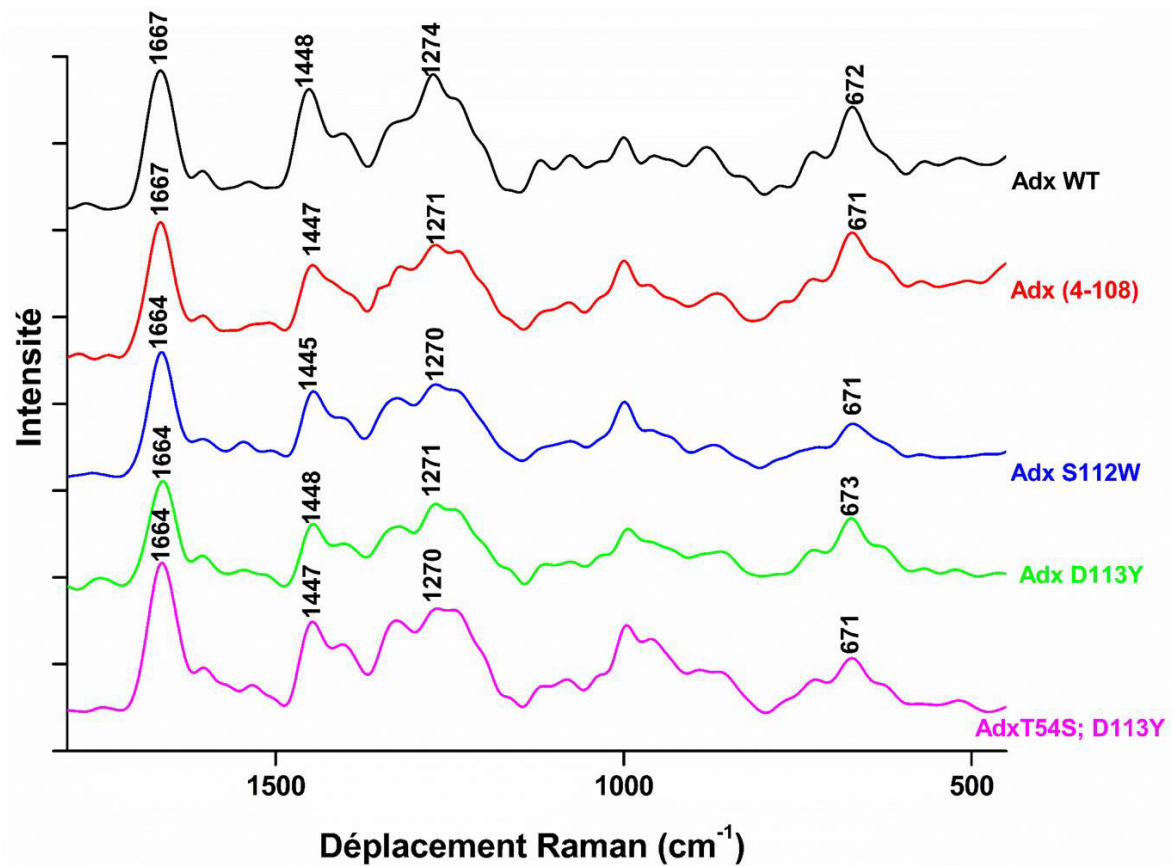


Figure S3 : Spectres Raman de l'Adx WT, Adx (4-108), Adx S112W, Adx D113Y, Adx T54S;D113Y et AdR obtenus avec une excitation à 457 nm dans la gamme spectrale de 1700 à 1200 cm^{-1} .

4- Interactions de la PDZ avec les peptides viraux

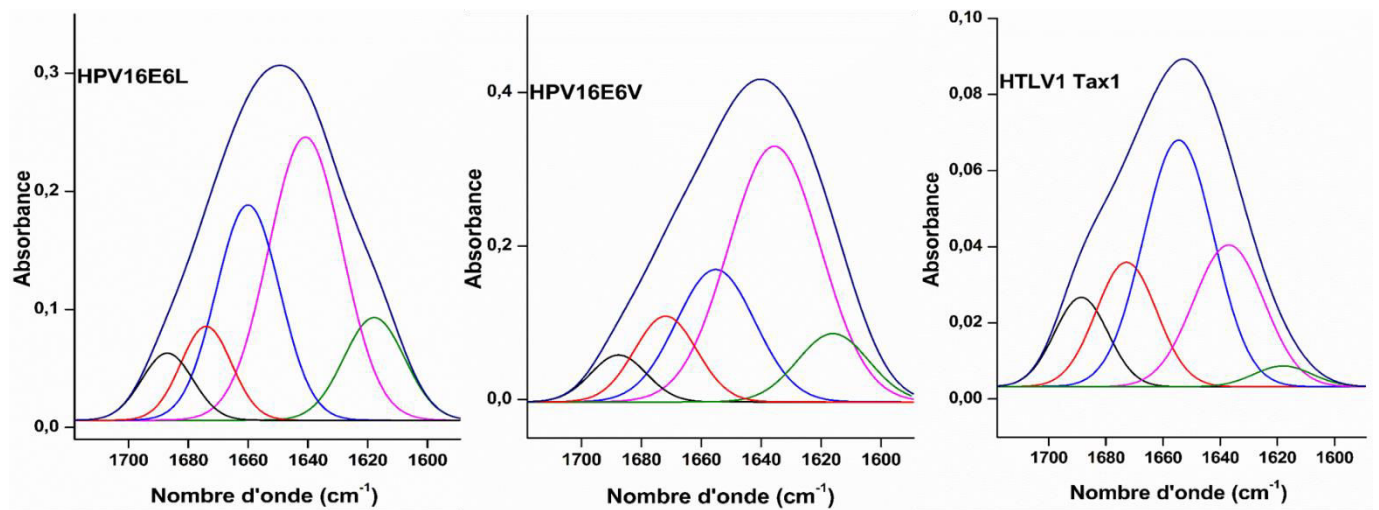


Figure S4 : Décomposition du massif Amide I des peptides HPV16E6L, HPV16E6V et HTLV1 Tax1 en 5 bandes de profil Gaussien.

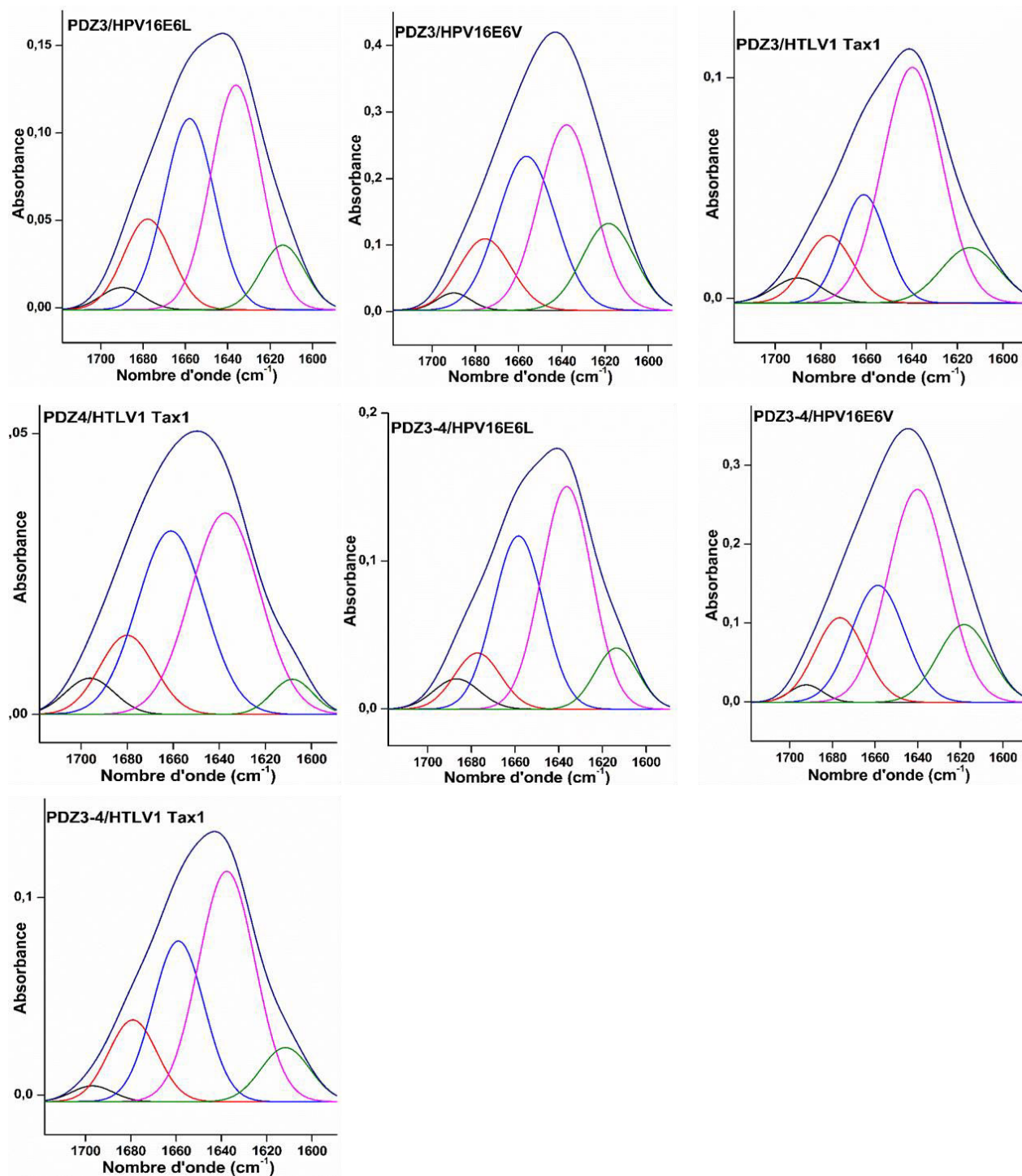


Figure S5 : Décomposition du massif Amide I des complexes PDZ3/HPV16E6L, PDZ3/HPV16E6V, PDZ3/HTLV1 Tax1, PDZ4/HTLV1 Tax1, PDZ3-4/HPV16E6L, PDZ3-4/HPV16E6V et PDZ3-4/HTLV1 Tax1 en 5 bandes de profil Gaussien.

5 - Stabilité et états d'oxygénation des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus*

Température (K)	1660-1664 cm ⁻¹	1639-1642 cm ⁻¹	1679-1685 cm ⁻¹	1616-1624/1693-1695 cm ⁻¹
	Hélices α + désordonnées	Feuillets- β parallèles	β -coudes	Feuillets- β antiparallèles
294	58	19	11	12
250	54	20	14	12
200	50	23	12	15
150	46	25	13	16
100	43	30	11	16
80	41	29	15	15
50	39	32	17	12
40	41	32	14	13
30	40	32	17	11
20	41	35	15	9
10	40	39	15	6

Tableau S3 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 10 K à pH 7. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Température (K)	1660-1664 cm ⁻¹	1639-1642 cm ⁻¹	1679-1685 cm ⁻¹	1616-1624/1693-1695 cm ⁻¹
	Hélices α + désordonnées	Feuillets- β parallèles	β -coudes	Feuillets- β antiparallèles
294	51	24	17	8
250	54	24	14	8
200	56	23	11	10
150	54	25	12	9
100	47	29	15	9
80	42	30	18	10
50	43	32	16	9
40	44	32	14	10
30	45	33	14	8
20	40	34	17	9
10	41	34	18	7

Tableau S4 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de *L. polyphemus* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 10 K à pH 7.5. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Température (K)	1652-1661 cm ⁻¹	1637-1640 cm ⁻¹	1671- 1682 cm ⁻¹	1621-1628 /1690-1695 cm ⁻¹
	Hélices α + désordonnées	Feuillets- β parallèles	β -coudes	Feuillets- β antiparallèles
294	47	21	15	17
250	46	21	15	17
200	42	22	19	17
150	40	23	18	18
100	40	25	19	17
50	38	26	20	16
20	41	27	15	17

Tableau S5 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de *E. californicum* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 20 K à pH 7. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

Température (K)	1652-1661 cm ⁻¹	1637-1640 cm ⁻¹	1671- 1682 cm ⁻¹	1621-1628 /1690-1695 cm ⁻¹
	Hélices α + désordonnées	Feuillets- β parallèles	β -coudes	Feuillets- β antiparallèles
294	40	15	27	18
250	39	14	30	17
200	40	14	27	19
150	42	15	23	20
100	38	15	26	21
50	41	17	22	20
20	41	18	23	18

Tableau S6 : Pourcentages des différentes composantes de la structure secondaire de l'hémocyanine de *E. californicum* avec leurs nombres d'onde sous l'effet de très basses températures allant de 294 à 20 K à pH 7.8. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

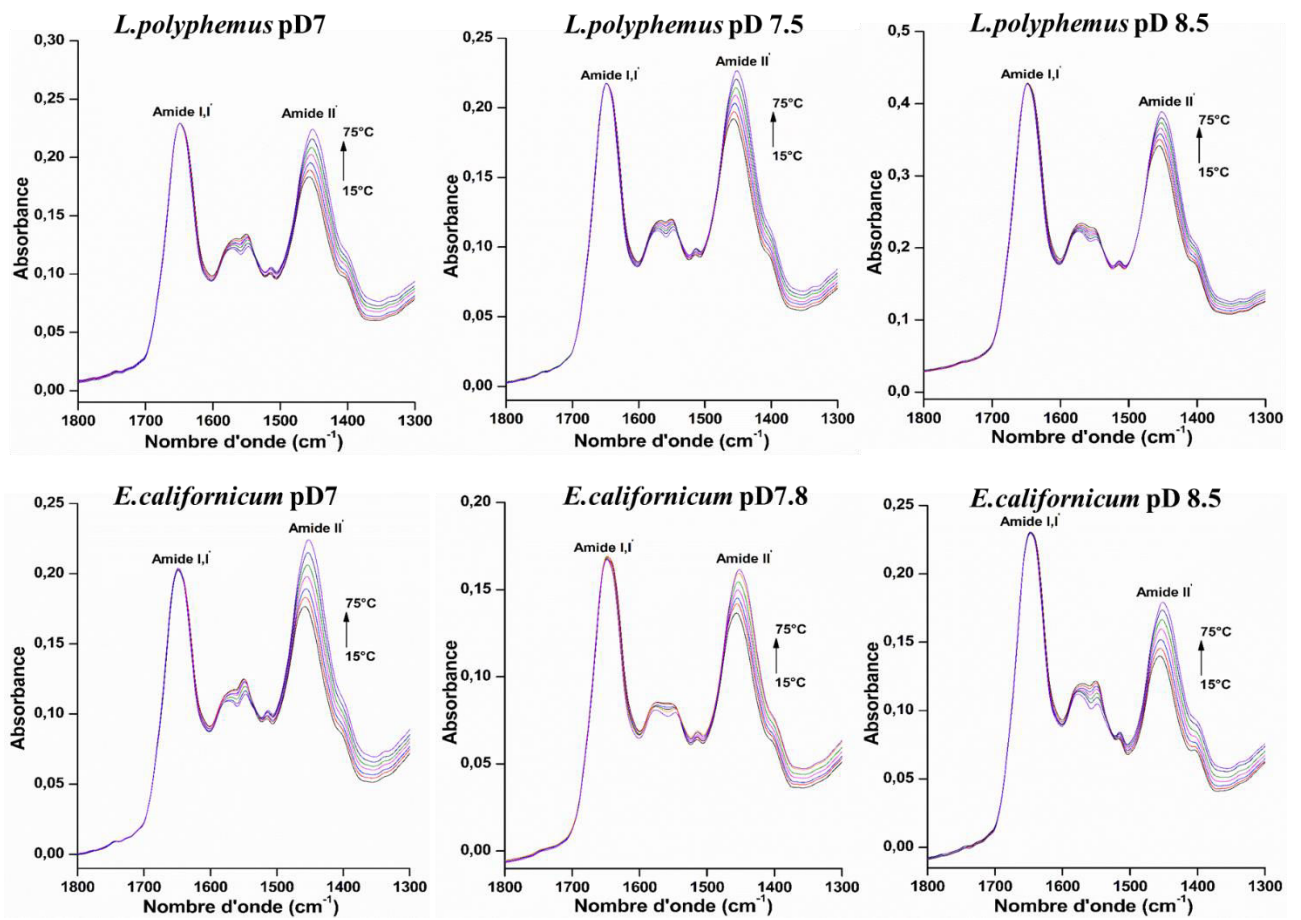


Figure S6 : Spectre d'absorption des hémocyanines de *L. polyphemus* et *E. californicum* obtenus à pD 7, 7.5-7.8 et 8.5 à différentes températures allant de 15 à 75°C.

Structure secondaire (%)	Hémo- cyanines	pH 8.5			pH 7.5-7.8			pH 7		
		oxy	désoxy	réoxy	oxy	désoxy	réoxy	oxy	désoxy	réoxy
hélices α +désord.	<i>L.p.</i>	41	39	40	47	40	46	52	41	51
	<i>E.c.</i>	37	30	38	38	32	39	42	36	43
	<i>A.l.</i>	46	42	45	45	36	42	50	42	50
Feuillets- β Parallèles	<i>L.p.</i>	29	39	29	26	34	26	20	27	17
	<i>E.c.</i>	16	26	17	19	27	21	23	31	21
	<i>A.l.</i>	27	38	26	28	31	29	24	29	24
Feuillets- β antiparallèles	<i>L.p.</i>	11	7	11	12	9	12	14	17	15
	<i>E.c.</i>	21	20	20	15	14	17	18	10	19
	<i>A.l.</i>	11	9	12	15	16	14	13	13	13
β -coudes	<i>L.p.</i>	19	15	20	15	17	16	14	15	17
	<i>E.c.</i>	26	24	25	28	27	23	17	23	17
	<i>A.l.</i>	16	11	17	12	17	15	13	15	13

Tableau S7 : Pourcentages des structures secondaires des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* en rouge et *A. leptodactylus* en bleu dans les différents états d'oxygénations à pH 7,7.5-7.8 et 8.5 obtenus à l'aide de la décomposition de la bande amide I. La précision de la distribution des différentes composantes est estimée à $\pm 3.5\%$.

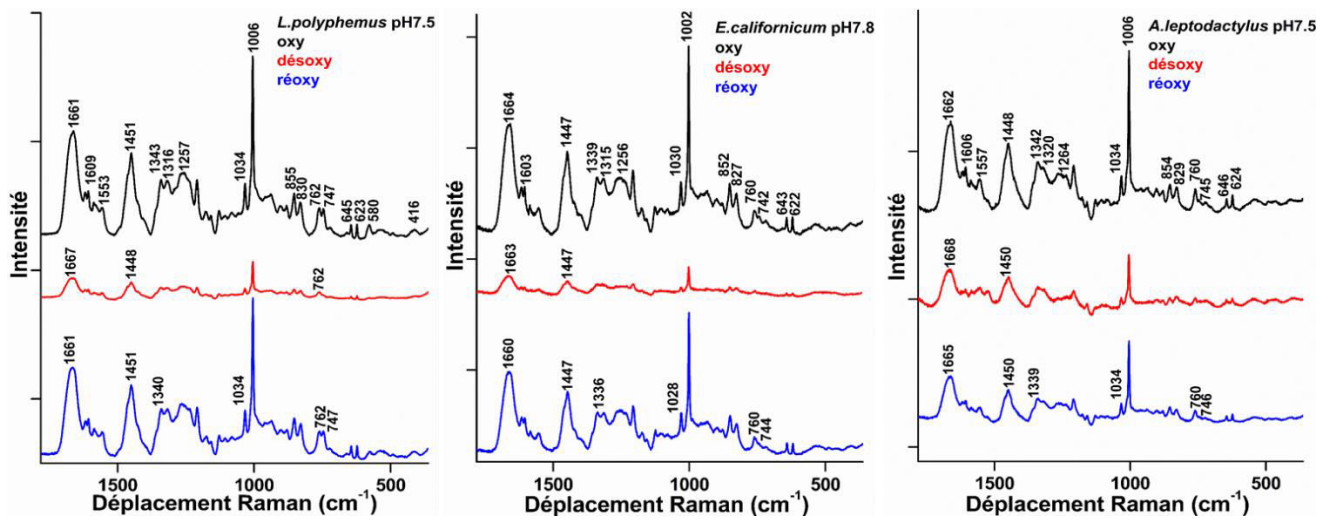


Figure S7 : Spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à l'état oxygéné, désoxygéné et réoxygéné à pH 7.5-7.8 obtenu à une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale 1780-360 cm^{-1} avec une correction de la ligne de base.

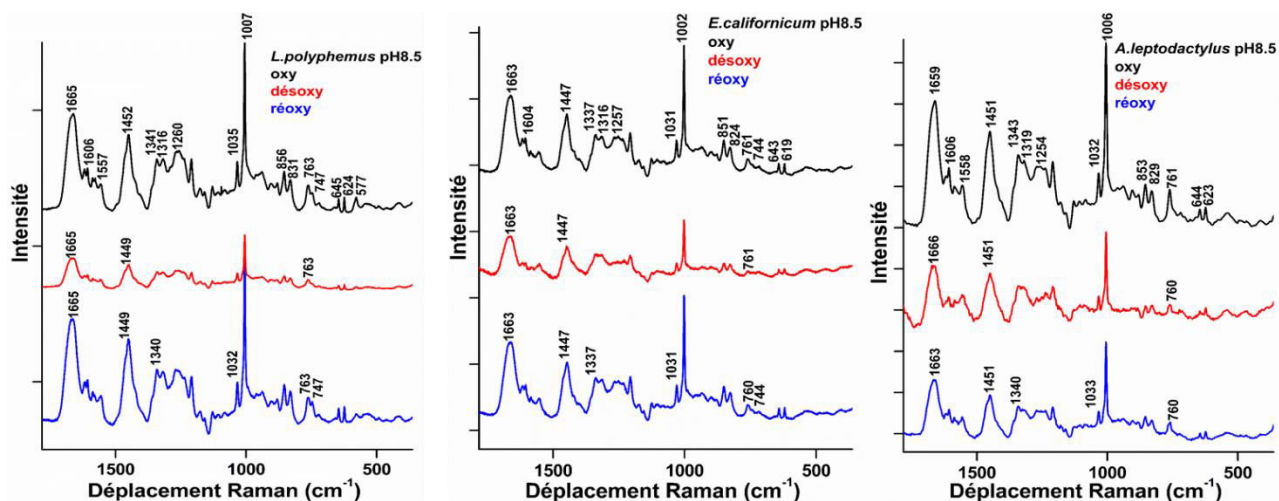


Figure S8 : Spectres Raman des hémocyanines de *L. polyphemus*, *E. californicum* et *A. leptodactylus* à l'état oxygéné, désoxygéné et réoxygéné à pH 8.5 obtenu à une excitation à 514 nm dans la gamme spectrale 1780-360 cm^{-1} avec une correction de la ligne de base.

Interactions et stabilité des protéines étudiées par spectroscopies Infrarouge et Raman

Résumé

Ce travail de thèse est porté sur l'étude des interactions protéines-protéines, protéines-peptides ainsi que la stabilité des protéines en faisant appel à la spectroscopie Raman et infrarouge. Dans la première partie, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'interaction entre les différentes protéines d'adrénodoxine et d'adrénodoxine réductase afin d'apporter de nouvelles données pour compléter la compréhension du mécanisme d'échange électronique. Le deuxième objectif à atteindre dans le cadre de ce travail est de suivre les changements conformationnels au niveau de la structure secondaire et tertiaire des domaines PDZ qui se produisent en présence et en absence des peptides lors de la formation des complexes. Enfin, la dernière partie est dédiée dans un premier temps à une étude comparative de la stabilité des hémocyanines de *Limulus polyphemus* et *Eurypelma californicum* issue de deux organismes ayant des conditions de vie différentes en suivant l'effet de la température (294-20 K) et du pH sur la structure secondaire des protéines. Dans un deuxième temps l'étude porte sur l'influence de la teneur en oxygène sur la structure secondaire et sur le site actif des hémocyanines de *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum* et *Astacus leptodactylus*.

Mots-clés : Spectroscopie Raman et infrarouge, cryostat, structure secondaire, interaction, protéine

Résumé en anglais

This thesis is focused on the study of protein-protein and protein-peptide interactions as well as the study of proteins stability by means of Raman and infrared spectroscopies. In the first part, we focused on the interactions between different adrenodoxin and adrenodoxin reductase proteins in order to get a better understanding of the electron transfer mechanism. The second part of the thesis concerns the changes in the secondary and tertiary structure of PDZ domains in the presence and absence of peptides during complex formation. The last part is dedicated to a comparative study of hemocyanins originated from organisms living in vastly different conditions such as *Limulus polyphemus* and *Eurypelma californicum*. This part of the project concerns the effect of temperature (294-20 K) and pH on the secondary structure of proteins. Finally the influence of oxygen binding on the secondary structure and the active site of *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum* and *Astacus leptodactylus* was investigated.

Keywords: Raman and infrared spectroscopies, cryostat, secondary structure, interaction, protein